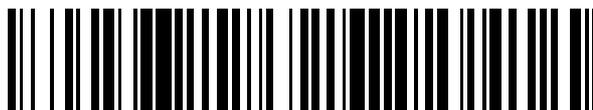


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 005**

51 Int. Cl.:

C07J 53/00 (2006.01)
C07J 71/00 (2006.01)
C07C 67/56 (2006.01)
C07C 67/58 (2006.01)
C07C 69/618 (2006.01)
C07C 69/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.07.2016 PCT/IB2016/054578**
87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017 WO17021852**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2016 E 16757959 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019 EP 3328874**

54 Título: **Método para la separación de los constituyentes isoprénicos de guayule**

30 Prioridad:

31.07.2015 IT UB20152746

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.06.2020

73 Titular/es:

**VERSALIS S.P.A. (100.0%)
Piazza Boldrini 1
20097 San Donato Milanese (MI), IT**

72 Inventor/es:

**QUERCI, CECILIA;
DEL PRETE, DANILO;
CALDARARO, MARIA y
GIROTTI, GIANNI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 770 005 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

Método para la separación de los constituyentes isoprénicos de guayule

5 Campo de solicitud

La presente invención se refiere, en general, al sector industrial de la extracción y el procesamiento del caucho, en particular del caucho de guayule y/o de las plantas de tipo guayule, más particularmente en el campo de la recuperación de sus productos residuales.

10 En particular, la invención se refiere a un método para la separación de los constituyentes isoprénicos de la resina de guayule o de la resina de tipo guayule, entre ellos guayulina A y B, y argentatina A, B, C y D.

15 Estado de la técnica

El guayule (*Parthenium argentatum*) es un arbusto perenne nativo de las regiones semiáridas del norte de México y Texas.

20 Tiene un contenido variable de caucho de cis-1,4-poliisopreno dependiendo de varios factores y entre aproximadamente 5 y 20 % en la planta seca. Debido a los altos costes de importación del caucho extraído de otras fuentes naturales tales como *Hevea brasiliensis*, el guayule ya se tuvo en cuenta antes de la Segunda Guerra Mundial, tanto en los Estados Unidos como en Italia, como una fuente alternativa de caucho natural.

25 El caucho de guayule se diferencia de aquél de *Hevea brasiliensis* en algunos aspectos esenciales, el más relevante se refiere a un contenido significativamente más bajo de proteína que da características hipoalérgicas al caucho natural. En realidad, la alergia al látex de *Hevea* se provoca por una proteína denominada *pro-heveína*, que tiene una función en la coagulación del látex en la planta; se une al epítotope de *heveína* de IgEs desencadenando la respuesta inmunitaria, que determina una serie de reacciones alérgicas de la piel y respiratorias.

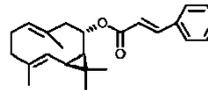
30 Otras plantas adecuadas para la extracción de caucho similar al extraído de guayule comprenden, por ejemplo, *Euphorbia lathyris*, *Parthenium incanum*, *Chrysothamnus nauseosus*, *Pedilanthus macrocarpus*, *Cryptostegia grandiflora*, *Asclepias syriaca*, *Asclepias speciosa*, *Asclepias subulata*, *Solidago altissima*, *Solidago graminifolia*, *Solidago rigida*, *Cacalia atriplicifolia*, *Taraxacum koksaghyz*, *Pycnanthemum incanum*, *Teucreum canadense*, *Campanula americana*. Además, otras plantas pertenecen a los géneros Asteraceae (Compositae), Euphorbiaceae, 35 Campanulaceae, Labiatae y Moraceae.

Actualmente, el guayule se considera no solo una posible fuente de caucho natural hipoalérgico y particularmente en los últimos años se llevaron a cabo varios estudios que tuvieron como objetivo desarrollar métodos y tecnologías de forma que permitieran una completa explotación de todas los componentes de la planta, entre ellos la resina.

40 De hecho, la resina de guayule, producida en una cantidad comparable o más alta que la del caucho, se puede usar para varias aplicaciones, entre ellas, por ejemplo, la fabricación de adhesivos y la producción de paneles de madera resistentes al daño por parásitos, mientras que, después de la extracción del caucho natural y/o resina, la biomasa de guayule residual se puede usar en la fabricación de pellets y briquetas de combustible y como fuente de los denominados "azúcares de segunda generación" (a partir de fracciones de celulosa y hemicelulosa de dicha biomasa residual), luego fermentables en bioetanol y/o biocombustibles.

50 La resina producida por la planta de guayule, así como de otras plantas de las que se obtienen una goma y una resina similar a la de guayule, entre ellas las enumeradas anteriormente, es rica en metabolitos secundarios, entre ellos los constituyentes isoprénicos que pertenecen a la familia de los terpenos (véase la Tabla 1). Las guayulinas son compuestos sesquiterpénicos de posible interés para la industria de las fragancias y para la producción de feromonas de insecto, mientras que las argentatinas son compuestos triterpénicos con un potencial antioxidante y actividad antitumoral. Las técnicas de procesamiento del guayule desarrolladas hasta la fecha se centran principalmente en los procesos de extracción del caucho natural de cis-1,4-poliisopreno y de la resina en bruto, en su tratamiento y en los procesos de conservación de biomasa.

Tabla 1: Constituyentes isoprénicos de interés

Constituyente	Clasificación	Estructura molecular
Guayulina A	Sesquiterpeno	 <p>Guayulina A</p> <p style="text-align: right;">Guayulina A</p>

El método anteriormente dicho descrito por Zoeller et al., 1994, tiene algunos inconvenientes, entre ellos los bajos rendimientos de guayulina pura obtenida. En realidad, la guayulina A pura se obtiene con un rendimiento de 1 % en el extracto en bruto, mientras que la guayulina B se obtiene en mezcla con guayulina A y su purificación es difícil.

Otro inconveniente del método está constituido por la purificación de solo uno de sus componentes, concretamente guayulina A.

En cambio, la guayulina B se obtuvo en una forma pura por Firestone Tire and Rubber Co., pero con un rendimiento de solo 0,4 % de la resina, por medio de técnicas cromatográficas (Singh, M. Bagwa Guayule resin separation and purification M.S. Thesis, Texas A&M University, Department of Nuclear Engineering, Dec 1992).

El documento de patente US-A-4.739.038 y Z. Naturforsch. C Vol 56(1-2) pp 95-105 (2001) desvelan la producción de compuestos isoprénicos de guayule o resina de guayule, que no se han desgrasado.

Por tanto, el problema técnico tratado por la presente invención es proporcionar un método que es práctico, barato, versátil, escalable y con alto rendimiento para la separación de componentes isoprénicos de la resina de planta de guayule, en particular guayulina A, guayulina B, argentatina A, argentatina B, argentatina C y/o argentatina D.

Sumario de la invención

Dicho problema se ha resuelto según la invención por un método para la separación de al menos un constituyente isoprénico de la resina de una planta de guayule y/o de tipo guayule que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una resina desgrasada de guayule y/o del tipo de guayule;
- b) someter la resina desgrasada a reparto del tipo líquido-líquido con disolventes que son inmiscibles entre sí para así obtener un extracto apolar que contiene los constituyentes isoprénicos guayulina A, guayulina B y argentatina B; y un extracto polar que contiene los constituyentes isoprénicos argentatina A, argentatina C y argentatina D; y
- c) separar al menos un constituyente isoprénico de dicho extracto polar y/o de dicho extracto apolar así obtenido, en donde la etapa c) comprende una etapa en la que el extracto polar se somete a reparto del tipo líquido-líquido con disolventes inmiscibles entre sí y/o una etapa en la que dicho extracto polar se somete a reparto del tipo sólido-líquido.

En el presente documento, el término "resina desgrasada" significa un extracto resinoso de la planta de guayule sustancialmente libre de ceras, grasas y cauchos de bajo peso molecular.

En el presente documento, los términos "reparto del tipo líquido-líquido" y "reparto líquido-líquido" significan un proceso de separación de uno o más compuestos presentes en una mezcla compleja que se aprovecha de la diferente solubilidad de los compuestos a separar en dos disolventes inmiscibles entre sí.

En el presente documento, los términos "reparto del tipo líquido-sólido" y "reparto líquido-sólido" significa la operación de extracción basada en la afinidad de una fase sólida para uno o más constituyentes presentes en una mezcla compleja.

En realidad, en el reparto (o extracción) del tipo líquido-sólido (comúnmente indicado con el acrónimo SPE, de la denominación inglesa extracción en fase sólida), se usa la distribución de los constituyentes, entre una fase líquida y una fase sólida insoluble en la disolución con la que se pone en contacto. Después de del contacto durante un periodo de tiempo adecuado, se retira la fase líquida y se absorben los compuestos sobre la fase sólida, se pueden recuperar usando una disolución extrayente.

Preferentemente, dicho al menos un constituyente isoprénico (también indicado como isoprenoide no polimérico) se selecciona del grupo que comprende guayulina A, guayulina B, argentatina A, argentatina B, argentatina C, argentatina D, y mezclas de las mismas.

Preferentemente, en la etapa a) la resina desgrasada se obtiene de la planta de guayule o del tipo guayule, más preferentemente de una o más plantas elegidas del grupo que comprende *Parthenium argentatum*, *Euphorbia lathyris*, *Parthenium incanum*, *Chrysothamnus nauseosus*, *Pedilanthus macrocarpus*, *Cryptostegia grandiflora*, *Asclepias syriaca*, *Asclepias speciosa*, *Asclepias subulata*, *Solidago altissima*, *Solidago graminifolia*, *Solidago rigida*, *Cacalia atriplicifolia*, *Taraxacum koksaghyz*, *Pycnanthemum incanum*, *Teucreum canadense* and *Campanula americana*, preferentemente *Parthenium argentatum*.

La resina desgrasada de la etapa a) se puede obtener a partir de una planta fresca o secada, natural o cultivada, *in vitro*.

Según una realización, la resina desgrasada de la etapa a) se obtiene a partir de un extracto en bruto de la planta

completa.

Según una realización alternativa, la resina desgrasada de la etapa a) se obtiene a partir de un extracto en bruto de uno o más de entre ramas, tallo y hojas de la planta.

5 Según una realización alternativa adicional, la resina desgrasada de la etapa a) se obtiene a partir de un extracto en bruto del bagazo.

10 En el presente documento, el término "extracto en bruto" se refiere a la fracción de la planta de guayule o del tipo guayule que contiene la resina que se obtiene después del tratamiento de la planta, normalmente con disolventes, para separar de los componentes lignocelulósicos la fracción deseada de la planta que contiene la resina.

15 El término "bagazo" se refiere a la biomasa residual derivada de los procesos de extracción del caucho natural de guayule.

Preferentemente, la resina desgrasada de la etapa a) se obtiene por una etapa de desgrasado, más preferentemente una etapa de cristalización fraccionada (también denominada "winterización") de un extracto en bruto de una planta de guayule o del tipo guayule.

