



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102015000040937
Data Deposito	31/07/2015
Data Pubblicazione	31/01/2017

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	C	67	56

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	C	67	58

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	C	69	618

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	C	69	92

Titolo

Metodo per la separazione dei costituenti isoprenici del guayule.

Metodo per la separazione dei costituenti isoprenici
del guayule

DESCRIZIONE

5

Campo di applicazione

La presente invenzione si riferisce in generale al settore dell'industria dell'estrazione e lavorazione della gomma, in particolare della gomma di guayule e/o 10 del tipo guayule, più in particolare nel settore del recupero dei suoi prodotti di scarto.

In particolare l'invenzione riguarda un metodo di separazione dei costituenti isoprenici dalla resina di guayule o del tipo guayule, tra cui le guayuline A e B, 15 e le argentatine A, B, C e D.

Arte nota

Il guayule (*Partenium argentatum*) è un arbusto perenne originario delle regioni semiaride del Messico 20 del nord e del Texas.

Esso ha un contenuto in gomma poliisoprenica 1,4-cis variabile in dipendenza di vari fattori e compreso tra il 5 e il 20% circa sulla pianta secca. Dati gli elevati costi d'importazione della gomma estratta da 25 altre fonti naturali come *l'Hevea brasiliensis*, il guayule fu preso in considerazione già prima della seconda guerra mondiale, sia negli Stati Uniti che in Italia, come fonte alternativa di gomma naturale.

La gomma di guayule si differenzia da quella 30 dell'*Hevea brasiliensis* per alcuni aspetti fondamentali tra i quali il più rilevante risulta quello riferito ad un contenuto proteico significativamente inferiore e

tale da conferire alla gomma naturale caratteristiche di ipoallergenicità. L'allergia da lattice di *Hevea* è causata infatti da una proteina chiamata pro-heveina che nella pianta possiede un ruolo per la coagulazione del lattice; essa si lega all'epitopo heveina presente sulle IgE scatenando la risposta immunitaria che si manifesta in una serie di reazioni allergiche cutanee e respiratorie.

Altre piante idonee per l'estrazione di gomma simile a quella estratta dal guayule comprendono ad esempio *Euphorbia lathyris*, *Parthenium incanum*, *Chrysanthemus nauseosus*, *Pedilanthus macrocarpus*, *Cryptostegia grandiflora*, *Asclepias syriaca*, *Asclepias speciosa*, *Asclepias subulata*, *Solidago altissima*, *Solidago grammifolia*, *Solidago rigida*, *Cacalia atriplicifolia*, *Taraxacum koksaghyz*, *Pycnanthemum incanum*, *Teucrium canadense*, *Campanula americana*. Altre piante ancora appartengono ai generi delle Asteraceae (Compositae), Euphorbiaceae, Campanulaceae, Labiateae e Moraceae.

Oggi il guayule non viene più considerato solo come una possibile fonte di gomma naturale ipoallergenica e soprattutto negli ultimi anni sono stati condotti numerosi studi volti allo sviluppo di metodi e tecnologie tali da consentire una valorizzazione completa di tutte le componenti della pianta, tra cui la resina.

La resina del guayule, prodotta in quantità comparabili se non superiori alla gomma, può essere impiegata infatti in diversi utilizzi tra i quali, a titolo di esempio, la fabbricazione di adesivi e la produzione di pannelli in legno resistenti all'attacco

