

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 114**

51 Int. Cl.:

A61K 36/28 (2006.01)

A61K 31/7008 (2006.01)

A61K 36/23 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06742885 .4**

96 Fecha de presentación: **12.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1890709**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2008**

54 Título: **PRODUCCIÓN DE GLUCOSAMINA A PARTIR DE ESPECIES VEGETALES.**

30 Prioridad:
13.05.2005 EP 05104041

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.03.2012

73 Titular/es:
NESTEC S.A.
AVENUE NESTLÉ 55
1800 VEVEY, CH

72 Inventor/es:
PETIARD, Vincent;
MICHAUX, Stéphane y
COURTOIS, Didier

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 376 114 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción de glucosamina a partir de especies vegetales

- 5 La presente invención, se refiere a un procedimiento que conduce a primeras materias vegetales, las cuales contienen unos niveles de glucosamida iguales o mayores a un porcentaje del 0,5% (en peso) de materia seca.

Antecedentes y trasfondo de la invención

10 Uso de glucosamina

El uso de la glucosamina pura, en el tratamiento de las enfermedades de las articulaciones, se encuentra ampliamente descrita en la literatura de las patentes, así como en la literatura científica, usualmente, en combinación con otros compuestos o extractos procedentes de varias fuentes naturales. La glucosamina pura, se añade como clorhidrato de glucosamina o sulfato de glucosamina, y procede de la hidrólisis de crustáceos. Así, por ejemplo, la publicación de patente internacional O 2000 / 0 074 696, describe "composiciones herbáceas que comprenden glucosamina y Tripterygium wifordii, Ligustrum lucidum y / o Recibe schmiditii, para el tratamiento de la inflamación o la degeneración de las articulaciones de los tejidos de las articulaciones, tales como, por ejemplo, la artritis", en donde, la glucosamina pura, se mezcla con una preparación de plantas. Otras patentes, se refieren a composiciones de hidratos de carbono de plantas (vegetales), como suplementos dietéticos (documentos de patente europea EP 1 172 ó EP 923 382), en donde, la glucosamina, tiene como origen la quitina, a saber, otra vez, a partir de la hidrólisis de los crustáceos.

25 El uso de la glucosamina como agente anti-osteoartritis, se ha desarrollado de una forma intensiva, durante la última década. Se sospecha que, la glucosamina, es el único compuesto activo, en las enfermedades de las articulaciones, tales como la osteoartritis (hasta muy recientemente, únicamente un tratamiento sintomático, tal como el consistente en fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, se había manifestado, según se pretende, como siendo eficiente).

30 La glucosamina, ha manifestado, también, el prevenir o evitar, la degradación del cartilago, mediante la inhibición de las MMPs (metaloproteasas matrices), tales como las MMP1, MMP3 Y MMP13. De una forma interesante, la glucosamina, se encuentra también relacionada con el proceso de envejecimiento de la piel, el cual se ha caracterizado, principalmente, por la continua pérdida de elasticidad la pérdida de humedad. El envejecimiento de la piel, se refleja por cambios estructurales y variaciones, mayores, en la cuanto a lo referente a su constitución. De una forma mayormente notable, las pieles envejecidas, tienen menos colágeno y glicosaminoglicanos, en comparación con las pieles jóvenes, las moléculas de glicosaminoglicano producidas por la piel, incluyen al ácido hialurónico (poli (ácido d-glucurónico-n-acetil-d-glucosamina)), sulfato de condroitina y sulfato de dermatano. El ácido hialurónico, se produce en grandes cantidades, mediante las células de la piel, como respuesta a la exfoliación. El ácido hialurónico, tiene una gran capacidad para la hidratación.

40 La inhibición de la MMP-1, se encuentra relacionada con la inhibición de la degradación del poliglicano / colágeno y, así, por lo tanto, se encuentra también relacionada con el envejecimiento de la piel: la MMP-1, puede inducirse mediante UV, y está reconocida como siendo un marcador del envejecimiento de la piel. En el documento de patente estadounidense US 2002 / 119 107, la invención, se basa en la inhibición selectiva de composiciones tópicas que reivindican la MMP-1, para la protección de la piel humana, a partir de la degradación del colágeno. El documento de patente europea US 2004 / 037 901, reivindica un régimen para inhibir los signos adversos del envejecimiento cutáneo, que comprende un extracto de la planta de romero, que inhibe la expresión de metaloproteasas.