20 Ventajosamente, después de la etapa de desgrasado, el rendimiento de la resina desgrasada, expresado como porcentaje del peso seco de resina de la resina con respecto al peso seco del extracto en bruto, es entre 50 y 70 %, más preferentemente aproximadamente 60 %. Preferentemente, la etapa de cristalización fraccionada (o "winterización") comprende un tratamiento a una temperatura entre 30 y 50 °C, más preferentemente 40 °C, del extracto en bruto con un disolvente, preferentemente con agitación hasta la disolución sustancialmente completa del extracto en bruto; y posterior enfriamiento, preferentemente a una temperatura de aproximadamente 0 °C, obteniéndose así la separación de un componente apolar, que comprende ceras, grasas y cauchos de bajo peso molecular, de un componente polar (también denominado "aguas madre") que comprende la resina desgrasada.

30 Preferentemente, en la etapa de cristalización fraccionada, el disolvente se selecciona de metanol, agua, etanol, metanol, acetona y combinaciones de los mismos, preferentemente metanol.

35 Preferentemente, en la etapa de cristalización fraccionada, el extracto en bruto se suspende en el disolvente en una relación, expresada como peso seco (g) del extracto en bruto con respecto al volumen (l) del disolvente, entre 50 y 150 g/l, más preferentemente de 100 g/l.

Preferentemente, la etapa b) va precedida por una etapa de concentración de la resina desgrasada hasta un volumen, expresado como porcentaje en volumen/volumen de la resina antes de la concentración, entre 5 y 20 % (v/v), más preferentemente entre 5 y 10 % (v/v).

40 Preferentemente, en dicha etapa b), el reparto del tipo líquido-líquido se lleva a cabo a una temperatura entre 15 °C y 26 °C, más preferentemente a 20 °C.

45 Preferentemente, en dicha etapa b), los disolventes inmiscibles entre sí comprenden un disolvente polar y un disolvente apolar.

50 Preferentemente, en la etapa b), el disolvente polar se selecciona del grupo que comprende agua, metanol, etanol, isopropanol, terc-butanol, acetato de etilo, y combinaciones de los mismos, más preferentemente una disolución de metanol y agua; más preferentemente en una relación en volumen entre metanol y agua entre 2:1 y 6:1, más preferentemente entre 3:1 y 5:1, incluso más preferentemente aproximadamente 4:1; y el disolvente apolar se elige entre éter de petróleo, n-hexano y combinaciones de los mismos, más preferentemente éter de petróleo.

Preferentemente, el disolvente polar está en una relación en volumen con respecto al disolvente apolar entre 2:1 y 8:1, más preferentemente entre 4:1 y 5:1.

55 Preferentemente, la etapa b) de someter la resina desgrasada a reparto se repite una o más veces.

Preferentemente, la etapa b) comprende una etapa de secado del extracto apolar así obtenido, más preferentemente a una presión entre 1,5 mbar y 2,0 mbar y a una temperatura entre 25 °C y 35 °C.

60 Preferentemente, el rendimiento del total de la guayulina A, guayulina B y argentatina B en el extracto apolar obtenido en la etapa b), expresado como porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de la resina desgrasada de la etapa a), es al menos 10,0 %, más preferentemente al menos 12,0 %.

65 Preferentemente, el rendimiento del total de argentatina A, argentatina C y argentatina D en el extracto polar obtenido en la etapa b), expresado como porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de la resina desgrasada de la etapa a), es al menos 6,0 %, más preferentemente al menos 11,0 %.

- 5 Preferentemente, en la etapa c), el al menos un constituyente isoprénico se selecciona de guayulina A, guayulina B, argentatina B o mezclas de las mismas y la etapa c) comprende una etapa de someter el extracto apolar obtenido en la etapa b) a reparto del tipo sólido-líquido.
- 10 Preferentemente, en la etapa c), el reparto del tipo sólido-líquido comprende las etapas de someter el extracto apolar obtenido en la etapa b), disuelto en una combinación de dos disolventes miscibles entre sí, a adsorción sobre una matriz sólida, más preferentemente por atrapamiento selectivo; y de tratamiento, más preferentemente aclarado, de la matriz sólida así obtenida con una combinación de dos disolventes miscibles entre sí, obteniéndose así una disolución que contiene una mezcla de guayulina A y guayulina B, y una matriz sólida que contiene argentatina B.
- 15 Preferentemente, el tratamiento de la matriz sólida así obtenida se lleva a cabo con una combinación de disolventes que es la misma de la combinación de disolventes de la etapa de adsorción sobre la matriz sólida.
- 20 Preferentemente, la etapa de adsorción sobre la matriz sólida va seguida por la evaporación de la combinación de disolventes.
- 25 Preferentemente, la adsorción sobre la matriz sólida se lleva a cabo en un matraz de reacción o sobre un soporte filtrante, más preferentemente en un matraz de reacción.
- 30 Preferentemente, la adsorción sobre la matriz sólida se lleva a cabo a una presión entre 1,0 mbar y 2,5 mbar, más preferentemente entre 1,5 mbar y 2,0 mbar y a temperatura entre 25 °C y 35 °C, más preferentemente entre 28 °C y 32 °C.
- 35 Preferentemente, la matriz sólida se selecciona del grupo que comprende: geles básicos de sílice, geles de sílice unidos a hidrocarburos que tienen grupos alquilo C₈-C₁₈ (es decir, fase inversa), geles de sílice unidos a grupos cianuro o equivalentes, geles de sílice unidos a grupos fenilalquilo o equivalentes, y combinaciones de los mismos, más preferentemente gel básico de sílice.
- 40 Preferentemente, en el reparto del tipo sólido-líquido de la etapa c), la combinación de disolventes es una combinación de un disolvente polar y un disolvente apolar, más preferentemente en una relación en volumen con respecto al disolvente apolar y el disolvente polar entre 4:1 y 49:1, más preferentemente entre 5,5:1 y 19:1, incluso más preferentemente de aproximadamente 9:1.
- 45 Preferentemente, la matriz sólida tiene un tamaño de malla entre 70 y 230.
- 50 Preferentemente, la relación, expresada como porcentaje en volumen/volumen, entre la combinación de disolventes y la matriz sólida es entre 1:5 y 1:2, más preferentemente entre 1:4 y 1:3.
- 55 Preferentemente, en el reparto del tipo sólido-líquido de la etapa c), en la combinación de disolventes, los disolventes se mezclan con el extracto apolar obtenido en la etapa b) en una relación, expresada como volumen de combinación de disolventes con respecto al peso seco del extracto apolar, entre 5 y 9 ml/g, más preferentemente 7 ml/g.
- 60 Preferentemente, en el reparto del tipo sólido-líquido de la etapa c), el disolvente polar se selecciona del grupo que comprende: etanol, metanol, acetona, ácido acético, acetato de etilo, acetonitrilo, diclorometano, y combinaciones de los mismos; y el disolvente apolar se selecciona del grupo que comprende: éter de petróleo y n-hexano, y combinación de los mismos.
- 65 Preferentemente, el rendimiento de la mezcla de guayulina A y guayulina B en la disolución que contiene la mezcla de guayulina A y guayulina B obtenida en la etapa c), expresada como porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de la resina desgrasada de la etapa a), es al menos 5,0 %, más preferentemente al menos 8,0 %.
- 70 Preferentemente, el rendimiento de argentatina B en la matriz sólida obtenida en la etapa c), expresada como porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de la resina desgrasada de la etapa a), es al menos 2,0 %, más preferentemente al menos 3,2 %.
- 75 Preferentemente, la matriz sólida que contiene argentatina B se somete a un tratamiento adicional, preferentemente aclarado con un disolvente polar, obteniéndose así una disolución de argentatina B.
- 80 Preferentemente, en el tratamiento adicional de la matriz sólida, el disolvente polar se selecciona del grupo que comprende etanol, metanol, acetona, ácido acético, acetato de etilo, acetonitrilo, diclorometano, y combinaciones de los mismos, preferentemente acetato de etilo.
- 85 Preferentemente, el tratamiento adicional de la matriz sólida se lleva a cabo a una temperatura entre 15 °C y 30 °C, más preferentemente entre 20 °C y 25 °C.

ES 2 770 005 T3

Preferentemente, el tratamiento adicional de la matriz sólida va seguido por una etapa de filtración y secado de la disolución de argentatina B así separada.

5 Preferentemente, en la etapa c), el al menos un constituyente isoprénico se elige de argentatina A, argentatina C, argentatina D o mezclas de las mismas, y la etapa c) comprende una etapa de someter el extracto polar obtenido en la etapa b) a reparto del tipo líquido-líquido.

10 Preferentemente, en la etapa c), el reparto del tipo líquido-líquido comprende la etapa de someter el extracto polar obtenido en la etapa b) a separación en una combinación de un disolvente polar y un disolvente apolar, obteniéndose así una fase orgánica que contiene argentatina A y una fase acuosa que contiene una mezcla de argentatina C y argentatina D.

15 Preferentemente, en el reparto del tipo líquido-líquido de la etapa c), el disolvente apolar y el disolvente polar están en una relación en volumen del disolvente apolar con respecto al disolvente polar comprendida entre 1:2 y 1:8, más preferentemente entre 1:5 y 1:7, incluso más preferentemente de aproximadamente 1:6.

Preferentemente, en la etapa c), la etapa de reparto del tipo líquido-líquido se repite una o más veces.

20 Preferentemente, en la etapa de reparto del tipo líquido-líquido de la etapa c), el disolvente apolar se selecciona del grupo que comprende ciclohexano, n-hexano, éter de petróleo, y combinaciones de los mismos, más preferentemente ciclohexano.

25 Preferentemente, en la etapa de reparto del tipo líquido-líquido de la etapa c), el disolvente polar se selecciona del grupo que comprende agua, metanol, etanol, isopropanol, terc-butanol, y combinaciones de los mismos, preferentemente metanol y agua.

30 Preferentemente, en el reparto del tipo líquido-líquido de la etapa c), el disolvente polar comprende el disolvente en suspensión del extracto polar obtenido en la etapa b).

Preferentemente, en la etapa de reparto del tipo líquido-líquido de la etapa c), el reparto del tipo líquido-líquido va precedida por una etapa de concentración del extracto polar obtenido en la etapa b).

35 Preferentemente, se seca la fase orgánica que contiene la argentatina A así obtenida.

Preferentemente, la fase acuosa que contiene una mezcla de argentatina C y argentatina D se trata además con un disolvente polar y más preferentemente se seca.

40 Preferentemente, el rendimiento de argentatina A en la fase orgánica obtenida en la etapa c), expresada como porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de la resina desgrasada de la etapa a), es al menos 3,0 %, más preferentemente al menos 8,0 %.

45 Preferentemente, el rendimiento de la mezcla de argentatina C y argentatina D en la fase acuosa obtenida en la etapa c), expresada como un porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de la resina desgrasada de la etapa a), es al menos 0,5 %, más preferentemente al menos 3,0 %.

Preferentemente, la etapa c) va seguida por al menos una etapa d) de purificación de al menos dicho constituyente isoprénico.