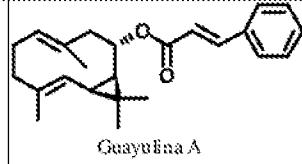
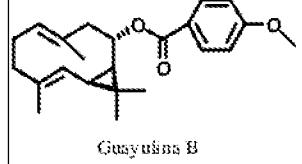
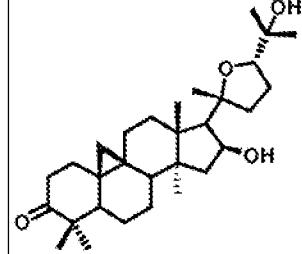
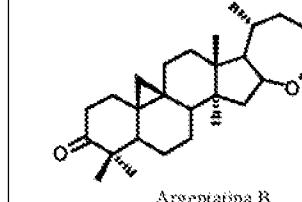
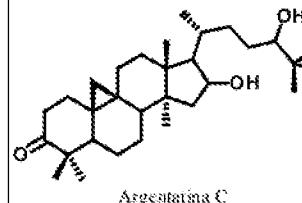
di parassiti, mentre la biomassa residuale del guayule dopo estrazione della gomma naturale e/o della resina può essere utilizzata nella fabbricazione di pellets e briquette combustibili e come fonte di zuccheri cosiddetti di seconda generazione (dalle frazioni cellulosiche ed emicellulosiche di detta biomassa residuale) fermentabili poi a bio-ethanolo e/o bio-carburanti.

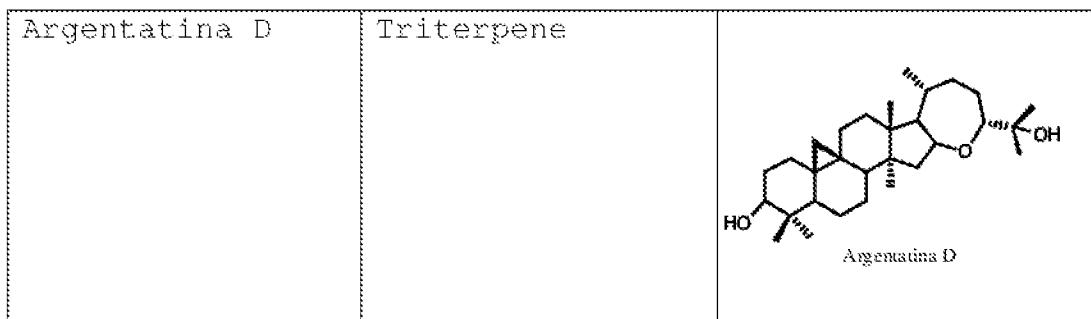
La resina prodotta dalla pianta del guayule, così come da altre piante da cui si ricava una gomma e una resina simile a quella del guayule, tra cui quelle elencate sopra, è ricca di metaboliti secondari tra i quali i costituenti isoprenici appartenenti alla famiglia dei terpeni (si veda la Tabella 1). Le guayuline sono composti sesquiterpenici di potenziale interesse per l'industria essenziera e per la produzione di feromoni di insetti, le argentatine invece sono composti triterpenici di potenziale attività antiossidante ed antitumorale. Le tecniche di lavorazione del guayule finora sviluppate sono prevalentemente focalizzate sui processi di estrazione della gomma naturale poliisoprenica 1,4-cis e della resina grezza, sul loro trattamento e su processi di conservazione della biomassa.

25

Tabella 1: Costituenti isoprenici di interesse

Costituente	Classificazione	Struttura molecolare

Guayulina A	Sesquiterpene	 Guayulina A
Guayulina B	Sesquiterpene	 Guayulina B
Argentatina A	Triterpene	 Argentatina A
Argentatina B	Triterpene	 Argentatina B
Argentatina C	Triterpene	 Argentatina C



Sullo specifico tema della resina del guayule (o simili) ed ancora più in particolare dei suoi costituenti, non sono finora stati condotti studi 5 dettagliati, sia in ragione della natura di biomassa considerata di scarto dalla lavorazione della gomma naturale ma soprattutto per la difficoltà di accedere ai suoi costituenti in forma pura e con sistemi semplici ed economici.

10 I metodi finora noti prevedono infatti l'impiego di processi di purificazione di tipo cromatografico (a colonna) che risultano essere costosi oltre che difficoltosi per uno scale-up e successiva realizzazione industriale. La difficoltà nella 15 separazione e nella purificazione sta nel fatto che la resina è costituita da una miscela complessa di composti di diversa natura che comprende, oltre a metaboliti quali grassi, cere e gomme a basso peso molecolare, anche un certo numero di metaboliti 20 secondari di natura isoprenica.