50 La glucosamina, ha mostrado mejorar, de una forma significativa, la sequedad de la piel y la exfoliación. La glucosamina, incrementa el contenido de humedad, y mejora la suavidad o exención de arrugas de la piel. Estos descubrimientos, sugieren el hecho de que, la ingesta durante un tiempo prolongado de glucosamina, es efectivo, en el incremento o mejora del contenido de humedad y de la suavidad o exención de arrugas de la piel.

55 Se ha mostrado que, un suplemento oral que contenga glucosamina, conduce a la reducción (en un porcentaje del 34%), en el número de arrugas visibles y (en un porcentaje del 34%), en el número de líneas finas en un grupo de mujeres que tomaron el suplemento. El uso de suplementos orales que contienen glucosamina, minerales, y varios compuestos antioxidantes, puede mejorar, de una forma visible, la apariencia de arrugas visibles y de líneas finas.

60 El documento de patente estadounidense US 6 413 525, describe procedimientos para una exfoliación substancial de la piel. De una forma particular, la invención, se refiere a composiciones aplicadas de una forma tópica, que contiene un aminoazúcar, en forma de N-acetilglucosamina; cuando las células de piel joven, se exponen, después de la exfoliación, éstas producen grandes cantidades de ácido hialurónico, el cual es un glicosaminoglicano, compuestos por una cadena alternada, repetitiva, de moléculas de ácido glucurónico y N-acetil-D-glucosamina, que se conoce como siendo un factor limitador de la tasa, en la producción de ácido hialurónico, en células vivientes. La aplicación tópica de glucosamina, asiste y ayuda en la producción continua de ácido hialurónico.

65

Otras composiciones de aplicación tópica que contenían N-acetil-D-glucosamina, se han dado también a conocer, por ejemplo, en la patente Japonesa JP 59 013 708 (suaviza y humedece la piel) o en la patente estadounidense US nº 5 866 142 (una composición para exfoliar la piel).

5 Origen de la glucosamina

La glucosamina, 2-amino-2-desoxi-D-glucosa, es un derivado de origen natural de la fructosa, y es un compuesto esencial de las glicoproteínas y de los proteoglicanos, importantes constituyentes éstos, de muchas proteínas eucarióticas. Éste es un componente esencial de los mucopolisacáridos y de la quitina. Los glicosaminoglicanos (mucopolisacáridos) son grandes complejos, incorporados en tejidos conjuntivos, la piel, los tendones, los ligamentos y los cartílagos.

Fuentes industriales de la glucosamina

15 La glucosamina industrial, es un compuesto puro, obtenido a partir de la hidrólisis ácida de la quitina procedente de crustáceos, un complejo derivado de la N-acetil-D-glucosamina. Como ejemplo, el documento de patente estadounidense US 6 486 307, describe un procedimiento mejorado para la hidrólisis ácida de la quitina: un procedimiento para la producción de clorhidrato de glucosamina, a partir de la quitina, procediendo a moler la quitina, convirtiéndola en una materia de tamaño muy fino, y digiriéndola con ácido clorhídrico concentrado.

20 La glucosamina, puede también producirse a partir del la hidrólisis enzimática de crustáceos. Como ejemplo de ello, la patente estadounidense US 5 998 173, describe un nuevo procedimiento, para producir, directamente, la N-acetil-D-glucosamina, a partir de la quitina, utilizando un conjunto de la familia de las enzimas de la quitinasa, para hidrolizar la quitina de los crustáceos.

25 Se han registrado también patentes, las cuales protegen los procedimientos de fermentación bacteriana, en donde, microorganismos cultivados, biosintetizan la glucosamina. A título de ejemplo, el documento de patente estadounidense US 6 372 457, describe un procedimiento y material para producir glucosamina, mediante fermentación, utilizando un microorganismo genéticamente modificado.

