

(11) Número de Publicação: **PT 106278**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 36/61** (2006)

**A61K 8/97** (2006)

**B01D 11/02** (2006)

**B01D 11/04** (2006)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2012.04.26**

(30) Prioridade(s):

(43) Data de publicação do pedido: **2013.10.28**

(73) Titular(es):

**UNIVERSIDADE DE AVEIRO  
CAMPUS UNIVERSITARIO DE SANTIAGO  
3810-193 AVEIRO** **PT**

**RAIZ INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO DA  
FLORESTA E PAPEL  
QUINTA S. FRANCISCO APARTADO 15 EIXO-  
AVEIRO  
3850-null ALBERGARIA VELHA** **PT**

(72) Inventor(es):

**RUI MIGUEL DE ANDRADE DOMINGUES** **PT**

**CARMEN SOFIA DA ROCHA FREIRE BARROS** **PT**

**ARMANDO JORGE DOMINGUES SILVESTRE** **PT**

**CARLOS PASCOAL NETO** **PT**

**CARLOS MANUEL SANTOS SILVA** **PT**

(74) Mandatário:

**MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA  
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR  
1269-163 LISBOA** **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODO PARA A OBTENÇÃO DE UM EXTRATO RICO EM ÁCIDOS TRITERPÉNICOS A PARTIR DA CASCA DE EUCALIPTO**

(57) Resumo: A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO PARA OBTER EXTRATOS COM ELEVADOS TEORES DE ÁCIDOS TRITERPÉNICOS (ATÉ 98 %), MAIORITARIAMENTE CONSTITUÍDOS PELOS ÁCIDOS OLEANÓLICO E URSÓLICO, A PARTIR DA CASCA DE EUCALIPTO. ESTE MÉTODO ENVOLVE A EXTRAÇÃO SÓLIDO;LÍQUIDO DA CASCA COM SOLVENTES ORGÂNICOS, PREFERENCIALMENTE COM HEXANO, E O FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO ATRAVÉS DE UM TRATAMENTO SIMPLES COM UMA SOLUÇÃO ALCALINA, SEGUIDA DA SEPARAÇÃO DA FASE AQUOSA, A SUA FILTRAÇÃO, ACIDIFICAÇÃO E FINALMENTE ISOLAMENTO DA FRACÇÃO ENRIQUECIDA EM ÁCIDOS TRITERPÉNICOS ATRAVÉS DE FILTRAÇÃO, CENTRIFUGAÇÃO OU EXTRAÇÃO COM UM SOLVENTE ORGÂNICO, PREFERENCIALMENTE COM HEXANO, SEGUIDA DE REMOÇÃO DO SOLVENTE. A PRESENTE INVENÇÃO TEM APLICAÇÕES NAS INDÚSTRIAS FARMACÊUTICA, NUTRACÊUTICA, COSMÉTICA E DE ALIMENTOS FUNCIONAIS.

## RESUMO

### "MÉTODO PARA A OBTENÇÃO DE UM EXTRATO RICO EM ÁCIDOS TRITERPÉNICOS A PARTIR DA CASCA DE EUCALIPTO"

A presente invenção refere-se a um método para obter extratos com elevados teores de ácidos triterpênicos (até 98 %), maioritariamente constituídos pelos ácidos oleanólico e ursólico, a partir da casca de eucalipto. Este método envolve a extração sólido-líquido da casca com solventes orgânicos, preferencialmente com hexano, e o fracionamento do extrato bruto através de um tratamento simples com uma solução alcalina, seguida da separação da fase aquosa, a sua filtração, acidificação e finalmente isolamento da fracção enriquecida em ácidos triterpênicos através de filtração, centrifugação ou extração com um solvente orgânico, preferencialmente com hexano, seguida de remoção do solvente.

A presente invenção tem aplicações nas indústrias farmacêutica, nutracêutica, cosmética e de alimentos funcionais.

**DESCRIÇÃO**  
**“MÉTODO PARA A OBTENÇÃO DE UM EXTRATO RICO EM ÁCIDOS**  
**TRITERPÉNICOS A PARTIR DA CASCA DE EUCALIPTO”**

**Domínio da invenção**

A presente invenção refere-se a um método para obter extratos com elevados teores de ácidos triterpênicos (até 98 %), maioritariamente constituídos pelos ácidos oleanólico e ursólico, a partir da casca de eucalipto. Este método envolve a extração sólido-líquido da casca com solventes orgânicos, preferencialmente com hexano, e o fracionamento do extrato bruto através de um tratamento simples com uma solução alcalina, seguida pela separação da fase aquosa, a sua filtração, acidificação e finalmente isolamento da fração enriquecida em ácidos triterpênicos através de filtração, centrifugação ou extração com um solvente orgânico, e preferencialmente com hexano, seguida de remoção do solvente.