Schloman et al. (1983) descrivono la quantificazione di guayuline e argentatine a partire nella resina della pianta del guayule (*Parthenium argentatum*). Le guayuline sono state recuperate 25 mediante saponificazione con distillazione "short path"

seguita da cristallizzazione. La quantificazione è stata eseguita mediante metodi di cromatografia (HPLC) (Schloman, W. W., Jr.; Hively, R. A.; Krishen, A.; Andrews, A.M. Guayule byproduct evaluation: extract 5 characterization *J. Agric. Food Chem.* 1983, 31, 873-876).

Un metodo di ottenimento delle guayuline A e B è stato descritto da Zoeller (1994) e utilizza tecniche cromatografiche (Zoeller, Jr.J.H., Wagner, J.P., 10 Sulikowski, G.A. Concise multigram purification of guayulin A from guayule. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 1647-1649). Questo metodo consiste in diversi passaggi: estrazione della resina del guayule mediante due processi di estrazione in apposito reattore con 15 acetone a riflusso per un'ora; concentrazione dell'estratto grezzo fino a completo allontanamento del solvente per evaporazione; separazione delle gomme a basso peso molecolare, in cui l'estratto grezzo viene disciolto in etile acetato e sottoposto a ripartizione 20 liquido/liquido con brine, seguita da anidrificazione della fase organica e allontanamento del solvente per evaporazione sottovuoto fino ad ottenere un composto oleoso verde; frazionamento cromatografico della resina mediante cromatografia gravimetrica su gel di silice; 25 purificazione cromatografica della guayulina A con un ulteriore processo di cromatografia gravimetrica su gel di silice. Si ottiene, dopo concentrazione delle frazioni raccolte, un precipitato di guayulina A come solido bianco puro con resa del 1% sull'estratto grezzo 30 ed una miscela di guayulina A e B. La separazione o l'isolamento delle argentatine non è prevista da questo metodo.

Il suddetto metodo descritto da Zoeller et al., 1994, presenta alcuni svantaggi, tra i quali le basse rese di ottenimento di guayuline pure. La guayulina A pura è infatti ottenuta con una resa del 1% sull'estratto grezzo mentre la guayulina B è ottenuta in miscela con la guayulina A e risulta di difficile purificazione.

Altro svantaggio del metodo è costituito dalla purificazione di uno solo dei suoi costituenti, ovvero la guayulina A.

La guayulina B è stata invece ottenuta in forma pura da Firestone Tire and Rubber Co., ma con una resa del solo 0,4% dalla resina, mediante tecniche cromatografiche (Singh, M. Bagwa Guayule resin separation and purification M.S. Thesis, Texas A&M University, Department of Nuclear Engineering, Dec 1992).

Il problema tecnico alla base della presente invenzione è quindi quello di mettere a disposizione un metodo pratico, economico, versatile, scalabile e ad alta resa per la separazione di costituenti isoprenici dalla resina di una pianta di guayule, in particolare guayulina A, guayulina B, argentatina A, argentatina B, argentatina C e/o argentatina D.

25

Sommario dell'invenzione

Un simile problema è stato risolto secondo l'invenzione da un metodo per la separazione di almeno un costituente isoprenico dalla resina di una pianta di guayule e/o del tipo guayule che comprende le fasi di:

- 30 a) mettere a disposizione una resina degrassata di

guayule e/o del tipo guayule;

b) sottoporre la resina degrassata a ripartizione di tipo liquido-liquido con solventi tra loro immiscibili con l'ottenimento di un estratto apolare contenente i 5 costituenti isoprenici guayulina A, guayulina B e argentatina B; e un estratto polare contenente i costituenti isoprenici argentatina A, argentatina C e argentatina D; e

c) separare almeno un costituente isoprenico da tale 10 estratto polare e/o da detto estratto apolare così ottenuti, in cui la fase c) comprende una fase in cui l'estratto polare viene sottoposto a ripartizione di tipo liquido-liquido con solventi tra loro immiscibili e/o una fase in cui detto estratto apolare viene 15 sottoposto a ripartizione di tipo solido-liquido.

