



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 103 205**

⑫ Número de solicitud: 9502393

⑤① Int. Cl.⁶: C07H 3/02
C13K 13/00

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫② Fecha de presentación: **04.12.95**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.97**

Fecha de concesión: **03.03.98**

⑫⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.04.98**

⑫⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.04.98

⑦③ Titular/es: **Universidad de Murcia**
Avda. Teniente Flomesta, s/n
Edif. Convalecencia 3ª planta
30003 Murcia, ES

⑦② Inventor/es: **Cambroneró Sánchez, Miguel y**
García Ruiz, Pedro Antonio

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤④ Título: **Procedimiento para la obtencion de L-ramnosa de alta pureza a partir de ramnoglucósidos.**

⑤⑦ Resumen:

Procedimiento para la obtención de L-ramnosa de alta pureza a partir de ramnoglucósidos.

Comprende: (a) formación de un acetal de un ramnoglucósido sobre el grupo glicólico de L-ramnosa; (b) ruptura oxidativa del agrupamiento 1,2-diólico libre con un agente oxidante; (c) hidrólisis del producto obtenido sin afectar al agrupamiento acetal de la L-ramnosa; (d) hidrólisis del acetal para obtener L-ramnosa libre.

El procedimiento tiene importante repercusión industrial dado que permite obtener L-ramnosa libre fácilmente purificable y que los subproductos pueden aprovecharse industrialmente.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 103 205 B1

DESCRIPCION

Procedimiento para la obtención de L-ramnosa de alta pureza a partir de ramnoglucósidos.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de la obtención de L-ramnosa por métodos químicos.

10 Más concretamente, la presente invención proporciona un procedimiento para la obtención de L-ramnosa de alta pureza a partir de ramnoglucósidos.

Estado de la técnica anterior a la invención

15 La L-ramnosa es un producto de gran interés industrial que resulta de difícil aislamiento y purificación dado que en sus fuentes naturales siempre está presente la D-glucosa que reduce considerablemente su valor comercial.

20 Hasta la fecha se conocen diversos procedimientos para la obtención de L-ramnosa, monosacárido ampliamente distribuido en la naturaleza y que se encuentra fundamentalmente combinado en glicósidos y en polisacáridos.

25 Únicamente a partir de ciertos glicósidos como la Quercitina (W. Wolfrom, Methods in Carbohydrate Chemistry, vol. I pag. 202. Academic Press, New York 1962) puede obtenerse por cristalización de sus hidrolizados, L-ramnosa libre de otras aldohexosas pero estos procedimientos resultan industrialmente inviables debido a la rareza y precio de los antedichos glicósidos.

30 Los métodos industriales de obtención de L-ramnosa a partir de fuentes naturales de interés económico tienen en común la etapa inicial de hidrólisis a través de diferentes tratamientos ácidos (orgánicos, inorgánicos, resinas, etc) que liberan al monosacárido L-ramnosa del glicósido o del polisacárido de partida, obteniéndose hidrolizados que contienen otras aldohexosas de difícil separación de L-ramnosa. Dichos métodos difieren unos de otros fundamentalmente en el procedimiento de purificación, según el cual pueden clasificarse en dos grandes grupos:

35 Primero.- *Aislamiento mediante las técnicas cromatográficas habituales.* Estas técnicas encarecen el producto final tanto más cuanto mayor sea la pureza deseada hasta hacerlas económicamente inviables, por cuanto exigen un alto coste de instalación y tienen una fuerte limitación en su producción a escala industrial.

40 Segundo.- *Eliminación de las otras aldohexosas (especialmente D-Glucosa) mediante microorganismos que las consumen selectivamente y enriquecen el hidrolizado en L-ramnosa.* Este grupo de procedimientos permite obtener L-ramnosa mediante cristalización, pero el grado de pureza que se logra es bajo ya que además de contener restos de las otras aldohexosas se incorporan otros contaminantes propios del cultivo bacteriano.

45 A pesar de todos estos intentos, la L-ramnosa obtenida adolece del alto grado de pureza que sería deseable tanto a nivel industrial como comercial.