30 Todos estos procedimientos, se refieren a la producción de extractos glucosamina, que compiten con los extractos de crustáceos.

35 El documento de patente británica GB 649 791, se refiere a mejoras en el secado o deshidratación de la chicoria. El procedimiento en concordancia con esta patente, comprende las etapas de:

- cortar raíces de chicoria,
 - fermentar las raíces de chicoria, bajo condiciones aeróbicas, a temperaturas que exceden, substancialmente, de 70°C (las mejores temperaturas, se encuentran dentro de unos márgenes situados entre 50 y 55°C), durante un transcurso de tiempo de 7 a 8 horas, y
 - 40 - el secado rápido de la chicoria, a una temperatura de 150°C, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 30 minutos.
- Estas condiciones, no permiten generar glucosamina.

45 Carvalho et al., en una publicación titulada "producción de inulina mediante *Vermonia herbacea*, mediante la influencia de fertilización mineral y tiempo de cosecha o recolección" (Revista brasileira de botanica, 1998), mostraban que, la adición de un fertilizante, durante el cultivo de plantas que contenían inulina, no mejoraba el contenido de inulina.

50 En el documento de patente internacional WO 2005 / 053 710, se ha encontrado que, la glucosamina, puede formarse a partir de algunas primeras materias de plantas, siguiendo un procedimiento especial de secado o deshidratación, obteniéndose, a dicho efecto, contenidos de glucosamina correspondientes a valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde 150 mg hasta los 1000 mg, por kg de peso, en seco.

Resumen de la invención

55 En un primer aspecto, la presente invención, describe un nuevo procedimiento para la obtención de glucosamina, a partir de plantas, mediante la utilización de un fertilizante a base de nitrógeno, antes de cosechar el material de plantas, y sometiendo a un proceso de calentamiento. El fertilizante a base de nitrógeno, actúa como un precursor de glucosamina, con objeto de obtener primeras materias de plantas, que contienen un alto nivel de glucosamina, mayor de un porcentaje del 0,5% (5 g por kg de materia, en seco), de materia seca. La presente invención, por lo tanto, permite el alcanzar un contenido de glucosamina, en la primera materia de plantas, mucho mayor que el correspondiente al previamente descrito, en el arte correspondiente a la técnica anterior, por ejemplo, reflejado mediante el documento de patente internacional WO 2005 / 053 710. La consecuencia de ello, es que se requiere menos primera materia de plantas, o extracto de plantas, para alcanzar la dosis activa de glucosamina descrita en la literatura. Así, por lo tanto, el procedimiento, es más utilizable a escala industrial.

Los fertilizantes mencionados anteriormente, arriba, pueden añadirse, en el sector de los sistemas de cultivo hidropónico, entre pocas horas, hasta pocas semanas, antes de la cosecha del material de plantas.

Descripción detallada de la invención

5 En la presente especificación, la palabra “calentamiento” (y calentamiento “derivado”), debe entenderse como un procedimiento correspondiente a un proceso de calentamiento, en unos márgenes de temperatura comprendidos dentro de unos márgenes de 70 – 110°C, durante un transcurso de tiempo de más de 10 horas y, de una forma preferible, durante un transcurso de tiempo inferior a una semana. Este procedimiento de calentamiento, puede describirse como un procedimiento de secado. El procedimiento de secado, puede también consistir en una maceración líquida, que tiene lugar en las mismas condiciones de temperatura y de tiempo, reemplazando al procedimiento de secado.

15 En la presente especificación, por “glucosamina libre”, debe entenderse glucosamina no polimerizada.

En la presente especificación, por (gran cantidad de glucosamina”, debe entenderse el hecho de que, la cantidad de glucosamina, es mayor que trazas de glucosamina, mayor que las cantidades en el correspondiente material fresco (no secado), y mayor que cualquier contenido citado en la literatura o en las patentes. Deberá entenderse como glucosamina presente en unas cantidades mayores de un 0,5% por kg de materia seca, de primera materia.