**Antecedentes da invenção**

Os ácidos triterpênicos pentacíclicos com estruturas do tipo lupano, ursano e oleanano, como os ácidos betulínico, ursólico, 3-acetil-ursólico, oleanólico e 3-acetil-oleanólico, apresentam uma vasta gama de efeitos biológicos e actividades farmacológicas únicas e potencialmente suscetíveis de exploração comercial (Yogeeswari e Sriram, 2005).

O ácido betulínico é conhecido por apresentar propriedades anti-VIH, anti-bacteriana, anti-malária, anti-inflamatória e antioxidante (Tolstikova et al., 2006, Yogeeswari e Sriram, 2005).

Os ácidos oleanólico e ursólico são também conhecidos por apresentarem atividade antimicrobiana (Horiuchi et al., 2007, Kuete et al., 2007, Sattar et al., 1995) anti-tumoral (Li et al., 2002), assim com propriedades anti-inflamatórias (Singh et al., 1992). Adicionalmente, o ácido oleanólico revelou atividades antialérgicas e anti-VIH (Sultana e Ata, 2008) e o ácido ursólico é um composto supressivo útil para o tratamento da artrite reumatóide com baixo risco de problemas gástricos (Kang et al., 2008).

O interesse em compostos bioativos naturais para aplicações farmacêuticas, nutracêuticas, cosméticas e em alimentos funcionais promoveu o desenvolvimento de vários métodos para a obtenção de extratos vegetais enriquecidos nos ácidos triterpênicos acima referidos. Diversas partes morfológicas de plantas têm sido descritas como potenciais fontes destes compostos naturais tais como, por exemplo, folhas e casca de abeto (RU 2108803), folhas de diospireiro (CN 101538309), cascas de maçã (EP 1250852, EP 1161879), folhas de oliveira (WO2005075614), folhas de nespereira (US 2009275778), e casca de bétula (WO 2005047304). As metodologias referidas para a obtenção de extratos enriquecidos em ácidos triterpênicos envolvem a extração dos substratos vegetais com sistemas de solventes orgânicos (ex. etanol, acetado de etilo, éter de petróleo, acetona, hexano, clorofórmio, éter metilbutílico, benzeno, xilenos, entre outros), seguida por procedimentos complexos de fracionamento baseados em extrações líquido-líquido em série (US 6740778), cromatografia em coluna (WO 03011891, CN 101538309, CN 101759756, US 2009275778), extração supercrítica em contracorrente (WO 2005075614), cristalização e recristalização (WO 2006088385, RO 122244, WO 2005047304, CN 101759756, EP 1161879), ou tratamento do

extrato orgânico com soluções alcalinas (RU 2151139, RU 2108803, RU 2108107). O uso de solventes orgânicos extremamente perigosos, nomeadamente clorofórmio, benzeno e xilenos, e procedimentos de fracionamento muito complexos, quando se pretendem elevadas purezas, encontram-se entre as principais desvantagens de algumas destas tecnologias.

A casca externa de diversas espécies de eucalipto contém elevados teores de vários ácidos triterpênicos, nomeadamente os ácidos betulónico, betulínico, 3-acetil-betulínico, ursólico, 3-acetil-ursólico, oleanólico e 3-acetil-oleanólico, e podem ser exploradas para a obtenção destes compostos bioativos (Domingues et al., 2010, Domingues et al., 2011, Freire et al., 2002).

A novidade da presente invenção assenta no uso dos resíduos de casca de eucalipto (e particularmente *Eucalyptus globulus*) para a obtenção de extratos com elevados teores (até 98%) de ácidos triterpênicos através da extração sólido-líquido com um solvente orgânico, preferencialmente *n*-hexano, seguida pelo fracionamento através do tratamento sequencial com soluções alcalinas/ácidas. O método proposto tem a vantagem de ser altamente eficiente e de fácil implementação industrial comparativamente com algumas tecnologias disponíveis.

