

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 344**

51 Int. Cl.:
A61K 31/7008 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06742888 .8**
96 Fecha de presentación: **12.05.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1890710**
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 05104038

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.03.2012

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

72 Inventor/es:
COURTOIS, Didier;
MICHAUX, Stéphane y
GOULOIS, Eric

74 Agente/Representante:
Isern Jara, Jorge

ES 2 376 344 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 07 4 696, 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.

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).

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, en la piel en cuestión. 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.

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.

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.

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.

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 D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina. La N-acetil-D-glucosamina, se conoce como siendo un factor limitativo 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.

5 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).

Origen de la glucosamina

10 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.

15

Fuentes industriales de la glucosamina

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 de 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

En el documento de patente internacional WO 2005 / 053 710, se ha encontrado que, la glucosamina, puede formarse a partir de diversos materiales de plantas, siguiendo un proceso especial de secado, obteniéndose, a dicho efecto, unos contenidos de glucosamina correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre 150 y 1000 mg por kg de peso, en seco.

40

Resumen de la invención

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 precursor de glucosamina después de recolectar el material de planta, y antes de, o durante un proceso de calentamiento, con objeto de obtener primeras materias de plantas, que contentan un nivel de 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.

50

Los precursores mencionados anteriormente, arriba, pueden añadirse, después de la recolección, en el material de plantas fresco, o previamente secado, o en un extracto de plantas derivado, durante el proceso de calentamiento del material de plantas, o extracto de plantas derivado, o durante la preparación de un extracto acuoso, a partir de material de plantas.

55

Descripción detallada de la invención

60

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

65

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.

5 En la presente especificación, por "glucosamina libre", debe entenderse glucosamina no polimerizada.

10 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 de plantas, de una forma preferible, por encima de 20 g por kg de materia seca, de material de plantas, y de una forma más preferible, por encima de 40 g por kg de materia seca, de primera materia de plantas.

15 En la presente especificación, "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.

25 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.

30 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 del material de plantas, 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.

35 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.

40 En una forma de presentación mayormente preferida, 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*).

45 En una forma de presentación, en primer lugar puede secarse material de plantas, fresco, o material de plantas, completamente o parcialmente y, a continuación, subsiguientemente, se rehidrata, y se procesa y, después de estas dos etapas, puede procesarse en concordancia con la presente invención, para obtener material de plantas con un alto contenido en glucosamina.

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

50 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 etapa (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.

60 La primera materia de plantas, fresca, seca o rehidratada, se calienta, 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.

5 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.

10 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.

15 En concordancia con la presente invención, se utiliza el mismo procedimiento, pero, la diferencia, consiste en el hecho de que, los materiales de plantas, o extractos de plantas, en primer lugar, se ponen en contacto con el precursor de glucosamina. El resultado, consiste en que, las cantidades de glucosamina obtenidas, son mucho mayores que las correspondientes a las obtenidas en la patente internacional WO 2005 / 053 710. De hecho, el contenido de plantas, en concordancia con la presente invención, es mayor de 10 g por kg de materia seca de raíz de chicoria, que 15 g por kg de materia seca de raíz de zanahoria o raíz de remolacha.

20 Los precursores de glucosamina 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, el sulfato amónico, el acetato amónico, el dihidrogenofosfato amónico o glutamina, entre otros. Los precursores de glucosamina preferidos, son el sulfato amónico y el nitrato amónico, lo cuales han mostrado unos resultados sorprendentemente buenos, en el procedimiento en concordancia con la presente invención.

25 En una forma preferida de presentación, el precursor, se añade, en el material recientemente recolectado, un corto tiempo antes de proceder al procedimiento de calentamiento. La persona experta en el arte especializado de la técnica, sabrá cómo adoptar la cantidad de precursor de glucosamina, en el material de plantas o el extracto de plantas, si bien, no obstante, en una forma de presentación mayormente preferida, la cantidad final de sulfato amónico, es la correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes situados entre un 1 y un 8%, de peso frescote primera materia de plantas, siendo éste, de una forma preferible, del 4%.