20 En la presente invención, “planta”, y “material de plantas”, (o vegetal) se consideran como sinónimos. Por “planta”, “material de plantas” o extracto de plantas”, debe entenderse cualquier material de plantas, capaz de generar glucosamina en concordancia con el procedimiento de calentamiento de la invención, y cualquier tipo de extracto de plantas obtenido mediante cualquier procedimiento de extracción conocido por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, a partir del citado material de plantas, capaz de generar glucosamina, en concordancia con el procedimiento de calentamiento de la invención. Así, por ejemplo, una planta que comprende una cierta cantidad de glucosamina, puede ser un material de plantas, secado o rehidratado, que haya seguido el procedimiento de la invención. Un extracto de planta que comprenda una cierta cantidad de glucosamina, puede ser una solución acuosa extraída de la citada planta, que haya seguido el procedimiento de la presente invención.

30 Correspondientemente en concordancia, en un aspecto, la presente invención, describe un nuevo procedimiento para la obtención de glucosamina, a partir de plantas.

35 Con respecto al primer objetivo de la presente invención, la planta o extracto de planta, se procesan en concordancia con la presente invención, con objeto de que contengan glucosamina libre, en grandes cantidades.

40 En una forma preferida de presentación, la planta o extracto de plantas (vegetales), procede de cualquier parte de la planta, como por ejemplo, hojas, tubérculos, frutos, semillas, raíces, granos o cultivos celulares. Después de un procedimiento controlado de calentamiento, la primera materia de plantas, la planta ó el extracto de plantas, puede encontrarse en forma de un extracto seco, liofilizado, u hojas, raíces y / o frutas, en dependencia de la fuente de la planta, o planta fresca, o fracción enriquecida con glucosamina.

45 En una forma de presentación, el cultivo de las especies de plantas, se realiza en campos, o en sistemas de cultivo hidropónico.

En una forma preferida de presentación, el cultivo de las especies de plantas, se realiza en sistemas de cultivo hidropónico.

50 La planta o extracto de plantas, se selecciona, en cuanto a su capacidad para generar glucosamina libre, mediante el procedimiento de la presente invención; de una forma particular, éste puede seleccionarse de entre el grupo consistente en especies de plantas que contienen sucrosa, fructosa o inulina, tales como Cichorium, Daucus, Helianthus, Beta.

55 En una forma de presentación, el material de plantas o extracto de plantas, puede ser por ejemplo, de procedencia de raíces de chicoria (*Cichorium intybus*), zanahoria (*Daucus carota*), tubérculo, o alcachofa de Jerusalén (*Helianthus tuberosum*), raíz de remolacha (*Beta vulgaris*).

60 En una forma preferida de presentación, la especie de planta, es la *Cichorium intybus*, utilizada para la producción de la “Endive” Belga (endibia belga), en sistemas de cultivo hidropónico: es decir, chicon, chicoria de endibia, endibia, “endive” francesa (endibia francesa), endibia blanca, chicoria holandesa, succory (achicoria), chicoria común, o “dandelion” italiano (diente de león italiano), es *Cichorium Intybus*. La chicoria de endibia, es el nombre común utilizado por la mayoría de horticultores, para la planta cultivada, mientras que, el de “endive” belga, (endibia belga), es utiliza más, para el producto vendido en último lugar, en tiendas o almacenes de ultramarinos, a los consumidores. La endibia, es el segundo brote de la parte superior de una raíz de chicoria. El primer crecimiento, tiene lugar en el campo, en un crecimiento de planta procedente de una semilla. El segundo crecimiento, tiene lugar

fuera del campo, usualmente, en un edificio, en la oscuridad. Cada raíz, tiene un brote principal, que conduce al desarrollo del chicon (endibia).

5 En una forma de presentación mayormente preferida de presentación, el cultivo de la chicoria, se realiza en sistemas de cultivo hidropónico. Las raíces de chicoria, se emplazan en una solución hidropónica que está recirculando, y los nutrientes, en esta solución nutritiva, incluyendo a los fertilizantes responsables para la formación adicional de glucosamina, fomentan el crecimiento de las raíces de alimentación, las cuales brotan del fondo de la raíz de chicoria. Estas raíces de alimentación, actúan como una bomba, a través del sistema vascular de las raíces de la chicoria. Es decir que, la persona experta en el arte especializado de la técnica, reconocerá muchas variaciones, en este ejemplo, para cubrir una amplia gama de procesados, y mezclas, para ajustar racionalmente los niveles de origen natural, de los compuestos de la invención, para una variedad de aplicaciones.