50 Preferentemente, la etapa de purificación d) comprende una etapa de cristalización de al menos un constituyente isoprénico, obteniéndose así al menos un constituyente isoprénico de la resina en una forma cristalina sustancialmente pura.

55 Preferentemente, en la etapa d), la etapa de cristalización es una cristalización directa con disolventes apolares, más preferentemente éter de petróleo y/o n-hexano, a bajas temperaturas, más preferentemente a una temperatura igual o inferior a 0 °C.

Preferentemente, en la etapa de cristalización de la guayulina A, argentatina A, C y D, la temperatura de cristalización es aproximadamente -23 °C.

60 Preferentemente, la etapa d) comprende una etapa d1) en donde la mezcla de guayulina A y guayulina B obtenida en la etapa c) se somete a precipitación de guayulina A mediante tratamiento con un disolvente apolar, seleccionado preferentemente del grupo que comprende éter de petróleo, n-hexano y combinaciones de los mismos, incluso más preferentemente n-hexano, con enfriamiento, más preferentemente a una temperatura entre 0 y -23 °C, incluso más preferentemente -23 °C, obteniéndose así un precipitado de guayulina A purificada y un sobrenadante que contiene una mezcla de guayulina A y guayulina B.

65

ES 2 770 005 T3

Preferentemente, el precipitado de guayulina A purificada se somete a cristalización, más preferentemente por cristalización directa con n-hexano, obteniéndose así cristales de guayulina A pura.

5 Preferentemente, el rendimiento de guayulina A pura, expresado como porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de la resina desgrasada de la etapa a), es al menos 2,0 %, más preferentemente al menos 5,0 %.

Preferentemente, el rendimiento de la mezcla de guayulina A y guayulina B obtenido en la etapa d1), expresado como porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de la resina desgrasada de la etapa a), es al menos 0,5 %, más preferentemente al menos 2,8 %.

10 Preferentemente, la etapa d) comprende una etapa d2) en donde la argentatina B obtenida en la etapa c) se somete a precipitación con un disolvente apolar, seleccionado preferentemente del grupo que comprende éter de petróleo, n-hexano y combinaciones de los mismos, incluso más preferentemente éter de petróleo, con enfriamiento, más preferentemente a una temperatura entre 0 y -23 °C, incluso más preferentemente 0 °C, obteniéndose así un precipitado de argentatina B purificada.

15 Preferentemente, el precipitado de argentatina B purificada se somete a cristalización, más preferentemente por cristalización directa con éter de petróleo, obteniéndose así cristales de argentatina B pura.

20 Preferentemente, el rendimiento de la argentatina B pura, expresada como un porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de la resina desgrasada de la etapa a), es al menos 1,5 %, más preferentemente al menos 3,4 %.

25 Preferentemente, la etapa d) comprende una etapa d3) en donde la argentatina A obtenida en la etapa c) se somete a precipitación con un disolvente apolar, seleccionado preferentemente del grupo que comprende ciclohexano, n-hexano, etil éter, éter de petróleo, y combinaciones de los mismos, incluso más preferentemente etil éter y n-hexano, con enfriamiento, más preferentemente a una temperatura entre 0 y -23 °C, incluso más preferentemente -23 °C, obteniéndose así un precipitado de argentatina A purificada.

30 Preferentemente, el precipitado de argentatina A purificada se somete a cristalización, más preferentemente por cristalización directa con n-hexano y etil éter, obteniéndose así cristales de argentatina A pura.

Preferentemente, la cristalización del precipitado de argentatina A purificada se lleva a cabo a una temperatura entre 0 y -78 °C.

35 Preferentemente, la etapa d) comprende una etapa d4) en donde la mezcla de argentatina C y argentatina D obtenida en la etapa c) se somete a precipitación de argentatina D con un disolvente apolar, seleccionado preferentemente del grupo que comprende éter de petróleo, n-hexano y combinaciones de los mismos, incluso más preferentemente éter de petróleo, con enfriamiento, más preferentemente a una temperatura entre 0 y -23 °C, incluso más preferentemente -23 °C, obteniéndose así un precipitado de argentatina D purificada y un sobrenadante que contiene argentatina C.

40 Preferentemente, el precipitado de argentatina D purificada se somete a cristalización, más preferentemente por cristalización directa con éter de petróleo, obteniéndose así cristales de argentatina D pura.

45 Preferentemente, el rendimiento de la argentatina D pura, expresada como porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de la resina desgrasada de la etapa a), es al menos 0,3 %, más preferentemente al menos 0,8 %.

50 Preferentemente, la etapa d4) va seguida por una etapa d5) en donde el sobrenadante que contiene argentatina C se somete a evaporación del disolvente y el residuo se disuelve en un disolvente apolar, seleccionado preferentemente del grupo que comprende ciclohexano, éter de petróleo, etil éter, n-hexano y combinaciones de los mismos, incluso más preferentemente etil éter, con enfriamiento, más preferentemente a una temperatura entre 0 y -23 °C, más preferentemente -23 °C, obteniéndose así un precipitado de argentatina C purificada.

55 Preferentemente, el precipitado de argentatina C purificada se somete a cristalización, más preferentemente por cristalización directa con n-hexano, obteniéndose así cristales de argentatina C pura.

Preferentemente, el rendimiento de la argentatina C pura, expresado como porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de la resina desgrasada de la etapa a), es al menos 0,1 %, más preferentemente al menos 0,3 %.

60 Preferentemente, la etapa d4) va precedida por una etapa de concentración de la fase acuosa obtenida en la etapa c).

65 Preferentemente, la etapa c) va seguida por una etapa e1) que comprende una reacción de hidrólisis básica de la guayulina A obtenida en la etapa d1) y/o de la mezcla de guayulina A y guayulina B obtenida en la etapa c), obteniéndose así una disolución que contiene parteniol.

- 5 Preferentemente, la reacción de hidrólisis básica se lleva a cabo en una mezcla de reacción que comprende la guayulina A y/o la mezcla de guayulina A y guayulina B y una disolución básica; en donde la disolución básica se selecciona más preferentemente del grupo que comprende hidróxido potásico, hidróxido sódico y combinaciones de los mismos, más preferentemente hidróxido potásico, en donde la guayulina A y/o la mezcla de guayulina A y guayulina B y la disolución básica están en un peso (g) en la relación de volumen (ml) de la guayulina A y/o la mezcla de guayulina A y guayulina B con respecto a la disolución básica entre 1:2 y 1:10, más preferentemente entre 1:1,5 y 1:10, incluso más preferentemente de aproximadamente 1:5, más preferentemente con agitación, obteniéndose así una fase orgánica que contiene parteniol.
- 10 Preferentemente, la mezcla de reacción comprende además metanol y agua, en donde la relación volumen/volumen entre agua y metanol es entre 1:20 y 1:100 y más preferentemente entre 1:50.
- 15 Preferentemente, la disolución que contiene parteniol se somete a cristalización, más preferentemente por cristalización directa con éter de petróleo, con enfriamiento, más preferentemente a 0 °C, obteniéndose así parteniol puro.
- 20 Preferentemente, el rendimiento del parteniol puro obtenido por hidrólisis de la mezcla de guayulina A y guayulina B de la etapa d1), expresado como porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de la resina desgrasada de la etapa a), es al menos 0,5 %, más preferentemente 1,5 %.
- 25 Preferentemente, la etapa e1) va seguida por una etapa e2) de esterificación del parteniol así obtenido, obteniéndose así una disolución que contiene guayulina B.
- 30 Preferentemente, la esterificación del parteniol se lleva a cabo con ácido anísico o cloruro de anisoílo.
- 35 Preferentemente, en la etapa de esterificación del parteniol, el ácido anísico o el cloruro de anisoílo se usan en una cantidad de 1 equivalente respecto al parteniol.
- 40 Preferentemente, la disolución que contiene guayulina B así obtenida en la etapa e2) se somete a evaporación y el residuo se disuelve en un disolvente apolar, seleccionado preferentemente del grupo que comprende ciclohexano, n-hexano, etil éter, éter de petróleo y combinaciones de los mismos, incluso más preferentemente éter de petróleo, obteniéndose así un precipitado de guayulina B purificada.
- 45 Preferentemente, el precipitado de guayulina B purificada se somete a cristalización, con enfriamiento, más preferentemente a una temperatura entre 0 y -23 °C, más preferentemente 0 °C, obteniéndose así cristales de guayulina B pura.
- 50 Preferentemente, el rendimiento de la guayulina B pura, expresada como porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de la resina desgrasada de la etapa a), es al menos 0,55 % (rendimiento de reacción 38 % molar de la reacción).
- 55 Preferentemente, la etapa c) va seguida por una etapa e3) que comprende una reacción de reducción de la argentatina B obtenida en la etapa c) y/o en la etapa d2), obteniéndose así una disolución que contiene argentatina D.
- 60 Preferentemente, la reacción de reducción se lleva a cabo en una mezcla de reacción que comprende la argentatina B e hidruro de litio y aluminio LiAlH_4 o borohidruro de sodio, más preferentemente borohidruro de sodio NaBH_4 , en donde preferentemente la mezcla de reacción tiene una concentración, expresada como peso seco de argentatina B con respecto al volumen de la mezcla, comprendida entre 2,5 y 1,5 g/100 ml, más preferentemente 2,0 g/100 ml, más preferentemente con agitación, obteniéndose así una disolución que contiene argentatina D.
- 65 Preferentemente, en la reacción de reducción, el hidruro de litio y aluminio LiAlH_4 o borohidruro de sodio están en una cantidad igual a 3 equivalentes con respecto a la argentatina B.
- 70 Preferentemente, la mezcla de reacción comprende además metanol, en donde el metanol está en una concentración expresada como porcentaje en peso (g) en volumen (ml) comprendido entre 70 y 90 %, más preferentemente 80 %.
- 75 Preferentemente, tras la reacción de reducción, la disolución que contiene argentatina D así obtenida se somete a evaporación y el residuo se disuelve en un disolvente apolar, seleccionado preferentemente del grupo que comprende ciclohexano, etil éter, n-hexano, éter de petróleo y combinaciones de los mismos, incluso más preferentemente éter de petróleo, obteniéndose así un precipitado de argentatina D purificada.
- 80 Preferentemente, el precipitado de argentatina D purificada se somete a cristalización, con enfriamiento, más preferentemente a una temperatura comprendida entre 0 y -23 °C, más preferentemente 0 °C, obteniéndose así cristales de argentatina D pura.

Preferentemente, el rendimiento de la argentatina D pura, expresado como porcentaje en peso seco con respecto al peso seco de la resina desgrasada de la etapa a), es al menos 0,50 %, más preferentemente al menos 0,8 %.

5 Las estructuras de los compuestos purificados obtenidos según la presente invención se determinan por análisis y caracterización espectroscópica según los métodos conocidos en la técnica.