Con l'espressione "resina degrassata" si intende qui un estratto resinoso della pianta di guayule sostanzialmente priva di cere, grassi e gomme a basso peso molecolare.

20 Con l'espressione "ripartizione di tipo liquido-liquido" e "ripartizione liquido-liquido" si intende qui un processo di separazione di uno o più composti presenti in una miscela complessa che sfrutta la diversa solubilità dei composti da separare in due 25 solventi immiscibili tra loro.

Con l'espressione "ripartizione di tipo liquido-solido" e "ripartizione liquido-solido" si intende qui l'operazione di estrazione basata sull'affinità di una fase solida per uno o più costituenti presenti in una 30 miscela complessa.

Nella ripartizione (o estrazione) di tipo liquido-solido (comunemente indicata con l'acronimo SPE, dal

nome inglese solid-phase extraction) si sfrutta infatti la distribuzione dei costituenti tra una fase liquida ed una fase solida insolubile nella soluzione con la quale è posta a contatto. Dopo il contatto per un 5 periodo di tempo opportuno, la fase liquida viene rimossa ed i composti adsorbiti sulla fase solida, possono essere recuperati tramite l'impiego di una soluzione estraente.

Preferibilmente, detto almeno un costituente 10 isoprenico (indicato anche come isoprenoide non polimerico) è scelto nel gruppo che comprende guayulina A, guayulina B, argentatina A, argentatina B, argentatina C, argentatina D, e loro miscele.

Preferibilmente, in fase a) la resina degrassata è 15 ottenuta da piante di guayule o del tipo guayule, più preferibilmente da una o più piante scelte nel gruppo che comprende *Parthenium argentatum*, *Euphorbia lathyris*, *Parthenium incanum*, *Chrysanthemus nauseosus*, *Pedilanthus macrocarpus*, *Cryptostegia grandiflora*, 20 *Asclepias syriaca*, *Asclepias speciosa*, *Asclepias subulata*, *Solidago altissima*, *Solidago grammifolia*, *Solidago rigida*, *Cacalia atriplicifolia*, *Taraxacum koksaghyz*, *Pycnanthemum incanum*, *Teucreum canadense* e 25 *Campanula americana*, preferibilmente *Parthenium argentatum*.

La resina degrassata di fase a) può essere ottenuta a partire da una pianta fresca o essiccata, naturale o coltivata in vitro.

In una forma di realizzazione, la resina 30 degrassata di fase a) è ottenuta a partire da un estratto grezzo della pianta intera.

In una forma di realizzazione alternativa, la

resina degrassata di fase a) è ottenuta a partire da un estratto grezzo di uno o più tra i rami, il fusto, e le foglie della pianta.

In una ulteriore forma di realizzazione 5 alternativa, la resina degrassata di fase a) è ottenuta a partire da un estratto grezzo della bagassa.

Con il termine "estratto grezzo" si intende qui la frazione della pianta di guayule o del tipo guayule contenente la resina che si ottiene in seguito al 10 trattamento della pianta, solitamente con solventi, al fine di separare dai componenti ligno-cellulosici la frazione desiderata della pianta contenente la resina.

Con il termine "bagassa" si intende la biomassa residua derivante dai processi di estrazione della 15 gomma naturale del guayule.

Preferibilmente, la resina degrassata di fase a) è ottenuta mediante una fase di degrassazione, più preferibilmente una fase di cristallizzazione frazionata (detta anche "winterizzazione") di un 20 estratto grezzo di una pianta di guayule o del tipo guayule.