10 En una forma de presentación, se utiliza un sistema corriente de producción de endibias, en presencia de un fertilizante, que actúa como precursor de glucosamina, en donde, las raíces de chicoria, se recolectan, al mismo tiempo que las partes aéreas (endibias).

15 En otra forma de presentación, después de la producción comercial de las endibias, las raíces de chicoria, se emplazan, otra vez, en condiciones hidropónicas, en presencia de un fertilizante, que actúa como precursor de glucosamina.

20 En una forma de presentación, puede utilizarse material de plantas, fresco, tratado en concordancia con la invención, o material de plantas tratado en concordancia con la invención, el cual, a continuación, se seca, y subsiguientemente, se rehidrata, y se procesa, para obtener material de plantas, con un alto contenido de glucosamina, en concordancia con la presente invención.

25 En una forma preferida de presentación, se utiliza material de plantas, fresco.

30 En concordancia con la presente invención, mediante la utilización de de un fertilizante a base de nitrógeno, utilizando varios medios, para el crecimiento de las plantas, que actúa como precursor de la glucosamina, las cantidades de glucosamina obtenidas, son mucho mayores, que las que se obtienen según el documento de patente internacional WO 2005 / 053 710 (mayor de 5 g por kg de materia seca de raíz de chicoria).

35 Tal y como se da a conocer en la publicación de patente internacional WO 2005 / 053 710, el procedimiento de secado descrito, es de una sola vez, para obtener glucosamina, en plantas, en grandes cantidades: pueden obtenerse niveles de alrededor de 500 mg por kg de materia seca de raíz de chicoria, 100 mg por kg de materia seca de raíz de zanahoria, ó 50 mg por kg de materia seca de tubérculos de alcachofa de Jerusalén, o raíces de remolacha, utilizando el procedimiento de secado descrito en el documento de patente internacional WO 2005 / 053 710.

40 Las primeras materias de plantas, frescas, secas o rehidratadas que se han estado previamente en contacto con un fertilizante a base de nitrógeno, durante su crecimiento, se calientan, utilizando una maceración líquida o proceso de secado, a una temperatura que se encuentra por debajo de los 110°C, de una forma preferible, a temperaturas comprendidas dentro de unos márgenes situados entre los 70 y los 110°C, de una forma mayormente preferible, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes situados entre los 70 y los 91°C, o por debajo, durante un transcurso de tiempo de más de 10 horas y, de una forma preferible, durante un transcurso de tiempo inferior a una semana, de una forma más preferible, durante un transcurso de tiempo comprendido entre 10 y 120 horas, como por ejemplo, entre 12 y 50 horas, dependiendo de la especie de planta y el órgano de la planta. Si las temperaturas y / o los tiempo de calentamiento, son demasiado bajos y / o demasiado cortos, la generación de glucosamina, no será eficiente, o será muy baja, conduciendo a un procedimiento que no será económicamente viable. Por el contrario, si las temperaturas y / o el tiempo de calentamiento, son demasiado altos y / o demasiado largos, la glucosamina, se generará, pero, subsiguientemente, se degradará progresivamente.

45 Así, por lo tanto, las temperaturas y los tiempos, se eligen con objeto de obtener unos contenidos de glucosamina de por lo menos 5 g de glucosamina / kg de materia seca, del correspondiente material de plantas, que ha experimentado el procedimiento de calentamiento.

50 Un ejemplo mayormente preferido, comprende un secado, en un horno, a una temperatura de 85°C, durante un transcurso de tiempo situado entre las 48 y las 72 horas.

55 Los fertilizantes utilizados en concordancia con la presente invención, son compuestos que permiten la condensación de compuestos de azúcar-nitrógeno, que se requiere para formar glucosamina. De una forma preferible, éstos consisten en sales de amonio. Los ejemplos de tales sales de amonio, son el nitrato amónico o el sulfato amónico, entre otros. El precursor de glucosamina preferido, es el sulfato amónico, el cual ha mostrado unos resultados sorprendentemente buenos, en el procedimiento en concordancia con la presente invención.