10 En realidad, se ha encontrado que, sometiendo la resina de guayule (o del tipo guayule) y los productos de extracción de resina a separaciones apropiadas con disolventes, en particular repartos del tipo líquido-líquido y/o líquido-sólido, es posible separar y purificar todos los constituyentes isoprenicos de interés, guayulina A, guayulina B, argentatina A, argentatina B, argentatina C y argentatina D, con mayor rendimiento con respecto a las técnicas conocidas.

15 Las técnicas conocidas, en realidad, se basan en métodos cromatográficos en columna, que son caros y que no se pueden aumentar a una escala industrial.

Además, el estado de la técnica no describe la separación o el aislamiento de argentatinas, de interés considerable también, para las aplicaciones en el campo farmacéutico.

20 En cambio, el solicitante fue capaz de identificar un método que, usando las características de polaridad de las moléculas de interés, y basándose en una secuencia precisa de etapas y la selección de disolventes para cada etapa, permite separar y purificar en un modo rápido, simple, versátil y barato todas las moléculas de interés.

25 Por ejemplo, el método de la presente invención permite el procesamiento de 1 kg de resina cruda en dos días, obteniéndose así aproximadamente 30 g de guayulina A, 20 g de argentatina B y 3 g de argentatina A en una forma pura.

30 Además, el método de la presente invención no tiene límites de volumen, siendo así capaz de aplicarse también a volúmenes a escala industrial.

Por tanto, por primera vez, fue posible proporcionar los constituyentes guayulina A, guayulina B, argentatina A, argentatina B, argentatina C, y argentatina D, a un grado de pureza y volúmenes tales que se permitiera estudiar sus características y sus aplicaciones industriales a gran escala.

35 Las moléculas anteriormente mencionadas pueden tener interesantes aplicaciones en diversos campos, entre ellos el campo de las esencias, campo agrícola, campo cosmético y campo farmacéutico.

40 Además, el método de la presente invención, mediante reacciones de semisíntesis, permite obtener isoprenoides menores que son difíciles de obtener a partir de la resina, tales como guayulina B y argentatina D, que de otro modo no serían separables en cantidades satisfactorias.

45 Estos productos semisintéticos representan una forma racional de obtener productos naturales y sintéticos que tienen un alto potencial en cuanto a la aplicabilidad industrial, a partir de productos separados y purificados gracias al método de la presente invención, que es más versátil y ecosostenible con respecto a los laboriosos y caros métodos ya descritos en el estado de la técnica.

50 Se representa una característica peculiar del método completo de la presente invención por la ausencia de técnicas cromatográficas de columna, que permiten aún al mismo tiempo, según las realizaciones preferidas, obtener productos cristalinos purificados adicionalmente por cristalización directa con disolventes apolares a baja temperatura. La separación versátil y eficiente obtenida mediante la presente invención es inesperada, ya que aparentemente a diferencia de las teorías comúnmente aceptadas y descritas en el estado de la técnica, según las cuales serían mejor necesarias caras etapas de purificación cromatográfica en columna para obtener resultados comparables a los obtenidos según el método de la presente invención.

55 Sin embargo, si se desea, las etapas de purificación de la presente invención son adecuadas para ser aplicadas también a productos no completamente separados o purificados, previamente sometidos a cromatografía.

60 El método de la presente invención permite reducir el número de etapas para la separación y purificación de los constituyentes con respecto a los métodos conocidos en la técnica, haciendo así el método más simple y versátil y optimizando al mismo tiempo los rendimientos de obtención de productos puros, así como los costes y tiempos gastados. Además, el método de la presente invención no requiere el uso de disolventes peligrosos.

65 El método de la presente invención es aplicable a la resina obtenida a partir de todas las partes de la planta sin precaución específica alguna. En realidad, el método se puede aplicar no solo a la resina obtenida a partir de la planta completa, sino también a partir de hojas, ramas o tallos (considerados juntos o solos), así como incluso a partir de cultivos celulares de los mismos.

Gracias al método de la presente invención, se obtiene un aumento significativo en términos de rendimiento (5 % de guayulina A pura según el método de la presente invención con respecto a 1 % del método de Zoeller et al., 1994).

5 Mediante el método de la presente invención es posible usar y aprovechar la potencialidad de los productos obtenidos, recuperando así un material tradicionalmente considerado un material residual del procesamiento de plantas de guayule para obtener el caucho natural.

10 El método de la presente invención proporciona además una solución interesante a los problemas de obtención y accesibilidad de los compuestos isoprenoides no poliméricos de guayule poniendo a disponibilidad productos puros que pueden ser químicamente modificados para proporcionar un análogo estructural de posible interés en diversos campos de aplicación.

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa un diagrama de bloques completo de una realización del método de la presente invención, a partir de un extracto en bruto obtenido del bagazo de *Parthenium argentatum*. Los números entre paréntesis representan la cantidad de producto expresada en gramos.

20 La Figura 2 representa un diagrama de bloques de una realización del método de la presente invención, a partir de un extracto en bruto obtenido de ramas y tallo de *Parthenium argentatum*, que muestra la obtención de guayulina A, y argentatina A y B. Los números entre paréntesis representan la cantidad de producto expresada en gramos.

25 La Figura 3 representa un diagrama de bloques de una realización del método de la presente invención, a partir de un extracto en bruto obtenido de hojas de *Parthenium argentatum*, que muestra la obtención de guayulina A, y argentatina A y B. Los números entre paréntesis representan la cantidad de producto expresada en gramos.

30 La Figura 4 representa un diagrama de bloques parcial de una realización del método de la presente invención, que muestra la semisíntesis de guayulinas y argentatinas naturales inferiores a partir de los constituyentes isoprenicos superiores no poliméricos (guayulina A y argentatina B) separados y purificados por el método de la presente invención. Los números entre paréntesis representan el rendimiento en peso de los productos representados obtenidos por semisíntesis.

35 Descripción detallada de la invención

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a algunas realizaciones a modo de ejemplo solo, y no son limitantes de la presente invención.

40 Todos los porcentajes indicados se expresan como porcentajes en peso y todas las proporciones de las mezclas de disolventes se expresan como proporciones en volumen, a menos que se indique lo contrario.

EJEMPLO 1

45 Winterización del extracto en bruto de *Parthenium argentatum* (Figura 1)

Se disolvieron lentamente 108 g de extracto en bruto obtenido del bagazo de *Parthenium argentatum* con agitación continua a 40 °C en metanol (800 ml) usando un volumen de disolvente de 1,0 l/100 g de extracto en bruto.

50 Después de la disolución completa, se enfrió la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora y luego a 0 °C durante 24 horas. Se formó un precipitado compacto y luego se recuperó por filtración bajo 1,5 mbar.

Entonces se lavó con metanol el residuo que tenía una consistencia gomosa, se enfrió hasta 0 °C y se secó al aire a temperatura ambiente obteniéndose 44 g de grasas y cauchos con un bajo peso molecular.

55 Se recuperó la fracción líquida polar (aguas madre) que contenía la resina desgrasada para las etapas posteriores.

EJEMPLO 2

60 Reparto del tipo líquido-líquido de la resina (Figura 1)

Se diluyeron 800 ml de disolución de metanol obtenida del proceso de winterización, para separar el componente lipófilo de la resina en bruto, hasta un volumen final de 1 l con 200 ml de agua obtener una mezcla de metanol/agua 4:1.

65 La mezcla obtenida se sometió a un proceso de reparto con éter de petróleo (200 ml). Después de haber alcanzado

el equilibrio entre las fases, se separó la fase orgánica de la fase acuosa.

Esta última se extrajo otra vez con 200 ml de éter de petróleo durante 3 veces. Entonces se lavó la fase orgánica resultante con 200 ml de una mezcla de metanol/agua (4:1), se recuperó, se anhidrificó y se concentró a bajas presiones hasta el secado completo, obteniéndose así 7,7 g de producto.

El proceso de reparto se monitorizó por CCF (cromatografía en capa fina).

EJEMPLO 3

Reparto sólido-líquido del extracto apolar (Figura 1)

Se disolvieron 7,7 g del extracto apolar obtenido por el proceso de reparto líquido-líquido de 108 g de resina en bruto en 60 ml (~7 ml/g) de una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo 9 : 1 y se adsorbieron sobre un lecho de 200 ml de gel de sílice (70-230 de malla, 25 ml/g).

Se retiró el disolvente de la suspensión por evaporación a presión reducida o filtración a vacío, y se lavó tres veces la matriz sólida resultante con 100 ml de la mezcla de disolventes usada para la absorción.

Esta operación se llevó a cabo en un matraz de reacción según un método conocido por el experto en la técnica. Se evaporó la disolución de desabsorción, obteniéndose así una mezcla de guayulinas (5,0 g). Entonces se lavó la matriz sólida con 200 ml de acetato de etilo, recuperándose así argentatina B (2,3 g).

EJEMPLO 4

Reparto líquido-líquido de la fracción polar (Figura 1)

Se sometieron 1,2 l de disolución 4:1 de metanol/agua obtenida del primer proceso de reparto del tipo líquido-líquido descrito en el Ejemplo 2, a un proceso de reparto adicional con ciclohexano (200 ml).

Después de haber alcanzado el equilibrio entre las fases, se separó la fase orgánica de la fase acuosa. Esta última se extrajo otra vez con 200 ml de ciclohexano durante 3 veces.

Entonces se lavó la fase orgánica resultante con 200 ml de una mezcla de metanol/agua (4:1), se recuperó, se anhidrificó y se concentró a bajas presiones hasta el secado completo, obteniéndose así 5,25 g de extracto.

La fase de metanol del reparto, que comprende argentatins C y D, se extrajo con 200 ml de acetato de etilo durante 3 veces, se anhidrificó y se concentró a bajas presiones hasta el secado completo, obteniéndose así 1,77 g de extracto.

El proceso de reparto se monitorizó por CCF (cromatografía en capa fina).

EJEMPLO 5

Cristalización directa de guayulinas y argentatins (Figura 1)

a. Guayulina A: Se disolvieron 5,0 g de mezcla de guayulina obtenida por reparto del tipo sólido-líquido descrito en el Ejemplo 3, se disolvieron en 10 ml de n-hexano. Se obtuvo un precipitado copioso enfriando la disolución a -23 °C (baño de acetona y hielo seco), que luego se recuperó por filtración.

Se lavó el residuo con n-hexano a -23 °C hasta la obtención de un producto cristalino blanco identificado como guayulina A (3,2 g). IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3081, 2977, 2925, 2860, 1709, 1640, 1496, 1310, 1180, 927, 766, 708, 662, 563, 486 cm^{-1} . RMN ^1H (250 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1,08 (s, 1H), 1,13 (s, 1H), 1,55 (d, J = 1,2 Hz, 3H), 1,67 (d, J = 1,4 Hz, 3H), 2,79 (dd, J = 12,3, 5,3 Hz, 2H), 4,52 (d, J = 11,6 Hz, 1H), 4,92 (td, J = 11,1, 5,3 Hz, 2H), 5,12 (m), 6,43 (d, J = 16Hz, 1H), 7,40 (m, 3H), 7,50 (m, 2H). RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 166,2; 144,3; 135,8; 134,5; 130,1; 130,0; 128,8; 128,1; 128,0; 125,0; 118,7; 75,4; 42,9; 40,3; 32,9; 28,8; 28,5; 25,2; 21,4; 20,4; 16,5; 15,4.