#### **Sumário da invenção**

O objecto da presente invenção é um método para obtenção de extratos ricos em ácidos triterpênicos que compreende as seguintes etapas:

- i) secagem e moagem da casca de eucalipto;
- ii) extração da casca com um solvente orgânico;

- iii) fracionamento do extrato bruto por tratamento com uma solução aquosa alcalina;
- iv) separação da fase aquosa;
- v) clarificação por filtração;
- vi) acidificação com um ácido inorgânico ou orgânico;
- vii) isolamento da fração precipitada de ácidos triterpênicos.

Numa das realizações preferenciais o método compreende ainda uma etapa de cristalização.

Numa outra realização preferencial, a casca de eucalipto é obtida a partir de espécies de *Eucalyptus*, nomeadamente *E. globulus*, *E. urograndis*, *E. grandis x globulus*, *E. maidenii*, *E. grandis* e *E. nitens*, e a humidade residual e granulometria das amostras de casca encontram-se abaixo de 15% e 60 mesh, respetivamente.

Numa outra realização preferencial, o solvente orgânico usado é o diclorometano, *n*-heptano, *n*-hexano ou outro solvente apolar e a solução aquosa compreende no mínimo um dos seguintes componentes: hidróxidos metálicos (KOH ou NaOH) ou carbonatos metálicos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ou  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ), assim como os correspondentes hidrogenocarbonatos ou fosfatos ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  ou  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ), e também os correspondentes hidrogenofosfatos e di-hidrogenofosfatos, ou hidróxido de amónio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), sendo que o pH da solução alcalina encontra-se entre 8 e 14.

Numa outra realização preferencial, a separação é efetuada por decantação ou centrifugação.

Numa outra realização preferencial, a acidificação da fase aquosa é feita com soluções de ácidos inorgânicos, tais

como os ácidos sulfúrico, clorídrico e nítrico, e ácidos orgânicos, tais como os ácidos acético e propiônico, e o pH da solução ácida encontra-se entre 1 e 5.

Outro objeto da presente invenção são extratos obtidos através do método descrito acima, em que o teor em ácidos triterpênicos está compreendido na gama de 93-98%.

Outro objeto da presente invenção é a utilização dos extratos descritos acima, em que são utilizados na indústria de produtos farmacêuticos, de nutracêuticos, de cosméticos e de alimentos funcionais.

#### **Descrição das figuras**

Figura 1 - Etapas do método para a obtenção de extratos enriquecidos em ácidos triterpênicos, a partir das cascas de espécies de *Eucalyptus*.

Figura 2 - Cromatograma de GC-MS do extrato enriquecido em ácidos triterpênicos obtido usando a presente metodologia. (IS: padrão interno).

#### **Descrição detalhada da invenção**

A presente invenção refere-se a um método para obtenção de extratos enriquecidos em ácidos triterpênicos a partir da casca de espécies de *Eucalyptus*, delineado na Fig. 1.

O método compreende quatro etapas principais:

- (1) secagem e moagem da casca;
- (2) extração sólido-líquido dos resíduos de casca com um solvente orgânico, preferencialmente com *n*-hexano;

- (3) fracionamento deste extrato bruto por tratamento com uma solução aquosa alcalina, seguida pela separação da fase aquosa, a sua filtração e acidificação e, finalmente,
- (4) isolamento da fracção sólida enriquecida em ácidos triterpénicos através de filtração, centrifugação ou extração com solventes orgânicos apolares, preferencialmente hexano, seguida de remoção do solvente.

Por fim, este processo pode ainda compreender uma etapa de cristalização.

O resultado deste processo é um pó esbranquiçado com um teor em ácidos triterpénicos de cerca de 93-98%.

A casca usada como matéria-prima pode ser obtida a partir de diferentes espécies de *Eucalyptus*, nomeadamente, *E. globulus*, *E. urograndis*, *E. grandis x globulus*, *E. maidenii*, *E. grandis* e *E. nitens*, entre outros. Pode ser usada biomassa fresca ou caduca, mas deve ser preferencialmente seca e moída antes da extração com solvente. As etapas de secagem e moagem incluem metodologias conhecidas tais como liofilização, secagem ao ar, secagem com ar quente, e quaisquer moagens mecânicas tais como, por exemplo, moagens com lâminas, facas ou martelos, respetivamente. A humidade residual e granulometria das amostras de casca utilizadas neste processo encontram-se abaixo de 15% e 60 mesh, respetivamente.



O solvente usado para a extração inclui solventes apolares, preferencialmente *n*-hexano. Esta operação pode ser executada por procedimentos convencionais tais como maceração, extração sob refluxo, Soxtec, Soxhlet, extração acelerada por solvente, ou qualquer outra técnica de extração sólido-líquido.