60

65

Los fertilizantes, se utilizan durante un transcurso de tiempo situado dentro de unos márgenes que van desde las pocas horas, hasta las pocas semanas, antes de la recolección del material de plantas. Es decir, la persona experta en el arte especializado de la técnica, reconocerá muchas variaciones, en este ejemplo, para cubrir unos amplios márgenes de aplicación del fertilizante, ajustando, de una forma racional, los niveles de origen natural de los compuestos de la invención, para una gran variedad de aplicaciones.

Para el procedimiento final que conduce a la formación de glucosamina, se describe un procedimiento apropiado, en la publicación de la patente internacional WO 2005 / 035 710, para la preparación de un material de plantas; el material de plantas, se recolecta, se corta y se seca, en horno, o en un secador industrial, a una temperatura que se encuentra por debajo de los 110°C, de una forma preferible, a temperaturas comprendidas dentro de unos márgenes situados entre los 80 y los 105°C, de una forma mayormente preferible, a una temperatura de 91°C, o por debajo, durante un transcurso de tiempo de más de 10 horas y, de una forma preferible, durante un transcurso de tiempo inferior a una semana, de una forma más preferible, durante un transcurso de tiempo comprendido entre 10 y 120 horas, como por ejemplo, entre 12 y 50 horas, dependiendo de la especie de planta y el órgano de la planta. Sin pretender vincularlo a ninguna teoría, creemos que, es preferible, el cortar el material de plantas en rodajas o cubitos, los cuales tengan, de una forma preferible, una anchura máxima de 5 mm. Los inventores, creen, de hecho, que esto es importante, para la presente invención, con objeto de alcanzar unos intercambios termodinámicos optimizados.

La adición de fertilizantes, antes de la adición del material de plantas, que actúan como precursores de la glucosamina, permite el incrementar, de una forma significativa, la reacción anteriormente descrita, arriba, desde unos cuantos mg glucosamina por kg, en seco, sin precursor de, hasta por lo menos 5 g de glucosamina, por kg de materia seca, del correspondiente material de plantas.

El procedimiento de la presente invención, genera glucosamina, directamente, en forma libre. Sin pretender vincularlo a ninguna teoría, se cree que, por lo menos la mitad de la glucosamina producida mediante el citado procedimiento, es en forma libre, e incluso que, casi la totalidad de la mitad de la glucosamina producida, es en forma libre. De hecho, se cree que, por lo menos un 50%, por lo menos un 70%, e incluso por lo menos un 90% de la glucosamina, se produce en forma libre, en concordancia con el procedimiento de la presente invención. Esto es otra ventaja de la presente invención, comparado con las técnicas conocidas, utilizadas para producir glucosamina, en donde, es obligatorias una etapa de hidrólisis, para liberar glucosamina libre, a partir de un complejo de moléculas, tales como la quitina, las glicoproteínas o los proteoglicanos, por ejemplo.

La planta o extracto de plantas en concordancia con la invención, puede utilizarse en la preparación de una composición alimenticia, sin un tratamiento o extracción adicional. La citada composición, puede ser en forma de un producto alimenticio nutritivamente equilibrado, un suplemento dietético, una recompensa nutritiva, o una composición farmacéutica.

Ejemplos

Ejemplo 1 :

Raíces de chicoria (*Cichorium intybus*), frescas, tratadas con fertilizante, durante un ciclo de producción de "chicons" (endibias), en cultivos hidropónicos.

Se procede a cultivar raíces de chicoria, en condiciones de cultivo hidropónicas, durante un procedimiento corriente, para la producción de endibias, durante un transcurso de tiempo 21 días, a una temperatura de 20°C, y una humedad relativa del 80%. La solución nutritiva, contiene 0,1 M de sulfato amónico. Después de un transcurso de tiempo de 21 días, se recolectan los "chicons" (endibias) y las raíces. Las raíces, se cortan en rodajas (0,5 x 5 x 0,5 cm) y, a continuación, se secan en un horno, a una temperatura de 91°C, durante un transcurso de tiempo de 40 horas.