Se recuperó el sobrenadante y se evaporó el disolvente a presiones reducidas obteniéndose así 1,3 g de una mezcla de guayulinas A y B.

b. Argentatina B: Se disolvieron 2,3 g de la fracción de argentatina obtenida por el reparto del tipo sólido-líquido descrito en el Ejemplo 3, se disolvieron en 10 ml de éter de petróleo. Se obtuvo un copioso precipitado enfriando la disolución a 0 °C (baño de hielo), que luego se recuperó por filtración.

Se lavó el residuo con éter de petróleo a 0 °C hasta la obtención de un producto cristalino blanco identificado como argentatina B (2,2 g). IR $\nu_{\text{máx}}$ (KBr): 3523, 3048, 2967, 2871, 2723, 1704, 1448, 1372, 1336, 1244, 1171, 1112,

1059, 910, 578 cm⁻¹. RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃); δ ppm: 4,55 (m, 1H), 3,56 (dd, 5, 5, 1H), 1,11 (s, 3H), 1,07 (s, 3H), 1,06 (s, 3H), 0,92 (s, 3H), 0,87 (d, 7, 3H), 0,85 (s, 3H), 0,83 (s, 3H), 0,51 (d, 5, 1H) y 0,31 (d, 5, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃); δ ppm: 18,83, 19,51, 20,8, 21,03, 21,12, 21,65, 22,24, 23,68, 24,06, 25,15, 26,25, 26,32, 26,42, 29,27, 29,78, 32,93, 33,62, 35,79, 37,66, 45,07, 46,06, 47,73, 48,67, 50,35, 57,61, 75,14, 80,14, 92,93, 217,00.

5 c. Argentatina A: Se disolvieron 5,25 g de extracto derivado de la fase orgánica obtenido por el proceso de reparto del tipo líquido-líquido descrito en el Ejemplo 4 en 30 ml de etil éter. Se enfrió la disolución a -23 °C (baño de acetona y hielo seco) y se añadió lentamente n-hexano en tanto que se observara una turbidez de la disolución con la consecuente precipitación de argentatina A.

10 Se recuperó por filtración el precipitado y entonces se sometió a lavados con etil éter y n-hexano para obtener un producto cristalino blanco.

15 Se obtuvieron 0,3 g de producto identificado como argentatina A. IR vmáx (KBr): 3386, 2966, 2870, 1705, 1462, 1380, 1249, 1175, 1051, 954, 890, 837 cm⁻¹. RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃); δ ppm: 3,83 (dd, 11,1H), 3,58 (m, 1H), 1,67 (s, 3H), 1,43 (s, 3H), 1,27 (s, 3H), 1,23 (s, 3H), 1,12 (s, 3H), 1,11 (s, 3H), 0,92 (s, 3H), 0,77 (d, 7, 1H), 0,43 (d, 7, 1H). RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃); δ ppm: 20,4, 20,9, 21,1, 21,5, 23,9, 25,6, 26,0, 26,2, 26,4, 26,7, 27,4, 30,2, 33,4, 37,4, 37,6, 46,6, 46,7, 47,8, 48,7, 50,3, 56,1, 70,9, 73,4, 87,2, 84,7, 216,1.

20 d. Argentatinas C y D: Se disolvieron 1,77 g de extracto derivado de la fase acuosa obtenida del proceso de reparto del tipo líquido-líquido descrito en el Ejemplo 4 en 10 ml de éter de petróleo.

25 Se obtuvo un precipitado blanco enfriando la disolución a -23 °C (baño de acetona y hielo seco), que luego se recuperó por filtración. El residuo se lavó con éter de petróleo a -23 °C hasta la obtención de un producto cristalino blanco identificado como argentatina D (0,54 g). IR vmáx (KBr): 3499, 3036, 2972, 2922, 2862, 1710, 1440, 1337, 1162, 1111, 1055, 913, 779, 564 cm⁻¹. RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃); δ ppm: 4,55 (m, 1H), 3,56 (dd, 5, 5, 1H), 3,44 (t a, 1H), 1,11 (s, 3H), 1,07 (s, 3H), 1,06 (s, 3H), 0,92 (s, 3H), 0,87 (d, 7, 3H), 0,85 (s, 3H), 0,83 (s, 3H), 0,51 (d, 5, 1H), 0,31 (d, 5, 1H). RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃); δ ppm: 18,83, 19,51, 20,85, 21,03, 21,12, 21,65, 22,24, 23,68, 24,06, 25,15, 26,25, 26,32, 26,42, 29,27, 29,78, 32,93, 33,62, 35,79, 37,66, 45,07, 46,06, 47,73, 48,67, 50,35, 57,61, 75,14, 78,9, 80,14, 92,93.

30 Se recuperó el sobrenadante derivado del proceso de purificación de la argentatina D y el disolvente se evaporó completamente a presiones reducidas. El residuo se disolvió en 10 ml de etil éter.

35 Se enfrió la disolución a -23 °C (baño de acetona y hielo seco) y se añadió lentamente n-hexano en tanto que se observara una turbidez de la disolución y la consecuente precipitación de argentatina C.

40 Se recuperó por filtración el precipitado y entonces se sometió a lavados con etil éter y n-hexano para obtener un producto cristalino blanco. Se recuperó el sobrenadante y se recristalizó para recuperar producto adicional.

45 Se obtuvieron 0,2 g de producto identificado como argentatina C. IR vmáx (KBr): 3346, 2936, 2870, 1714, 1455, 1373, 1288, 1167, 1098, 1064, 917, 732, 669, cm⁻¹. RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃); δ ppm: 4,55 (m, 1H), 3,58 (s, 2H), 3,56 (dd, 5, 5, 1H), 1,11 (s, 3H), 1,07 (s, 3H), 1,06 (s, 3H), 0,92 (s, 3H), 0,87 (d, 7, 3H), 0,85 (s, 3H), 0,83 (s, 3H), 0,51 (d, 5, 1H) 0,31 (d, 5, 1H).

EJEMPLO 6

Síntesis de los constituyentes isoprénicos menores a partir de los extractos (Figura 4)

50 A partir de la mezcla de guayulina obtenida como se describe en el Ejemplo 3 o de la guayulina A pura obtenida como se describe en el Ejemplo 5 o de sus aguas madre, fue posible obtener productos naturales contenidos en la resina por semisíntesis, en donde son difícilmente obtenibles por métodos no cromatográficos, debido a sus concentraciones más bajas.

55 a. Parteniol: Se obtuvo parteniol puro por reacción de hidrólisis básica a partir de la mezcla de guayulina obtenida del extracto en éter de petróleo/acetato de etilo 9:1 del proceso de reparto del tipo sólido/líquido o de guayulina A pura. Se añadieron 23,8 ml de una disolución básica de hidróxido potásico y metanol (5 % p/v; 425,4 mmoles; 60 eqv) y 510 µl de agua a 5,00 g de mezcla de guayulinas. La reacción se mantuvo con agitación a 40 °C durante 24 horas, monitorizando su progreso por CCF (*cromatografía en capa fina*). La reacción se detuvo por dilución con una disolución saturada de agua y cloruro sódico y se extrajo con éter de petróleo. Se anhidrificó la fase orgánica, se filtró y el disolvente se evaporó a presiones reducidas. Entonces se purificó el residuo (5,0 g) por cristalización en éter de petróleo a 0 °C (en un baño de hielo). Se obtuvo un producto cristalino blanco (2,6 g) identificado como parteniol o deacilguayulina. IR vmáx (KBr): 3294, 3014, 2976, 2924, 2854, 2730, 1654, 1454, 1204, 1004, 851, 655, 534 cm⁻¹. RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃); δ ppm: 0,73 (dd), 1,15 (s), 1,16 (s), 1,19 (s), 1,42 (dd), 1,44 (s), 1,63 (s), 3,6 (ddd), 4,36 (d), 4,91 (dd). RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃); δ ppm: 15,5, 16,5, 20,5, 20,8, 25,3, 28,8, 29,2, 36,0, 40,5, 46,3, 72,6, 125,3, 126,9, 129,2, 136,9.

b. Guayulina B: A una disolución de 100 mg de ácido anísico (masa molecular 152,15; 0,657 mmoles) disuelto en 2 ml de diclorometano, se añadieron 380 µl de una disolución al 98 % de cloruro de oxalilo en diclorometano (masa molecular 126,93; densidad 1,335 g/ml; 2,63 mmoles; 4 equivalentes) y 66 µl de DMF (100 µl/mmol de ácido) a 0 °C y con agitación durante 1 hora. La reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 2,5 horas adicionales, monitorizando así el desarrollo por CCF (*cromatografía en capa fina*). La reacción se detuvo por evaporación del disolvente a presiones reducidas obteniéndose así 100 mg de cloruro de anisoilo. Después, se añadieron 77 mg de cloruro de anisoilo (masa molecular 170,15; 0,454 mmoles; 1 equivalente) a una disolución de 100 mg de parteniol (masa molecular 220,35; 0,454 mmoles) disuelto en 6 ml de piridina. La reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 4 horas, monitorizándose así el desarrollo por CCF (*cromatografía en capa fina*). La reacción se detuvo por dilución con una disolución saturada de agua y cloruro sódico y se extrajo con éter de petróleo. Se anhidrificó la fase orgánica, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. Entonces se purificó el residuo por cristalización en éter de petróleo a 0 °C (en un baño de hielo). Se obtuvo un producto cristalino blanco (0,15 g), identificado como guayulina B. IR vmáx (KBr): 3504, 2932, 2854, 2790, 2657, 2123, 1707, 1606, 1449, 1359, 1166, 1045, 890, 770, 645, 539 cm⁻¹. RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃); δ ppm: 1,08 (s), 1,13 (s), 1,55 (d, J = 1,2 Hz, 3H), 1,67 (d, J = 1,41 Hz, 3H), 2,79 (dd, J = 12,3, 5,3 Hz, 2H), 3,85 (s), 4,52 (d, J = 11,6 Hz, 1H), 4,92 (td, J = 11,1, 5,3 Hz, 2H), 5,12 (m), 6,82 (d, J = 9 Hz, 1H), 7,95 (d, J = 9 Hz, 2H).