35 En una forma de presentación mayormente preferida, el precursor de glucosamina, se añade, el material de plantas o al extracto de plantas, como una solución que se aplica a través de una proyección pulverizada (spray), o mediante remojo o embebido. Por ejemplo, procediendo al proyección pulverizada (spray) de una solución acuosa (4 M), durante un transcurso de tiempo situado entre 5 y 30 minutos, o embebido o remojo en la misma solución, durante un transcurso de tiempo de unos pocos minutos hasta unas pocas horas. Estos ejemplos, no obstante, no deben considerarse de ningún modo, como siendo limitativos de la invención. Esto significa que, la persona experta en el arte especializado de la técnica, reconocerá muchas variaciones en este ejemplo, para cubrir una amplia gama de procedimientos de procesado, y mezclas, para ajustar, de una forma razonable, los niveles originados de una forma natural, de los compuestos de la invención, para una gran variedad de aplicaciones.

45 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, sin la adición de precursores: 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.

55 La adición de precursores de glucosamina, antes o durante el proceso de calentamiento, permite el incrementar, de una forma significativa, la reacción anteriormente descrita, arriba, desde unos cuantos mg de glucosamina por kg, de peso seco, sin precursor, hasta por lo menos 5 g de glucosamina, por kg de materia seca, del correspondiente material de plantas.

60 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 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

obligatoria 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.

5 Una pre-extracción de la primera materia, sin sulfato amónico, antes del tratamiento de calentamiento, conduce a extractos enriquecidos en glucosamina (ejemplo 8).

La glucosamina, puede extraerse, en primer lugar, del material de plantas, sola o conjuntamente con otros compuestos, tales como la inulina o los fructooligosacáridos (FOS).

10 Ejemplos

Los ejemplos que se facilitan a continuación, son ilustrativos de algunos de los productos y procedimientos de realización de los mismos, que caen dentro del ámbito de la presente invención. Éstos no deben considerarse, en ningún caso, como siendo limitativos de la invención. Pueden realizarse cambios y modificaciones con respecto a la invención. Es decir, la persona experta en el arte especializado de la técnica, reconocerá muchas variaciones en estos ejemplos, para cubrir una amplia gama de fórmulas, procesos y mezclas, con objeto de ajustar, de una forma racional, los niveles de origen natural de los compuestos de la invención, para una gran variedad de aplicaciones.

20 Ejemplo 1:

Remolacha azucarera fresca

Secado: Después de la recolección, se procede a cortar 200 g (peso fresco) de raíces de remolacha (*Beta vulgaris*), en forma de rodajas de unas dimensiones de 1 x 1 x 1 cm. Se proyectan, mediante proyección pulverizada (spray), 25 ml de sulfato amónico $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{M}$ (procedente de la firma Prolabo, con el número de referencia 21332.293), sobre todas las caras de las rodajas y, a continuación, las rodajas, se secan en un horno, a una temperatura de 91°C, durante un transcurso de tiempo de 56 horas.

30 Análisis:

Extracción de glucosamina:

Se procede a extraer 2 g de raíz de remolacha, 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).

40 Separación:

Se procede a llevar a cabo una 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.

45 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	

50 Flujo: 1 ml/minuto. Volumen de inyección: 20 µl. Patrón 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 remolacha, propiamente procesados. Mediante este procedimiento, en el presente ejemplo, se ha cuantificado una concentración de 16 g/kg de peso, en seco, en lugar de los menos 300 mg/kg, sin precursor, y de los menos de 1 mg/kg, sin un proceso de calentamiento.

Confirmación de la presencia de glucosamina:

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

Cromatografía de capa fina (TLC)

- 10 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 o mancha, de un color rosado / azul, al mismo factor de relación (Rf), para la referencia y los extractos.
- 15

Degradación química

- 20 En presencia de ninhidrina, acontece una desaminación oxidante, 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 extractos de control y extractos de chicoria, se confirmó de una forma inequívoca.