O extrato bruto orgânico é seguidamente tratado com uma solução aquosa alcalina, até pH entre 8 e 14, preferencialmente de NaOH ou KOH, ou carbonatos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ou  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) assim como os correspondentes hidrogenofosfatos, ou fosfatos ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  ou  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) e também os correspondentes hidrogenofosfatos e di-hidrogenofosfatos, ou o hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), para promover a conversão dos ácidos triterpênicos nos correspondentes sais e a sua respetiva migração para a fase aquosa. A separação da fase orgânica é efetuada por decantação ou por qualquer outra técnica de separação líquido-líquido, tal como por centrifugação.

A fase aquosa é filtrada por métodos convencionais e acidificada até  $\text{pH} < 3$ , preferencialmente com ácidos inorgânicos tais como os ácidos sulfúrico, clorídrico e nítrico, e soluções de ácidos orgânicos, tais como os ácidos acético e propiônico.

Os ácidos triterpênicos precipitados podem finalmente ser isolados por extração com um solvente orgânico, filtração ou centrifugação.

### **Exemplos**

Daqui em diante, a presente invenção é descrita em mais detalhe e especificamente com referência aos Exemplos, que todavia não pretendem limitar a presente invenção.

### Extração Sólido-Líquido da casca externa

Aproximadamente 100 g de casca externa de *Eucalyptus globulus* foram secos ao ar, à temperatura ambiente, para produzir aproximadamente 70 g de casca seca com menos de 10% de humidade em peso, e de seguida moídos de forma a passar por um crivo de 2 mm.

A extração da casca moída seca foi efetuada num sistema Soxhlet com 1 L de *n*-hexano como solvente, à temperatura de refluxo. A extração durou seis horas.

A evaporação, num evaporador rotativo sob vácuo, e a secagem do extrato bruto em *n*-hexano acima referido rendeu 1.1 g (rendimento de 1.8%, m/m) de um resíduo bruto seco e verde. O teor total em triterpenóides deste resíduo foi de 49.1% em massa, contendo 14.4% de ácido ursólico, 12.8% de ácido 3-acetil-ursólico, 5.7% de ácido oleanólico, 5.3% de ácido betulínico, 5.1% de ácido betulónico e 3.5% de ácido 3-acetil-oleanólico, sendo os remanescentes 2.4% outros compostos triterpénicos.

### Fracionamento dos extratos da casca externa

O extrato bruto em 1 L de *n*-hexano foi extraído com 1 L de solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 0.1 M. A fase aquosa foi separada da fase do *n*-hexano por decantação, e filtrada sob vácuo através de discos de membranas de nylon com porosidade 0.45 µm, sendo obtida uma solução límpida. A referida solução foi acidificada com uma solução aquosa com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2 M até pH<3, resultando numa suspensão de precipitado esbranquiçado. O precipitado foi filtrado sob vácuo, lavado com 1 L de água destilada até pH neutro, e seco a 105 °C durante 3 h.

Foram obtidos 407 mg de um pó esbranquiçado, que consiste numa soma de ácidos triterpênicos, com um teor mínimo de 97,8% em massa composto por: 52.4% de ácido ursólico, 17.3% de ácido oleanólico, 13.2% de ácido betulónico, 9.7% de ácido betulínico, e 5.2% de outros ácidos triterpênicos (Fig. 2).

A caracterização qualitativa e quantitativa do extrato bruto em *n*-hexano e das frações enriquecidas em ácidos triterpênicos, produzidos de acordo com a invenção, foi realizada através da aplicação da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS).

### **Referências**

Andreea, N.R., Lenuta, Z., Liliana, M., Gheorghe, T., Maria, T., Liudmila, T., 2006. Bioactive complex of triterpene acids, its production process and medicinal products with therapeutical uses. WO 2006088385.

Domingues, R. M. A., Sousa, G. D. A., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Pascoal Neto, C., 2010. *Eucalyptus globulus* Biomass Residues from Pulping Industry as Source of High Value Triterpenic Compounds. *Industrial Crops and Products* 31, 65-70.

Domingues, R. M. A., Sousa, G. D. A., Silva, C. M., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Pascoal Neto, C., 2011. High Value Triterpenic Compounds from the outer barks of several *Eucalyptus* species cultivated in Brazil and in Portugal, *Industrial Crops and Products* 33, 158-164.

EHLKHA AOOT, 2000. Method of preparing biologically active sum of triterpenic acids. RU 2151139.

Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Pascoal Neto, C., Cavaleiro, J.A.S., 2002. Lipophilic Extractives of the Inner and Outer Bark of *Eucalyptus globulus*" *Holzforschung* 56, 372-379.

Horiuchi, K., Shiota, S., Hatano, T., Yoshida, T., Kuroda, T., Tsuchiya, T., 2007. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRIE). *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 30, 1147-1149.

Ioan, M., Lenu, Z., Maria, T., Andreea, N.R., Liudmila, T., 2009. Process for preparing pure oleanolic acid from herba *Viscum album*. RO 122244.

Kang, S.Y., Yoon, S.Y., Roh, D.H., Jeon, M.J., Seo, H.S., Uh, D.K., Kwon, Y.B., Kim, H.W., Han, H.J., Lee, H.J., Lee, J.H., 2008. The anti-arthritic effect of ursolic acid on zymosan-induced acute inflammation-induced chronic arthritis models and adjuvant. *J. Pharm. Pharmacol.* 60, 1347-1354.

Klimov, V.P., Shubin, A.N., Chekurov, V.M., Druganov, A.G., Raldugin, V.A., 1998a. Method of preparing triterpenic acid biologically active content. RU 2108803.

Klimov, V.P., Shubin, A.N., Chekurov, V.M., Druganov, A.G., Raldugin, V.A., 1998b. Production method for a biologically active totality content of triterpene acids salts. RU 2108107.

Kolomitsyna, O., Krasutsky, P., A., Kacharov, O., D., Kolomitsyn, I., V., Krasutskyy, D., A, 2005. Method for obtaining natural products from plant material. WO 2005047304.

Kuete, V., Eyong, K.O., Folefoc, G.N., Beng, V.P., Hussain, H., Krohn, K., Nkengfack, A.E., 2007. Antimicrobial activity of the methanolic extract and of the chemical constituents isolated from *Newbouldia laevis*. *Pharmazie*. 62, 552-556.

Kumar, M.P., Manjusree, P., Pada, S.B., 2003. A process for the isolation of betulinic acid from *Nelumbo nucifera* Gaertn rhizomes. WO 03011891.

Li, J., Guo, W.J., Yang, Q.Y., 2002. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World J. Gastroenterol.* 8, 493-495.

Liang, C., Liu, Z., Chen, L., Wei, C., Chen, Y., Lu, G., 2009. Method for extracting ursolic acid from persimmon leaf by composite countercurrent method. CN 101538309.

Lin, T., 2010. Method for preparing ursolic acid from rosemary. CN 101759756.

Naoaki, Y., Tsutomu, S., Chihiro, M., 2009. Process for preparing high purity corosolic acid and high purity ursolic acid. US 2009275778.

Noriyasu, K., Gou, S., 2003. Method for the preparation of oleanolic acid and/or maslinic acid. US 6740778.

Sattar, A.A., Bankova, V., Kujungiev, A., Galabov, A., Ignatova, A., Todorova, C., Popov, S., 1995. Chemical-

Composition and Biological-Activity of Leaf Exudates from Some Lamiaceae Plants. *Pharmazie*. 50, 62-65.

Schmid, U., Schweitzer, E., Rosier, O.E., Fritsche, J., 2002. Concentrate of triterpenes. EP 1250852

Schweitzer, E., Schmid, U., Pierce, J.H., Van Straalen, J.N.M., Beindorff, C., Cain, F.W., 2001. Blends of ursolic acid/oleanolic acid. EP 1161879.

Singh, G.B., Singh, S., Bani, S., Gupta, B.D., Banerjee, S.K., 1992. Anti-inflammatory activity of oleanolic acid in rats and mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 44, 456-458.

Sultana, N., Ata, A., 2008. Oleanolic acid and related derivatives as medicinally important compounds. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 23, 739-756.

Tolstikova, T.G., Sorokina, I.V., Tolstikov, G.A., Tolstikov, A.G., Flekhter, O.B., 2006. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: I. Natural lupane derivatives. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 32, 37-49.

Tomas, A.V., J, S.R.F., Javier, T.G.J., Elena, I.E., Augusto, L.R., Alejandro, R.R., Carmen, P.C.M., Angeles, G.G.M., Mirella, R.R., J, R.R.G., 2005. Method of obtaining high-value-added compounds from olive leaves. WO 2005075614.

Yogeeswari, P., Sriram, D., 2005. Betulinic acid and its derivatives: A review on their biological properties. *Curr. Med. Chem.* 12, 657-666.