c. Argentatina D semisintética: A una disolución de 100 mg de argentatina B (masa molecular 456,70; 0,218 mmoles) obtenida por el reparto del tipo sólido-líquido descrito en el Ejemplo 4 o de las aguas madre derivadas del proceso de cristalización descrito en el Ejemplo 5, disuelta en 4 ml de metanol, se añadieron lentamente 25 mg de borohidruro de sodio NaBH₄ (masa molecular 37,83; 0,661 mmoles; 3,0 equivalentes), en un baño de hielo a 0 °C. La reacción se mantuvo con agitación a temperatura ambiente durante 5 minutos, monitorizando el desarrollo por CCF (*cromatografía en capa fina*). La reacción se detuvo por dilución con una disolución saturada de agua y cloruro sódico, adición de una disolución de agua y 5 % de ácido sulfúrico hasta pH neutro y extracción de la fase acuosa con acetato de etilo. Se anhidrificó la fase orgánica, se filtró y el disolvente se evaporó a presiones reducidas. Entonces se purificó el residuo por cristalización en éter de petróleo a 0 °C (en un baño de hielo). Se obtuvo un producto cristalino blanco (0,070 g) identificado como argentatina D. IR vmáx (KBr): 3499, 3036, 2972, 2922, 2862, 1710, 1440, 1337, 1162, 1111, 1055, 913, 779, 564 cm⁻¹. RMN ¹H (250 MHz, CDCl₃); δ ppm: 4,55 (m, 1H), 3,56 (dd, 5, 5, 1H), 3,44 (t a, 1H), 1,11 (s, 3H), 1,07 (s, 3H), 1,06 (s, 3H), 0,92 (s, 3H), 0,87 (d, 7, 3H), 0,85 (s, 3H), 0,83 (s, 3H), 0,51 (d, 5, 1H), 0,31 (d, 5, 1H). RMN ¹³C (75 MHz; CDCl₃); δ ppm: 18,83, 19,51, 20,85, 21,03, 21,12, 21,65, 22,24, 23,68, 24,06, 25,15, 26,25, 26,32, 26,42, 29,27, 29,78, 32,93, 33,62, 35,79, 37,66, 45,07, 46,06, 47,73, 48,67, 50,35, 57,61, 75,14, 78,9, 80,14, 92,93.

EJEMPLO 7

Material de planta: Extracto en bruto de ramas y tallos de *Parthenium argentatum* (Figura 2)

Se procesaron 3,89 g de extracto en bruto, obtenido de ramas y tallo de *Parthenium argentatum*, según la presente invención para separar guayulina A y argentatinas A y B. Tras el proceso de separación del componente lipófilo que comprende grasas y cauchos de bajo peso molecular, por el método de winterización, se llevaron a cabo los procesos de separación y cristalización directa con los mismos procedimientos descritos en los Ejemplos 2-6 y en relación con la cantidad del extracto en bruto usado. Se obtuvieron 1,7 g de mezcla lipófila de grasas y cauchos de bajo peso molecular y alto peso molecular (HMW), 0,15 g de guayulina A cristalina, 0,08 g de argentatina A, 0,18 g de argentatina B.

EJEMPLO 8

Material de planta: Extracto en bruto de hojas de *Parthenium argentatum* (Figura 3)

Se procesaron 4,6 g de extracto en bruto, obtenido de hojas de *Parthenium argentatum* italiana de Basilicata, según la presente invención, para separar el componente de guayulinas y las argentatinas A y B. Tras el proceso de separación del componente lipófilo que comprende grasas y cauchos de bajo peso molecular, por el método de winterización, se llevaron a cabo los procesos de reparto y cristalización directa con los mismos procedimientos descritos en los Ejemplos 2-6 y en relación con la cantidad del extracto en bruto usado. Se obtuvieron 0,30 g de mezcla de guayulinas, de los que por cristalización directa con n-hexano a -23 °C (baño de acetona y hielo seco) se obtuvieron 0,06 g de guayulina A cristalina, 0,06 g de argentatina A y 0,17 g de argentatina B.

EJEMPLO 9 (COMPARATIVO)

Reparto líquido-líquido de un extracto en bruto no winterizado de *Parthenium argentatum*

Se disolvieron lentamente con agitación continua 5,0 g de extracto en bruto obtenido de bagazo de *Parthenium argentatum* a 40 °C en metanol (400 ml) usando un volumen de disolvente de 1,0 l/100 g de extracto en bruto. Después de la disolución completa, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se diluyó hasta un volumen final de

500 ml con 100 ml de agua, obteniéndose una mezcla de metanol/agua (4:1).

La mezcla obtenida se sometió a un proceso de reparto con éter de petróleo (100 ml). Se añadieron adicionalmente 250 ml de mezcla de metanol/agua (4:1) a la mezcla, y finalmente se obtuvo el establecimiento de un equilibrio entre las fases; a partir de aquí se separó la fase orgánica de la fase acuosa.

Esta última se sometió otra vez a extracción con 100 ml de éter de petróleo durante seis veces. La fase orgánica resultante se lavó posteriormente con 200 ml de una mezcla de metanol/agua (4:1), se recuperó, se anhidrificó y se concentró a presión reducida hasta el secado completo, obteniéndose 2,5 g de producto. El proceso de reparto se monitorizó mediante CCF (*cromatografía en capa fina*).

EJEMPLO 10 (COMPARATIVO)

Reparto sólido-líquido del extracto apolar que deriva de un extracto en bruto no winterizado de *Parthenium argentatum*

Se disolvieron 2,5 g del extracto apolar obtenido del proceso de reparto líquido-líquido de 5,0 g de extracto en bruto obtenido como se describe en el Ejemplo comparativo 9 en 20 ml de una mezcla de éter de petróleo y acetato de etilo (9:1) y se adsorbieron sobre un lecho de 70 ml de gel de sílice (70-230 de malla, 25 ml/g). El disolvente se retiró de la suspensión por evaporación a presión reducida o por filtración a vacío, y la matriz de sólido resultante se lavó tres veces con 100 ml de la mezcla de disolventes usada para la adsorción.

El proceso resultó difícil e ineficaz, ya que no se pudo observar ninguna separación eficiente de los componentes del extracto apolar en bruto de partida, debido a la presencia de un componente que consiste en grasas y cauchos de bajo peso molecular, que afectaron negativamente el proceso de reparto sólido-líquido.

EJEMPLO 11 (COMPARATIVO)

Reparto líquido-líquido de la fracción polar que deriva de un extracto en bruto no winterizado de *Parthenium argentatum*

Se sometieron 950 ml de una disolución de metanol/agua (4:1) obtenida del primero proceso de reparto líquido-líquido descrito en el Ejemplo comparativo 9 a un proceso de reparto adicional con 100 ml de ciclohexano. Después del establecimiento de un equilibrio entre las fases, la fase orgánica se separó de la fase acuosa. Esta última se sometió nuevamente a extracción con 100 ml de ciclohexano, durante tres veces. La fase orgánica resultante se lavó posteriormente con 100 ml de una mezcla de metanol/agua (4:1), se recuperó, se anhidrificó y se concentró a baja presión hasta el secado completo, obteniéndose 300 mg de extracto. Se extrajo la fase de metanol del reparto, que comprendía las argentatinas C y D, con 100 ml de acetato de etilo durante tres veces, se anhidrificó y se concentró a baja presión hasta el secado completo, obteniéndose 100 mg de extracto.

EJEMPLO 12 (COMPARATIVO)

Cristalización de guayulinas y argentatinas de extractos que derivan de un extracto en bruto no winterizado de *Parthenium argentatum*

a. Guayulina A y argentatina B: Se disolvieron 2,5 g de extracto apolar obtenido del reparto líquido-líquido descrito en el Ejemplo comparativo 9, en 10 ml de n-hexano. Enfriando la disolución hasta -23 °C (en un baño de nieve carbónica/acetona) no se pudo observar la formación esperada de ningún precipitado de guayulina A y/o argentatina B.

b. Argentatina A: Se disolvieron 300 mg de extracto que deriva de la fase orgánica obtenida del proceso de reparto líquido-líquido descrito en Ejemplo comparativo 11, en 5 ml de etil éter. Se enfrió la disolución hasta -23 °C (en un baño de nieve carbónica/acetona) y se añadió lentamente n-hexano hasta que se observó una leve turbidez de la disolución, dando como resultado una precipitación ineficiente de argentatina A.

c. Argentatinas C y D: Se disolvieron 100 mg de extracto que derivaba de la fase acuosa obtenida del proceso de reparto líquido-líquido descrito en el Ejemplo comparativo 11, en 2 ml de éter de petróleo. Después de enfriar la disolución hasta -23 °C (en un baño de nieve carbónica/acetona), no se observó formación de precipitado.

Estos ejemplos comparativos demuestran claramente que omitir la crucial etapa de winterización del método de separación de la presente invención da como resultado una drástica reducción de su eficacia en la obtención de los constituyentes isoprénicos de guayule o resina de tipo guayule en forma purificada.

REIVINDICACIONES

1. Método para la separación de al menos un constituyente isoprénico de la resina de una planta de guayule y/o de tipo guayule que comprende las etapas de:
- 5 a) proporcionar una resina desgrasada de guayule y/o del tipo guayule;
- b) someter dicha resina desgrasada a reparto del tipo líquido-líquido con disolventes que son inmiscibles entre sí, obteniéndose así un extracto apolar que contiene los constituyentes isoprénicos guayulina A, guayulina B y argentatina B; y un extracto polar que contiene los constituyentes isoprénicos argentatina A, argentatina C y argentatina D; y
- 10 c) separar al menos un constituyente isoprénico de dicho extracto polar y/o de dicho extracto apolar así obtenido, en donde la etapa c) comprende una etapa en la que dicho extracto polar se somete a reparto del tipo líquido-líquido con disolventes inmiscibles entre sí y/o una etapa en la que dicho extracto apolar se somete a reparto del tipo sólido-líquido.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, en donde dicho al menos un constituyente isoprénico se elige del grupo que comprende guayulina A, guayulina B, argentatina A, argentatina B, argentatina C, argentatina D, y mezclas de las mismas.
- 20 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde dicha resina desgrasada de la etapa a) se obtiene por una etapa de desgrasado, más preferentemente una etapa de cristalización fraccionada, de un extracto en bruto de una planta de guayule o del tipo guayule.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde, en la etapa b), los disolventes inmiscibles con otros comprenden un disolvente polar y un disolvente apolar, en donde preferentemente el disolvente polar se elige del grupo que comprende agua, metanol, etanol, isopropanol, terc-butanol, acetato de etilo, y combinaciones de los mismos, más preferentemente una disolución de metanol y agua; y el disolvente apolar se elige de entre éter de petróleo, n-hexano y combinaciones de los mismos, más preferentemente éter de petróleo.
- 25 5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde, en la etapa c), el reparto del tipo sólido-líquido comprende las etapas de someter el extracto apolar obtenido en la etapa b), disuelto en una combinación de dos disolventes miscibles entre sí, a adsorción sobre una matriz sólida, preferentemente por atrapamiento selectivo; y de tratar, preferentemente aclarar, dicha matriz sólida así obtenida con una combinación de dos disolventes miscibles entre sí, obteniéndose así una disolución que contiene una mezcla de guayulina A y guayulina B, y una matriz sólida que contiene argentatina B.
- 30 6. Método según la reivindicación 5, en donde dicha matriz sólida que contiene argentatina B se somete a un tratamiento adicional, preferentemente aclarado con un disolvente polar, obteniéndose así una disolución de argentatina B.
- 40 7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde, en la etapa c), el reparto del tipo líquido-líquido comprende la etapa de someter el extracto polar obtenido en la etapa b) a separación en una combinación de un disolvente polar y un disolvente apolar, obteniéndose así una fase orgánica que contiene argentatina A y una fase acuosa que contiene una mezcla de argentatina C y argentatina D.
- 45 8. Método según la reivindicación 7, en donde en la etapa de reparto del tipo líquido-líquido de la etapa c), el disolvente apolar se elige del grupo que comprende ciclohexano, n-hexano, éter de petróleo, y combinaciones de los mismos, más preferentemente ciclohexano; y el disolvente polar se elige del grupo que comprende agua, metanol, etanol, isopropanol, terc-butanol, y combinaciones de los mismos, preferentemente metanol y agua.
- 50 9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde la etapa c) va seguida por al menos una etapa d) de purificación de al menos dicho constituyente isoprénico.
10. Método según la reivindicación 9, en donde la etapa d) de purificación comprende una etapa de cristalización de al menos un constituyente isoprénico, obteniéndose así al menos un constituyente isoprénico de la resina en forma cristalina sustancialmente pura.
- 55 11. Método según la reivindicación 9 o 10, en donde la etapa d) comprende una etapa d1) en donde dicha mezcla de guayulina A y guayulina B obtenida en la etapa c) se somete a precipitación de guayulina A mediante tratamiento con un disolvente apolar, preferentemente elegido del grupo que comprende éter de petróleo, n-hexano y combinaciones de los mismos, más preferentemente n-hexano, con enfriamiento, obteniéndose así un precipitado de guayulina A purificada y un sobrenadante que contiene una mezcla de guayulina A y guayulina B; y en donde preferentemente dicho precipitado de guayulina A purificada se somete a cristalización, obteniéndose así cristales de guayulina A pura.
- 60 12. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en donde dicha etapa d) comprende una etapa d2)
- 65