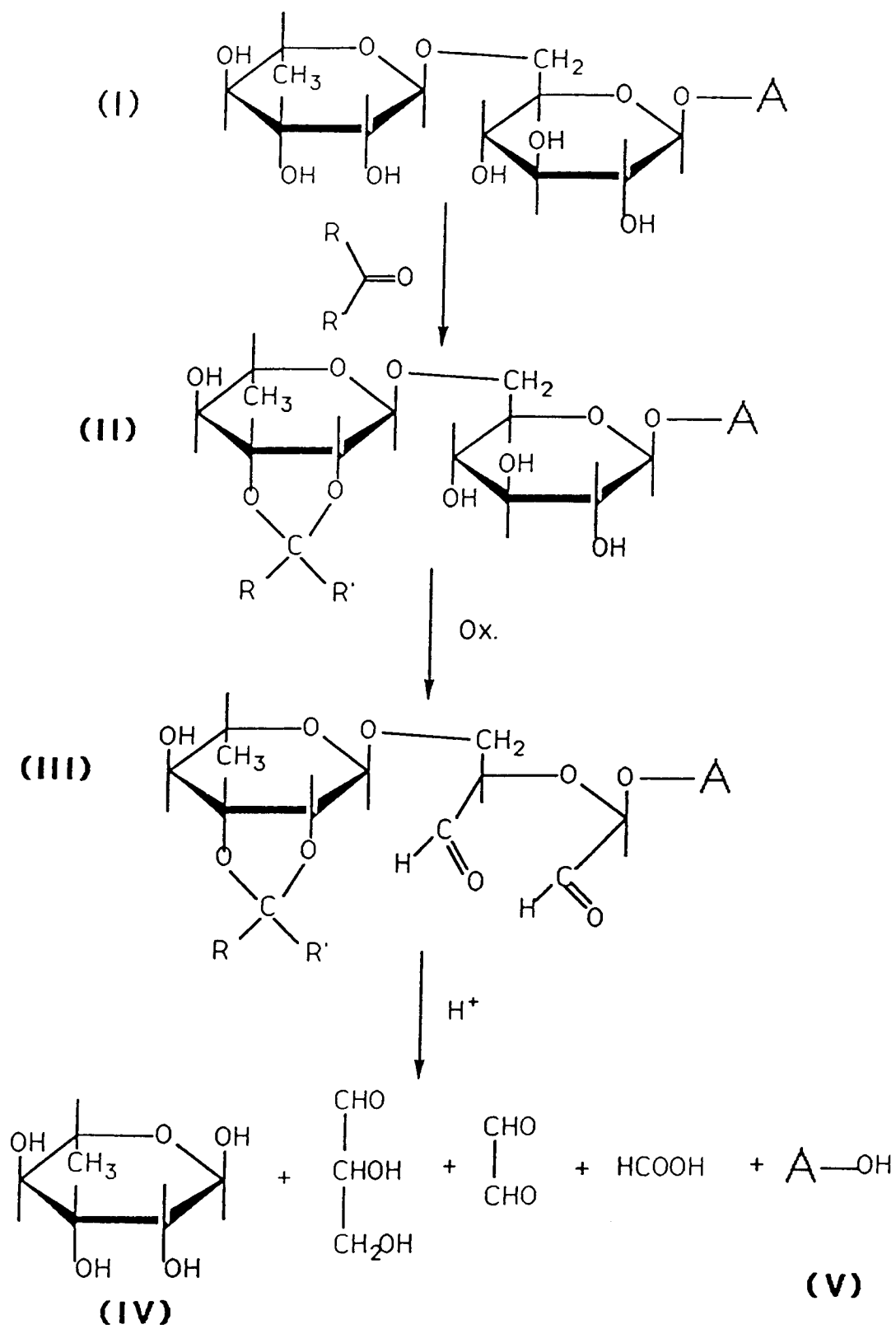
50 Los inventores de la presente solicitud, han conseguido poner a punto un procedimiento químico que permite la obtención de L-ramnosa de alta pureza partiendo de ramnoglucósidos.

Descripción detallada de la invención

55 La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a un procedimiento para la obtención de L-ramnosa de alta pureza.

En el procedimiento de la invención se utiliza la formación de un acetal en un ramnoglucósido, como material de partida, para proteger la unidad L-ramnosa frente a la ruptura oxidativa de glicoles con un oxidante químico o electroquímico.

60 En el esquema siguiente, se explica con detalle el procedimiento de la invención



Los productos de partida son ramnoglucósidos (por ejemplo hesperidina (I)), que por la adecuada disposición del resto glicosídico posibilita la formación selectiva de acetales sobre el grupo glicídico de L-ramnosa. Dichos acetales (II) se utilizan para proteger a L-ramnosa frente a procesos de ruptura oxidativa de 1,2 dioles, de tal forma que al tratar un acetal con un oxidante de glicoles (por ejemplo $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_4$) se provoca la degradación de la molécula de D-glucosa (III) que por hidrólisis conduce a ácido fórmico, glioxal y D-gliceraldehído sin que el acetal de L-ramnosa ni el flavonoide se vean afectados por dicho reactivo. De esta forma en la posterior etapa de hidrólisis del acetal se obtiene L-ramnosa libre de D-glucosa, fácilmente purificable lo que permite obtener un producto final (L-ramnosa) de extraordinaria calidad e interés comercial. Los productos obtenidos han sido identificados por las técnicas cromatográficas y espectroscópicas habituales.

Tanto los productos de oxidación de D-glucosa (ácido fórmico, glioxal y D-gliceraldehído) como aquéllos que permanecen inalterados durante la reacción, L-ramnosa (IV) y hesperetina (V), pueden ser aprovechados comercialmente por lo que el procedimiento puede resultar muy interesante desde el punto de vista de su aplicación industrial.