Derivatización de glucosamina

- 25 Se procedió a utilizar cromatografía de fase inversa, utilizando pre-derivatización de columna, con isotiocianato de fenilo y detección UV ($\lambda = 254$ nm), con el compuesto puro y extractos de plantas, según se describe por parte de Zhongming et al.: "Determination of nutraceuticals, glucosamine hidrocloreto 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 -.
- 30

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

35

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.
- 40

Ejemplo 2:

45

Raíces frescas de zanahoria (Daucus carota)

- Se procede a cortar 200 g (peso fresco) de raíces de zanahoria, en rodajas, de unas dimensiones de 1 x 1 x 1 cm y, a continuación, se procede a aplicar, mediante proyección pulverizada (spray), la solución de sulfato amónico, de la misma forma que en el ejemplo 1. A continuación, las rodajas, se secan en un horno, a una temperatura de 91°C, durante un transcurso de tiempo de 37 horas. La extracción y el análisis, se realizan de la misma forma que en el ejemplo 1, lo cual conduce a una concentración de glucosamina, de 15 g/kg, en peso, en seco, en lugar de los menos de 190 mg/kg, de peso, en seco, sin precursor, y los menos de 1 mg /kg, sin proceso de calentamiento.
- 50

Ejemplo 3:

55

Raíces frescas de chicoria (Cichorium inybus)

- Se procede a cortar 200 g (peso fresco) de raíces de chicoria, en rodajas, de unas dimensiones de 0,5 x 0,5 x 0,5 cm. Las rodajas, se embeben en una solución de sulfato amónico (4M), durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, o se procede a proyectar, mediante proyección pulverizada (spray), la solución de sulfato amónico, o las rodajas se mezclan, a una temperatura de 85°C, con la solución de sulfato amónico, durante un transcurso de tiempo de 8 horas. A continuación, las rodajas, se secan en un horno, a una temperatura de 91°C, durante un transcurso de tiempo de 40 horas. La extracción y el análisis, se realizan de la misma forma que en el ejemplo 1, lo cual conduce a una concentración de glucosamina, de 43 g/kg, en peso, en seco, en lugar de los menos de 900
- 60
- 65

mg/kg, de peso, en seco, sin precursor, y los menos de 10 mg /kg, sin proceso de calentamiento, o en raíces de chicoria comerciales.

Ejemplo 4:

5

Raíces de chicoria, secadas

10

15

Se procede a cortar raíces de chicoria, frescas, en rodajas (de unas dimensiones de 1 x 1 x 1 cm), se secan utilizando un procedimiento corriente (115°C, de entrada de aire, durante un transcurso de tiempo de 2 horas, en un secador de lecho fluidificado) y, a continuación, se almacenan a la temperatura ambiente. Cuando se hace necesaria la generación de glucosamina, las rodajas secadas, se embeben, durante un transcurso de tiempo de 1 hora, en una solución de sulfato amónico (4M), se rehidratan las rodajas, y se aporta el precursor. A continuación, las rodajas, se secan en un horno, a una temperatura de 85°C, durante un transcurso de tiempo de 43 horas. La extracción y el análisis, se realizan de la misma forma que en el ejemplo 1, lo cual conduce a una concentración de glucosamina, de 11 g/kg, en peso, en seco, en lugar de los menos de 190 mg/kg, de peso, en seco, sin precursor, y de los menos de 1 mg /kg, sin proceso de calentamiento.

20

Es por lo tanto posible, el aplicar la presente invención, a materiales de plantas sometidos a un almacenaje de largo transcurso de tiempo, bajo forma deshidratada o seca.