- 5 en donde dicha argentatina B obtenida en la etapa c) se somete a precipitación con un disolvente apolar, preferentemente elegido del grupo que comprende éter de petróleo, n-hexano y combinaciones de los mismos, más preferentemente éter de petróleo, con enfriamiento, obteniéndose así un precipitado de argentatina B purificada; y en donde preferentemente dicho precipitado de argentatina B purificada se somete a cristalización, obteniéndose así cristales de argentatina B pura.
- 10 13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde dicha etapa d) comprende una etapa d3) en donde dicha argentatina A obtenida en la etapa c) se somete a precipitación con un disolvente apolar, preferentemente elegido del grupo que comprende ciclohexano, n-hexano, etil éter, éter de petróleo, y combinaciones de los mismos, más preferentemente etil éter y n-hexano, con enfriamiento, obteniéndose así un precipitado de argentatina A purificada; y en donde preferentemente dicho precipitado de argentatina A purificada se somete a cristalización, obteniéndose así cristales de argentatina A pura.
- 15 14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en donde dicha etapa d) comprende una etapa d4) en donde dicha mezcla de argentatina C y argentatina D obtenida en la etapa c) se somete a precipitación de argentatina D con un disolvente apolar, preferentemente elegido del grupo que comprende éter de petróleo, n-hexano y combinaciones de los mismos, más preferentemente éter de petróleo, con enfriamiento, obteniéndose así un precipitado de argentatina D purificada y un sobrenadante que contiene argentatina C; y en donde preferentemente dicho precipitado de argentatina D purificada se somete a cristalización, obteniéndose así cristales de argentatina D pura.
- 20 15. Método según la reivindicación 14, en donde dicha etapa d4) va seguida por una etapa d5), en donde dicho sobrenadante que contiene argentatina C se somete a evaporación del disolvente y el residuo se disuelve en un disolvente apolar, preferentemente elegido del grupo que comprende ciclohexano, éter de petróleo, etil éter, n-hexano y combinaciones de los mismos, más preferentemente etil éter, con enfriamiento, obteniéndose así un precipitado de argentatina C purificada; y en donde preferentemente dicho precipitado de argentatina C purificada se somete a cristalización, obteniéndose así cristales de argentatina C pura.
- 25 16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 15, en donde dicha etapa c) va seguida por una etapa e1) que comprende una reacción de hidrólisis básica de la guayulina A obtenida en la etapa d1) y/o de la mezcla de guayulina A y guayulina B obtenida en la etapa c), obteniéndose así una disolución que contiene parteniol; en donde preferentemente dicha reacción de hidrólisis básica se lleva a cabo en una mezcla de reacción que comprende dicha guayulina A y/o dicha mezcla de guayulina A y guayulina B y una disolución básica; y en donde preferentemente dicha disolución que contiene parteniol se somete a cristalización, con enfriamiento, obteniéndose así parteniol puro.
- 30 35 17. Método según la reivindicación 16, en donde dicha etapa e1) va seguida por una etapa e2) de esterificación del parteniol así obtenido, preferentemente con ácido anísico o cloruro de anisoílo, obteniéndose así una disolución que contiene guayulina B.
- 40 45 18. Método según la reivindicación 17, en donde dicha disolución que contiene guayulina B así obtenida en la etapa e2) se somete a evaporación y el residuo se disuelve en un disolvente apolar, preferentemente elegido del grupo que comprende ciclohexano, n-hexano, etil éter, éter de petróleo y combinaciones de los mismos, más preferentemente éter de petróleo, obteniéndose así un precipitado de guayulina B purificada; y en donde preferentemente dicho precipitado de guayulina B purificada se somete a cristalización, con enfriamiento, obteniéndose así cristales de guayulina B pura.
- 50 19. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 18, en donde dicha etapa c) va seguida por una etapa e3) que comprende una reacción de reducción de la argentatina B obtenida en la etapa c) y/o en la etapa d2), preferentemente en donde la reacción de reducción se lleva a cabo en una mezcla de reacción que comprende dicha argentatina B e hidruro de litio y aluminio LiAlH_4 o borohidruro de sodio, más preferentemente borohidruro de sodio NaBH_4 , obteniéndose así una disolución que contiene argentatina D.
- 55 20. Método según la reivindicación 19, en donde, tras dicha reacción de reducción, dicha disolución que contiene argentatina D así obtenida se somete a evaporación y el residuo se disuelve en un disolvente apolar, preferentemente elegido del grupo que comprende ciclohexano, etil éter, n-hexano, éter de petróleo y combinaciones de los mismos, más preferentemente éter de petróleo, obteniéndose así un precipitado de argentatina D purificada; y en donde preferentemente dicho precipitado de argentatina D purificada se somete a cristalización, con enfriamiento, obteniéndose así cristales de argentatina D pura.