Entre los reactivos para la formación de acetales pueden mencionarse: formaldehído, acetaldehído, propionaldehído, glioxal, benzaldehído, acetona, benzofenona y metil etil cetona.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1

Obtención de L-ramnosa a partir de hesperidina

1.1.- Obtención del isopropilidenacetal de hesperidina

Se disolvieron 0,01 moles de hesperidina comercial de 94 % de pureza en 0,25 moles de dimetil formamida, posteriormente se añadieron 0,8 moles de acetona, apareciendo un precipitado correspondiente a impurezas de pectina que se eliminó mediante filtración. A continuación se añadieron 0,01445 moles de ácido sulfúrico (2 % respecto a la masa de reacción total). La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 48 horas en matraz de vidrio con trampa de cloruro cálcico, período tras el cual se añadió la cantidad equivalente de NaHCO_3 hasta neutralización.

La evolución de la reacción fue controlada mediante análisis de HPLC de las muestras obtenidas a diversos intervalos de tiempo.

Por otra parte fueron realizados diversos ensayos encaminados a determinar las condiciones óptimas de reacción y favorecer el desplazamiento del equilibrio, modificando la relación molar hesperidina/acetona (1/20, 1/40 y 1/80) y el % de H_2SO_4 (0,5, 2,0 y 4,0) respecto de la masa total de reacción, obteniéndose los siguientes resultados:

	Hesp/Acetona	% H_2SO_4	n° Horas	Conv.	Select.	Rto
Ensayo n° 1	1/40	0.5	12	49.4	93.3	46.1
			24	62.5	93.6	58.5
Ensayo n° 2	1/40	2.0	12	67.3	90.6	61.0
			24	68.5	89.5	61.3
Ensayo n° 3	1/80	2.0	12	76.4	88.3	67.0
			24	76.9	87.0	66.9
Ensayo n° 4	1/80	4.0	12	79.0	82.5	65.0
			24	79.5	82.0	65.2

Como se puede comprobar la reacción es relativamente rápida ya que en el término de unas 12 horas se alcanza el equilibrio y por otro lado se observa que resulta difícil forzar el desplazamiento tanto mediante exceso de acetona (compárense los resultados del ensayo n° 2 y 3, y obsérvese que para obtener un incremento de tan solo 8 puntos en la conversión se ha de duplicar la, ya de por sí elevada, relación acetona hesperidina) como aumentando la cantidad del agente deshidratante, con el serio inconveniente, en este último caso, de que se pierde selectividad e incluso rendimiento.

1.2.- *Oxidación del glicol*

Una vez realizada la neutralización y asegurado un medio de reacción débilmente básico, se añadió la cantidad equivalente de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_4$ (0,04 moles) necesaria para la oxidación. una vez finalizada la reacción se eliminaron las sales de plomo mediante filtración.

Esta etapa es muy rápida (2-3 horas) y se da en un elevado rendimiento 90-95 %. Es muy importante que, durante toda la reacción, el pH del medio sea débilmente básico para evitar reacciones de hidrólisis del acetal que desprotegerían al grupo glicólico de la ramnosa quedando expuesto a la acción del agente oxidante y por tanto provocarían pérdidas en el rendimiento.

1.3.- *Hidrólisis del acetal*

Sobre el mismo matraz se añadió una disolución (100 ml) de HCl 10 % y se mantuvo a reflujo durante 3 horas. La reacción de hidrólisis se produjo con elevados rendimientos próximos al 100 %.

Posteriormente se neutralizó con NaHCO_3 y se eliminaron los disolventes hasta sequedad, el sólido remanente conteniendo entre otros productos, gran cantidad de sales, se lavó con isopropanol para extraer L-ramnosa, finalmente se eliminó el isopropanol para cristalizar L-ramnosa en disolución etanólica, obteniéndose 0,98 gr (0,0059 moles) de L-ramnosa de elevada pureza (99 %), lo que supone un rendimiento molar del 59 % sobre el valor teórico.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de L-ramnosa de alta pureza a partir de ramnoglucósidos, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

5

- a) formación de un acetal de un ramnoglucósido sobre el grupo glicólico de L-ramnosa;
- b) ruptura oxidativa del agrupamiento 1,2-diólico libre, tratando el producto de la etapa anterior con un agente oxidante, para provocar la degradación de la molécula de D-glucosa del ramnoglucósido;
- 10 c) hidrólisis del producto de la etapa anterior produciéndose ácido fórmico, glioxal y D-gliceraldehído, sin que se afecten por dicha hidrólisis ni el acetal de la L-ramnosa ni el flavonoide;
- d) hidrólisis del acetal para obtener la L-ramnosa libre de la D-glucosa.

15

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el reactivo empleado para la formación del acetal está seleccionado del grupo formado por formaldehído, acetaldehído, propionaldehído, glioxal, benzaldehído, acetona, benzofenona y metil etil cetona.

20

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el reactivo empleado para la oxidación es tetraacetato de plomo.

25

30

35

40

45

50

55

60



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 103 205
⑫ N.º solicitud: 9502393
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 04.12.95
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.⁶: C07H3/02, C13K13/00

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US-4772334-A (HATANAKA, M. et al.) 20.09.88 * todo el documento *	1-3
A	EP-0314959-A (SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A.) * todo el documento *	1-3

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe 01.07.97	Examinador A. Maquedano Herrero	Página 1/1
--	------------------------------------	---------------