Ejemplo 5:

Raíces de chicoria, secadas:

25

30

Se procede a suspender 1,5 g de materia en polvo, seca, en un matraz de Erlenmeyer, con 100 ml de sulfato amónico (3M), se agita da una forma vigorosa, y se incuba durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, a una temperatura de 80°C. A continuación, esta solución, se seca en un horno, a una temperatura de 85°C, durante un transcurso de tiempo de 50 horas. La extracción y el análisis, se realizan de la misma forma que en el ejemplo 1, lo cual conduce a una concentración de glucosamina, de 110 g/kg, en peso, en seco. Este es otro ejemplo, de que es por lo tanto posible, el aplicar la presente invención, a materiales de plantas sometidos a un almacenaje de largo transcurso de tiempo, bajo forma deshidratada o seca.

Ejemplo 6:

35

Raíces de chicoria, secadas, enteras

40

Se procede a almacenar 10 raíces de chicoria, recientemente recolectadas, a la temperatura ambiente, durante un transcurso de tiempo de tres días. Se procede, a continuación, a embeber las raíces enteras, en una solución de sulfato amónico (4M), durante un transcurso de tiempo de 24 horas. Las raíces, se cortan en rodajas de 0,5 x 0,5 x 0,5 cm y, a continuación, éstas se procesan (se secan), de la misma forma que en el ejemplo 3, conduciendo, con ello, a una concentración de glucosamina de 44 g/kg de peso en seco.

45

Ejemplo 7:

Rodajas de de raíces frescas de chicoria, tratadas en medio líquido

50

55

Se procede a cortar 100 g de raíces de chicoria, frescas, en rodajas (de unas dimensiones de 0,5 x 0,5 x 0,5 cm), éstas se suspenden, y se agitan, de una forma vigorosa, en un matraz de Erlenmeyer, abierto, o tapado con un tapón de celulosa, con 200 ml de sulfato amónico (4M), se agita da una forma vigorosa, y se incuba durante un transcurso de tiempo de 30 minutos, a una temperatura de 80°C. A continuación, esta solución, se seca en un horno, a una temperatura de 85°C, durante un transcurso de tiempo de 60 horas. La extracción y el análisis, se realizan de la misma forma que en el ejemplo 1, lo cual conduce a una concentración de glucosamina, de 30 g/kg, en peso, de materia fresca. Es por lo tanto posible, el aplicar la presente invención, bajo condiciones húmedas de calentamiento.

Ejemplo 8:

Extracto enriquecido en glucosamina

60

65

Se procede a cortar 100 g de raíces de chicoria, frescas, en rodajas (de unas dimensiones de 0,5 x 0,5 x 0,5 cm), éstas se suspenden, y se agitan, de una forma vigorosa, en un matraz de Erlenmeyer, con 200 ml de sulfato amónico (4M). A continuación, la solución, se filtra, y el eluyente obtenido, se seca, en un horno, a una temperatura de 85°C, durante un transcurso de tiempo de 60 horas. La extracción y el análisis, se realizan de la misma forma que en el ejemplo 1, lo cual conduce a una concentración de glucosamina, de 100 g/kg, de peso, en seco.

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 precursor de glucosamina, a los citados materiales de plantas, materiales de plantas rehidratados, o extractos de plantas, en donde, los precursores de glucosamina, son compuestos que permiten la formación del compuesto de condensación de azúcar – nitrógeno, requerido para formar glucosamina, y éstos son, de una forma preferible, sales amónicas.
- 10
- 2.- Un procedimiento, según la reivindicación 1, en donde, el precursor de glucosamina, se añade antes de la etapa de calentamiento.
- 15
- 3.- Un procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde, el precursor de glucosamina, se añade, o se añade también, durante la etapa de calentamiento.
- 20
- 4.- Un procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde, la especie de planta, pertenece al género Cichorium, Daucus, Helianthus y / o Beta.
- 5.- Un procedimiento, según una de 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.- Un procedimiento, según una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde, la planta o extracto de planta, comprende por lo menos 5 g de glucosamina / kg de peso en seco, de material de planta, de una forma preferible, por encima de 20 g / kg de materia, en seco, y de una forma más preferible, por encima de 40 g / kg de materia, en seco.