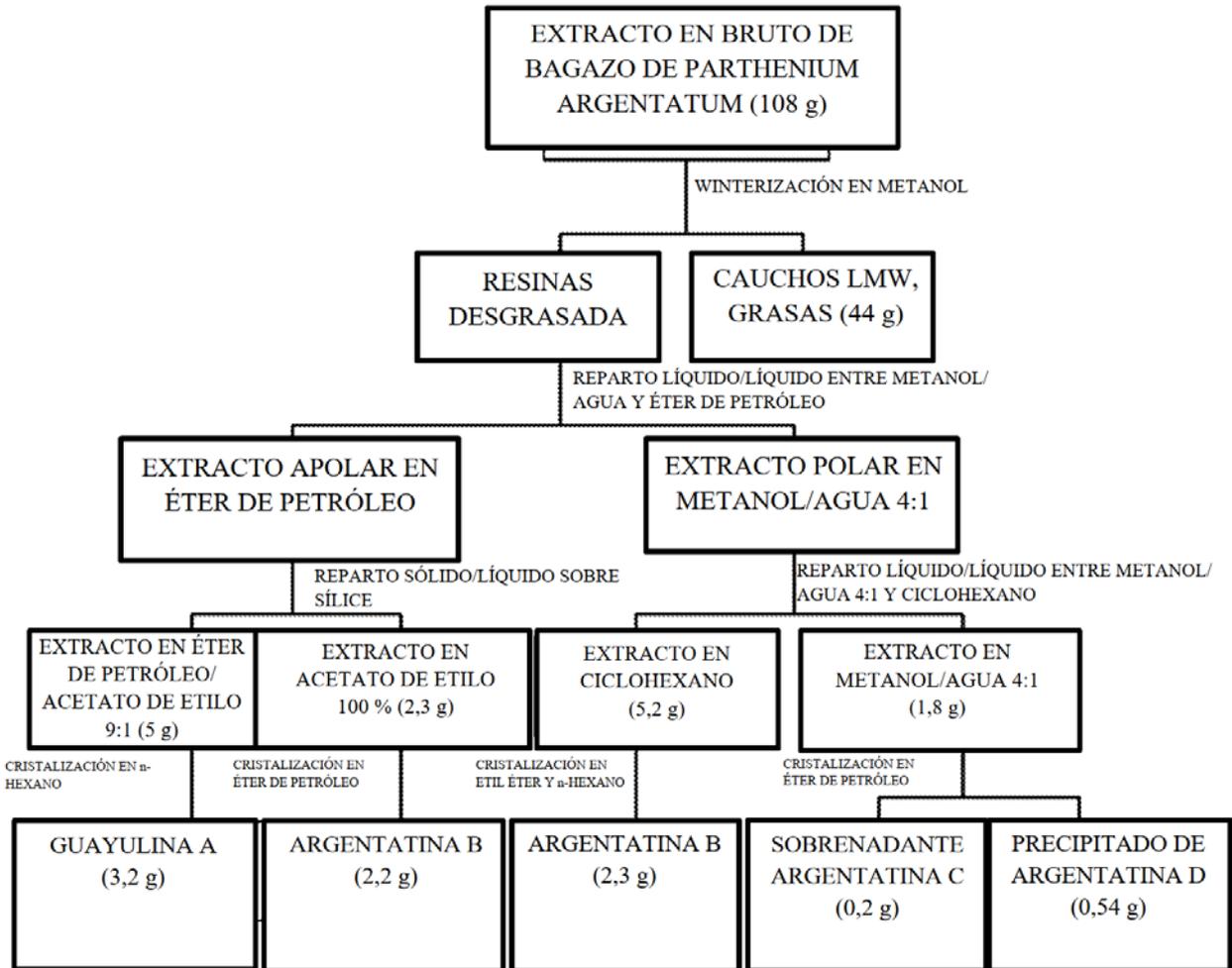


Fig. 1

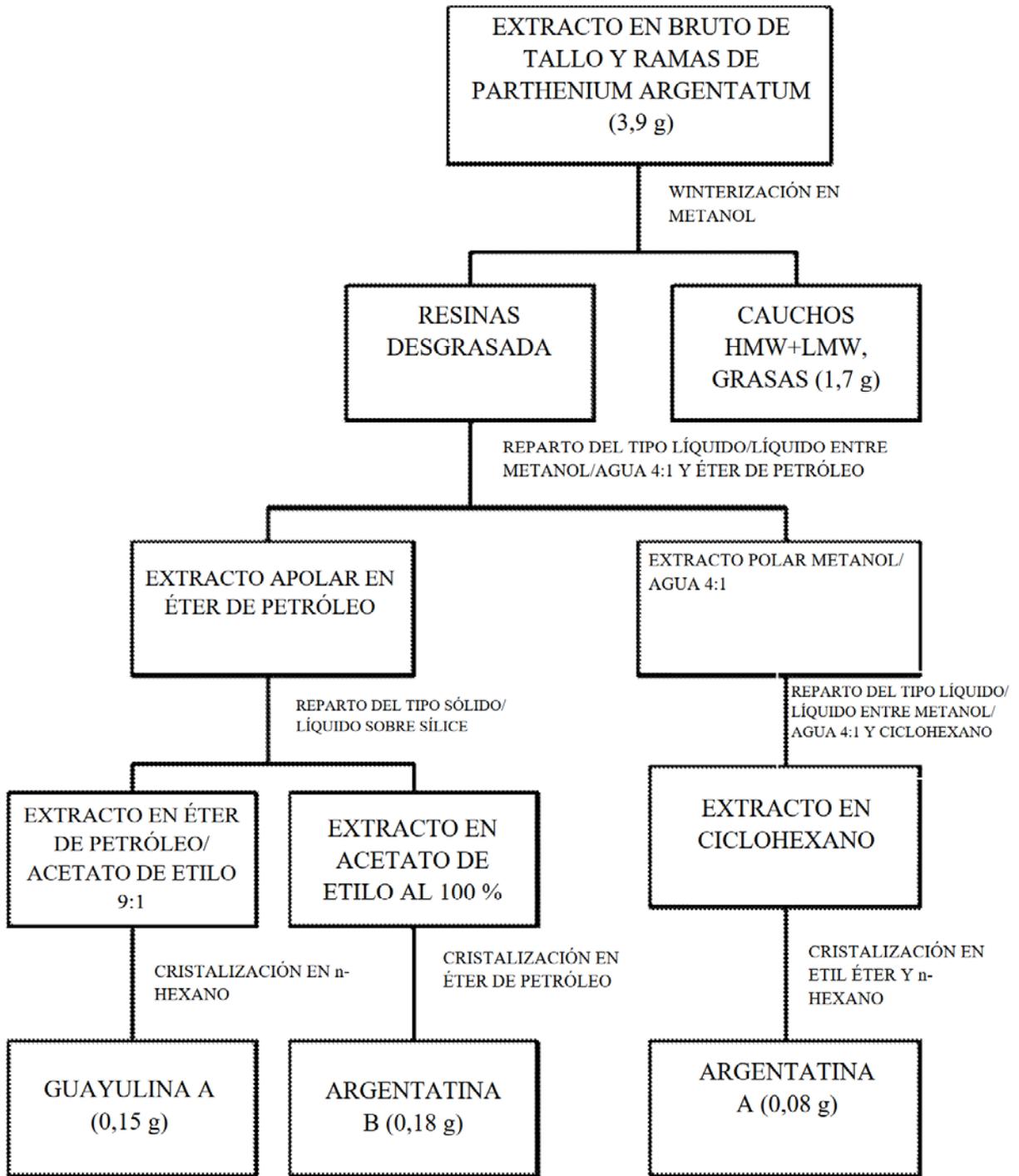


Fig. 2

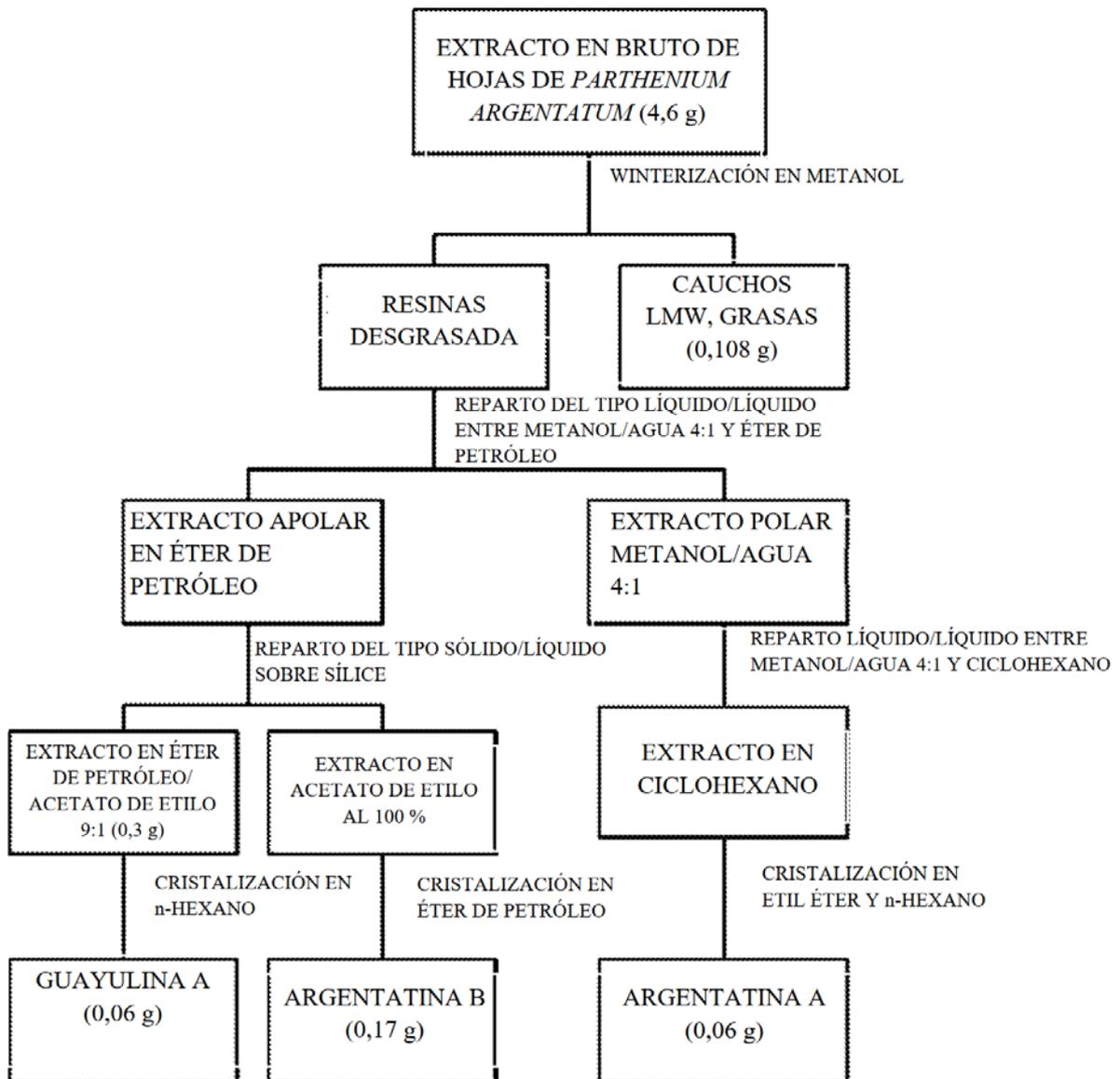


Fig. 3

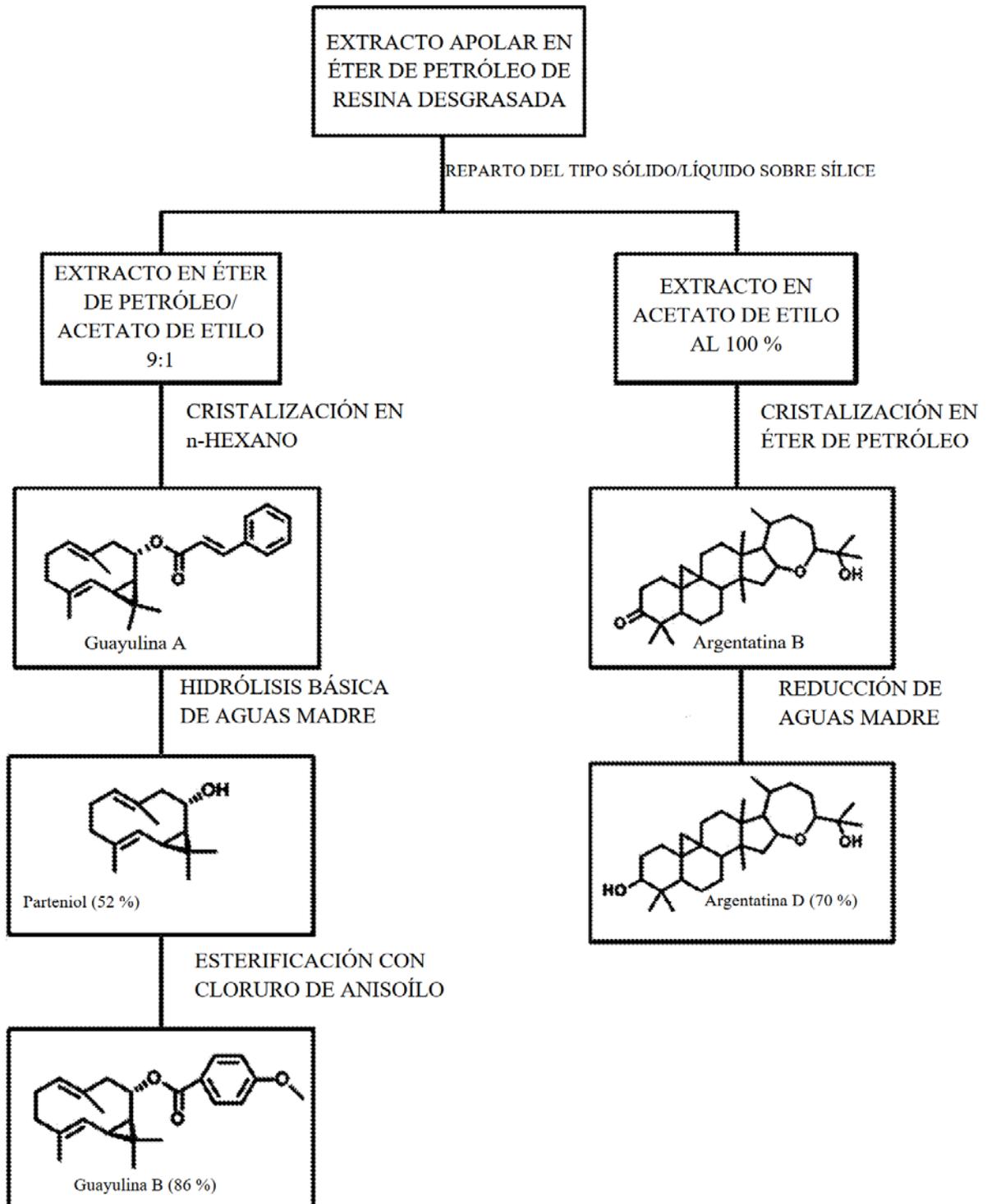


Fig. 4