Análisis:

Extracción de glucosamina:

Se procede a extraer 2 g de raíz de chicoria molida y específicamente secada, con 20 ml de agua, a la temperatura ambiente, durante un transcurso de tiempo de 1 minuto. La solución, se filtra en un filtro de Schleicher & Chultz (nº 597) o se centrifuga. Se realiza una etapa de purificación, utilizando una columna de intercambio de cationes cartucho del tipo "Oasis cartridge WATERS, MCX, referencia 186 000 776). Los compuestos básicos atrapados en la matriz, se eluyen con MeOH/NH₄OH al 2% (volumen / volumen. después del filtrado, se utiliza un alícuoto, para la inyección directa de un sistema de CL (LC system - DIONEX).

Separación:

Se procede a llevar a cabo un análisis, con un sistema HPA / PED, utilizando una columna PA1 de intercambio de iones (4*250 mm), con un aparato del tipo DIONEX DX 500.

Programa:ELUCIÓN(%)

Tiempo (minutos)	H ₂ O	NaOH 0,1 M	0,25 NaOH	Comentario
0	85	15	0	Equilibrado
60	85	15	0	
60,1	0	0	100	Lavado
70	0	0	100	
70,1	85	15	0	Equilibrado
90	85	15	0	

Flujo: 1 ml/minuto. Volumen de inyección: 20 µ. Standard: glucosamina procedente de Sigma (ref.: G4875).

En estas condiciones, la glucosamina, tiene un tiempo de retención de aproximadamente 11 minutos, y se detecta fácilmente, para una cuantificación posterior en extractos de chicoria, propiamente procesados. Mediante el presente ejemplo, se ha cuantificado una concentración de 5000 mg/kg de materia seca, en lugar de menos 90 mg/kg, sin precursor, y menos de 10 mg/kg, sin un proceso de calentamiento, o en raíces de chicoria secadas, comerciales.

Es por lo tanto posible, el aplicar la presente invención, a los materiales de plantas producidos a partir de las endibias, como un sub-producto de valor.

Confirmación de la presencia de glucosamina:

Con objeto de confirmar la presencia de glucosamina en extractos de plantas de chicoria, se han evaluado tres técnicas cuantitativas diferentes.

Cromatografía de capa fina (TLC)

Se procedió a analizar la glucosamina y los extractos de plantas, en placas de gel de sílice de HPTLC (Cromatografía de Capa Fina, de Alto Rendimiento)(Merck, ref. 1.05642), con acetato de etilo / MeOH / agua (50 / 50 / 10; volumen / volumen / volumen), como eluyente. Después de la elución, las placas, se sometieron a una proyección pulverizada (spray), con una solución de ácido acético, de ninhidrina al 1%, y se calentaron, a una temperatura de 120°C, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos. Apareció un punto, de un color o mancha de color rosado / azul, al mismo factor de relación (Rf), para la referencia de los extractos.

Degradación química

En presencia de ninhidrina, acontece una desaminación, con glucosamina, lo cual conduce a una liberación de arabinosa, fácilmente detectada mediante análisis de LC (CL) rutinario con azúcar. La presencia de arabinosa, con control de extractos de chicoria, se confirmó de una forma inequívoca.

Derivatización de glucosamina

Se procedió a utilizar cromatografía de fase inversa, utilizando pre-derivatización de columna, con isotiocianato de fenilo y detección ($\lambda = 254$ nm), con el compuesto puro y extractos de plantas, según de describe por parte de Zhongming et al.: "Determination of nutraceuticals, glucosamine hydrochloride in raw materials, dosage form and plasma using pre-column derivation with UV HPLC. In J. of Pharmaceut. and Biomed. Analysis, 1999 (20), 807 – 814" - Determinación de nutraceuticos, clorhidrato de glucosamina en primeras materias, forma de dosificación y plasma, utilizando pre-derivatización de columna, con UV HPLC. En J. of Pharmaceut. and Biomed. Analysis, 1999 (20), 807 – 814 -.