As reivindicações seguintes definem uma forma de realização particular da invenção.

Lisboa, 09 de Agosto de 2013

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para a obtenção de um extrato rico em ácidos triterpênicos, caracterizado por compreender as etapas seguintes:

- i) secagem e moagem da casca de eucalipto;
- ii) extração da casca com um solvente orgânico;
- iii) fracionamento do extrato bruto por tratamento com uma solução aquosa alcalina;
- iv) separação da fase aquosa;
- v) clarificação por filtração;
- vi) acidificação com um ácido inorgânico ou orgânico;
- vii) isolamento da fracção precipitada de ácidos triterpênicos.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender ainda uma etapa de cristalização.

3. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a casca de eucalipto ser obtida a partir de espécies de *Eucalyptus*, nomeadamente, *E. globulus*, *E. urograndis*, *E. grandis x globulus*, *E. maidenii*, *E. grandis* e *E. nitens*.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por na etapa i) a humidade residual e a granulometria das amostras de casca serem inferiores a 15% e 60 mesh, respetivamente.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por na etapa ii) o solvente orgânico ser diclorometano, *n*-heptano, *n*-hexano ou outros solventes apolares.



6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a solução alcalina da etapa iii) poder ser uma solução aquosa compreendendo no mínimo um dos: hidróxidos metálicos (KOH ou NaOH) ou carbonatos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ou  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ), assim como os correspondentes hidrogenocarbonatos ou fosfatos ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$  ou  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ), e também os correspondentes hidrogenofosfatos e di-hidrogenofosfatos, ou o hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ).

7. Método de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por o pH da solução alcalina na etapa iii) estar compreendido entre 8 e 14.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a separação na etapa iv) ser efetuada por decantação ou centrifugação.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado por a acidificação da fase aquosa na etapa vi) ser feita com soluções de ácidos inorgânicos, tais como os ácidos sulfúrico, clorídrico e nítrico, e soluções de ácidos orgânicos, tais como os ácidos acético e propiônico.

10. Método de acordo com a reivindicação anterior caracterizado por o pH da solução ácida estar compreendido entre 1 e 5.

11. Extratos obtidos através do método descrito nas reivindicações anteriores, caracterizados por a pureza da fração de ácidos triterpênicos purificados estar compreendida na gama de 93-98%.

12. Utilização dos extratos descritos na reivindicação anterior, caracterizada por aplicações em produtos farmacêuticos, nutracêuticos, cosméticos e alimentos funcionais.

Lisboa, 06 de Setembro de 2013

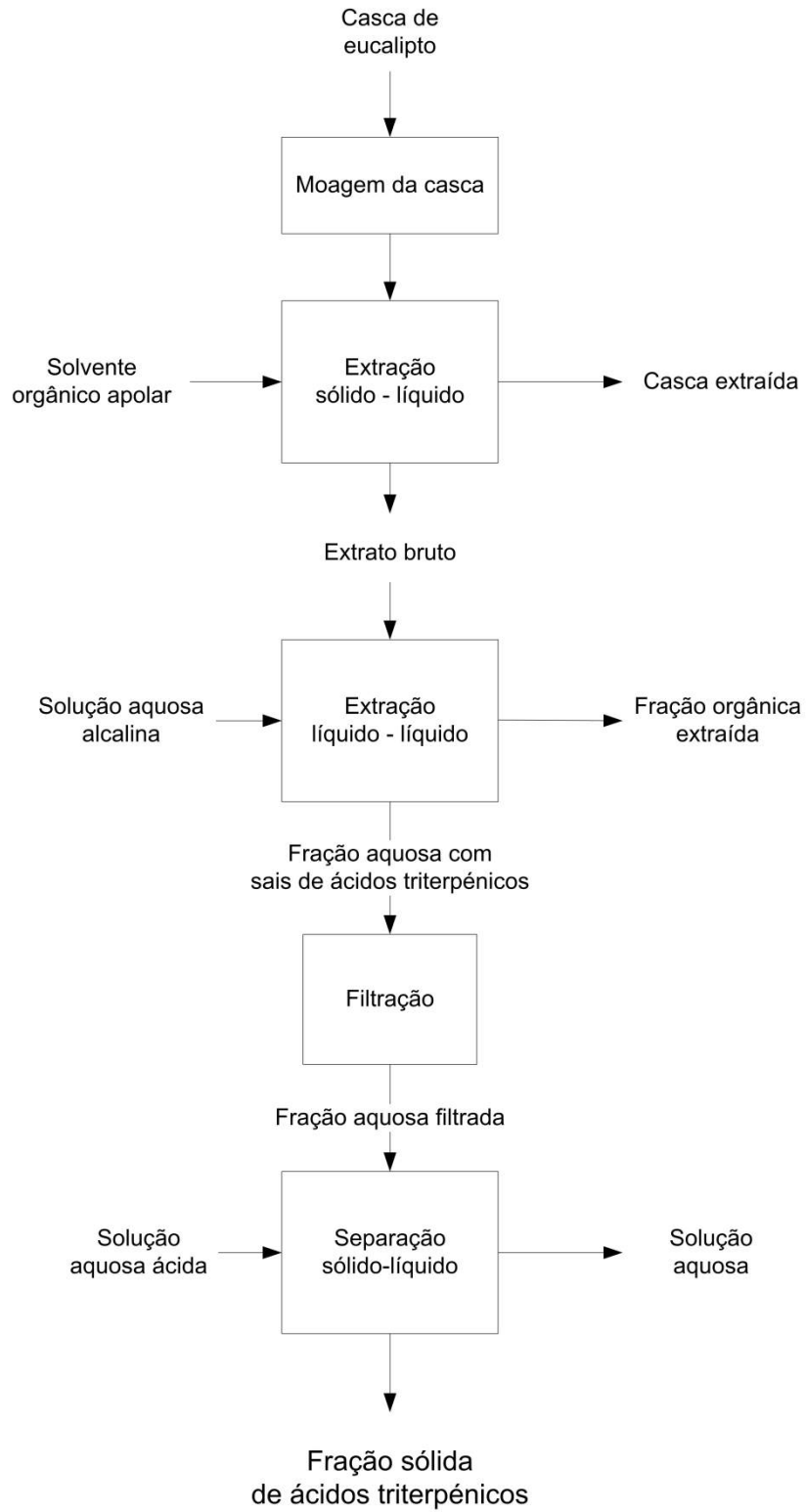
**Figuras**

Figura 1

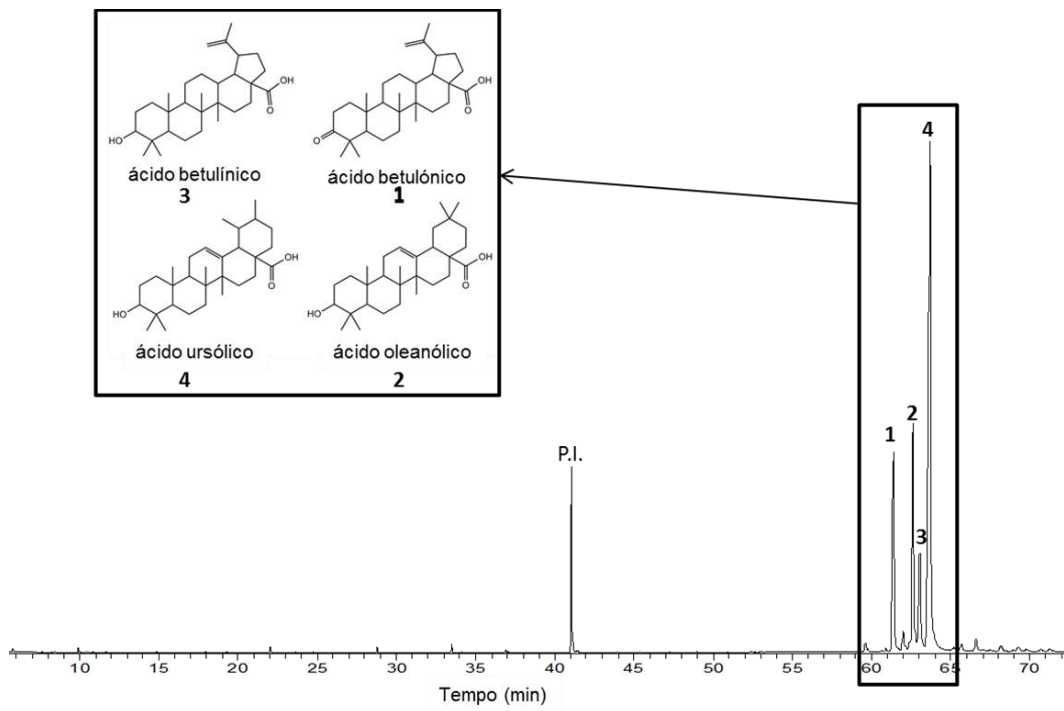


Figura 2

**Relatório de Pesquisa de Portugal**

Ref. do pedido:  
**106278**

<b>CLASSIFICAÇÃO DA MATÉRIA</b>		
A61K36/61; A61K8/97; B01D11/02; B01D11/04 De acordo com a Classificação Internacional de Patentes		
<b>DOCUMENTAÇÃO E BASES DE DADOS ELETRÔNICAS PESQUISADAS</b>		
GOOGLE, ESPACENET, WPI, EPODOC, XPESP, XPESP2, SGPI		
<b>DOMÍNIOS TÉCNICOS PESQUISADOS</b>		
A61K36/00/IC/EC/FT/C; A61K8/97/IC/EC/FT/C De acordo com a Classificação Internacional de Patentes		
<b>DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES</b>		
Categoria*	Citação do documento, com indicação, sempre que apropriado, das passagens relevantes	Relevante para a reivindicação
X	<b>DOMINGUES R.M.A et al</b> ; "High value triterpenic compounds from the outer barks of several Eucalyptus species cultivated in Brazil and in Portugal"; Industrial Crops and Products 33; 2001-10-04; 158-164; XP027537433 [Abstract; página 159, coluna lado direito, linhas 9-10, pontos 2.1-2.4]	<b>1-10</b>
X	<b>DOMINGUES R.M.A et al</b> ; "Eucalyptus biomass residues from agro-forest and pulping industries as source of high-value triterpenic compounds"; Cellulose Chem. Technol., 45 (7-8), 475-481; 2011-06-08. Retirado da internet em 08-10-2013 <a href="http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT45,7-8(2011)/p.475-481.pdf">http://www.cellulosechemtechnol.ro/pdf/CCT45,7-8(2011)/p.475-481.pdf</a> [Tabela 2; abstract; página 476, coluna lado esquerdo, linhas 32-34]	<b>11-12</b>
A	<b>DOMINGUES R.M.A et al</b> ; " <i>Eucalyptus globulus</i> biomass residues from pulping industry as a source of high value triterpenic compounds"; Industrial Crops and Products 21; 2010; 65-70; XP026777147	<b>1-12</b>
* Categorias dos documentos citados:		
A Estado da técnica;	T Princípio ou teoria subjacente à invenção;	