Se procedió a determinar el correspondiente pico de glucosamina derivatizada, sen extractos de chicoria, así como con compuesto puro.

Análisis de espectro de masas

Se procedió a analizar los extractos de plantas, mediante Espectrometría de Masas por Electro-proyección pulverizada (Electro-spray), en modo de ionización positiva, para confirmar la presencia de glucosamina. El

espectrómetro de masas, era un instrumento de tiempo de vuelo (LCT, procedente de la firma Micromass, con una interfase Z-spray). La glucosamina estándar, proporcionó un ión, a m/z 180.0887. Este fragmento de iones, se encuentra en extractos de plantas analizados.

5 Ejemplo 2:

Raíces de chicoria (*Cichorium intybus*), frescas, tratadas con fertilizante, después de un ciclo de producción de "chicons"(endibias), en cultivos hidropónicos.

10 Después de proceder a la recolección de las endibias crecidas, bajo unas conducciones corrientes, para la producción comercial, las raíces residuales, se someten al mismo tratamiento. Las raíces, se emplazan otra vez, en condiciones de cultivo hidropónico, como en el ejemplo 1, para un segundo ciclo de cultivo, con la solución nutritiva que contiene 1 M de sulfato amónico.

15 Las raíces, se recolectan, en el día 5, y a continuación, se procesan, según se describe en el ejemplo 1 (cortado, secado). Esto conduce a una concentración de glucosamina de 10 g/kg de peso, en seco.

Este es otro ejemplo de que es posible el aplicar la presente invención, a materiales de plantas producidos por endibias, como un producto de valor.

20

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un procedimiento para generar glucosamina, a partir de plantas, en donde, se procede a calentar materiales de plantas, frescos, o materiales de plantas rehidratados, o extractos de plantas, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes situados entre 70 y 110°C, durante más de 10 horas, caracterizado por el hecho de que se añade un fertilizante que actúa como precursor de glucosamina, durante el cultivo de las plantas, antes de la recolección.
- 10 2.- Un procedimiento, según la reivindicación 1, en donde, los fertilizantes, son compuestos que permiten la formación de la condensación de compuestos azúcar – nitrógeno, que se requiere para formar glucosamina, y éstos son, de una forma preferible, sales de amonio.
- 15 3.- Un procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, en donde, los fertilizantes, son fertilizantes a base de nitrógeno, utilizados para el crecimiento de las plantas.
- 20 4.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 3, en donde, la especie de planta, pertenece al género Cichorium, Daucus, Helianthus y / o Beta.
- 5 5.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1 a 4, en donde, las plantas, son chicoria (Cichorium intybus), zanahoria (Daucus carota), alcachofa de Jerusalén (Helianthus tuberosum), y / o remolacha (Beta vulgaris).
- 25 6.- Procedimiento, según la reivindicación 5, en donde, la chicoria, se produce en condiciones hidropónicas.
- 7.- Procedimiento, según la reivindicación 6, en donde, el fertilizante, se añade en una solución nutritiva, para el cultivo hidropónico de las raíces de chicoria, antes o después de la producción de endibias.
- 30 8.- Procedimiento, según la reivindicación 7, en donde, las raíces resultantes de la producción de endibias, se utilizan como una fuente de glucosamina.
- 35 9.- Planta o extracto de plantas, susceptible de poderse obtener mediante un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende por lo menos 5 g de glucosamina, por kg de material de plantas (peso en seco).
- 40 10.- Planta o extracto de plantas, según la reivindicación 9, que comprende por lo menos 7,5 g/kg de glucosamina, por kg de material de plantas (peso en seco).
- 45 11.- Planta o extracto de plantas, según la reivindicación 9, que comprende por lo menos 10 g/kg de glucosamina, por kg de material de plantas (peso en seco).
- 12.- Planta o extracto de plantas, según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde, por lo menos parte de la glucosamina, es en forma libre.
- 13.- Planta o extracto de plantas, según la reivindicación 12, en donde, por lo menos parte de la glucosamina, es en forma libre.
- 14.- Planta o extracto de plantas, según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde, la planta, pertenece al género Cichorium, Daucus, Helianthus y / o Beta.