X Documento de particular relevância quando considerado isoladamente;	& Documento membro da mesma família de documentos de patente;	
Y Documento de particular relevância quando combinado com um ou mais deste tipo de documentos;	P Documento publicado antes da data de pedido mas depois da data de prioridade;	
E Pedido de patente anterior publicado na mesma data ou em data posterior à do pedido;	D Documento citado no pedido;	
L Documento citado por qualquer outra razão;	O Documento que se refere a uma divulgação oral, uso, exibição ou qualquer outro meio.	
Data do termo da pesquisa	Técnico examinador:	
2013.10.08	Vanessa Fatal	Assinatura
	Telefone:218818166	
Data de elaboração do Relatório de Pesquisa	INPI, Campo das Cebolas, 1149-035 LISBOA	
2013.10.09	Fax: 21 886 98 59	
<b>Nota:</b> Esta pesquisa refere-se aos elementos apresentados até à data da elaboração deste relatório de pesquisa. Quaisquer elementos que possam ter sido entregues posteriormente a esta data, não foram objeto de apreciação técnica.		

**Relatório de Pesquisa de Portugal**Ref. do pedido:  
**106278**

<b>DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES (Continuação)</b>		
<b>Categoria*</b>	<b>Citação do documento, com indicação, sempre que apropriado, das passagens relevantes</b>	<b>Relevante para a reivindicação</b>
<b>A</b>	<b>US20060140883A1</b> (COLGATE-PALMOLIVE COMPANY) 2006-06-29 [Todo o documento]	<b>1-12</b>
<b>A</b>	<b>FR2802818A1</b> (BERNARD, P; POURRAT, H. e BERTHON, J.) 2001-06-29 [Todo o documento]	<b>1-12</b>

## Anexo ao Relatório de Pesquisa de Portugal

Informação sobre os membros da família de documentos de patente

Ref. do pedido:

**106278**

Documento de patente citado no relatório	Data de publicação	Membro(s) da família	Data de publicação
<b>US20060140883A1</b>	<b>2006-06-29</b>	AR052855A1 WO2006071674A2 WO2006071674A3	2007-04-04 2006-07-06 2006-12-21
<b>FR2802818A1</b>	<b>2001-06-29</b>	FR2802818 B1	2002-08-30