Vantaggiosamente, a seguito della fase di degrassazione, la resa di resina degrassata, espressa in percentuale del peso secco della resina rispetto al 25 peso secco dell'estratto grezzo, è compreso tra 50 e 70%, più preferibilmente 60% circa. Preferibilmente, la fase di cristallizzazione frazionata (o "winterizzazione") comprende un trattamento a temperatura compresa tra 30 e 50 °C, più preferibilmente 40 °C, dell'estratto grezzo con un solvente, preferibilmente con agitazione fino alla sostanziale completa dissoluzione dell'estratto grezzo;

e successivo raffreddamento, preferibilmente a una temperatura di circa 0°C, con l'ottenimento della separazione di una componente apolare, che comprende cere, grassi e gomme a basso peso molecolare, da una 5 componente polare (dette anche "acque madri") comprendente la resina degrassata.

Preferibilmente, nella fase di cristallizzazione frazionata, il solvente è scelto tra metanolo, acqua, etanolo, metanolo, acetone e loro combinazioni, 10 preferibilmente metanolo.

Preferibilmente, nella fase di cristallizzazione frazionata, l'estratto grezzo si trova in sospensione nel solvente in un rapporto, espresso in peso secco (g) dell'estratto grezzo rispetto al volume (l) del 15 solvente compreso tra 50 e 150 g/l, più preferibilmente di 100 g/l.

Preferibilmente la fase b) è preceduta da una fase di concentrazione della resina degrassata a un volume, espresso in percentuale del volume sul volume della 20 resina prima della concentrazione, compreso tra 5 e 20% (v/v), più preferibilmente compreso tra 5 e 10% (v/v).

Preferibilmente, in detta fase b), la ripartizione del tipo liquido-liquido viene condotta a una temperatura compresa tra 15°C e 26°C, più 25 preferibilmente a 20°C.

Preferibilmente, in detta fase b), i solventi tra loro immiscibili comprendono un solvente polare e un solvente apolare.

Preferibilmente, in fase b) il solvente polare è 30 scelto nel gruppo che comprende acqua, metanolo, etanolo, isopropanolo, terbutanolo, etil acetato, e loro combinazioni, più preferibilmente una soluzione di

metanolo e acqua, più preferibilmente in rapporto volumetrico tra metanolo e acqua compreso tra 2:1 e 6:1, più preferibilmente tra 3:1 e 5:1, ancora più preferibilmente di 4:1 circa; e il solvente apolare è 5 scelto tra petroletere, n-esano e loro combinazioni, più preferibilmente petroletere.

Preferibilmente, il solvente polare è presente in un rapporto volumetrico rispetto al solvente apolare compreso tra 2:1 e 8:1, più preferibilmente tra 4:1 e 10 5:1.

Preferibilmente, la fase b) di sottoporre la resina degrassata a ripartizione è ripetuta una o più volte.

Preferibilmente, la fase b) comprende una fase di 15 essiccamiento dell'estratto apolare così ottenuto, più preferibilmente a una pressione compresa tra 1,5 mbar e 2,0 mbar e a una temperatura compresa tra 25°C e 35°C.

Preferibilmente, la resa della somma di guayulina A, guayulina B e argentatina B nell'estratto apolare 20 ottenuto in fase b), espresso in percentuale in peso secco rispetto al peso secco della resina degrassata di fase a) è di almeno 10,0% più preferibilmente di almeno 12,0%.

Preferibilmente, la resa della somma di 25 argentatina A, argentatina C e argentatina D nell'estratto polare ottenuto in fase b), espresso in percentuale in peso secco rispetto al peso secco della resina degrassata di fase a) è di almeno 6,0%, più preferibilmente di almeno 11,0%.

30 Preferibilmente, in fase c), l'almeno un costituente isoprenico è scelto tra guayulina A, guayulina B, argentatina B o loro miscele e la fase c)

comprende una fase di sottoporre l'estratto apolare ottenuto in fase b) a ripartizione di tipo solido-liquido.

Preferibilmente, in fase c), la ripartizione di tipo solido-liquido comprende le fasi di sottoporre l'estratto apolare ottenuto in fase b), sciolto in una combinazione di due solventi tra loro miscibili, ad adsorbimento su una matrice solida, più preferibilmente per intrappolamento selettivo; e di trattamento, più preferibilmente lavaggio, della matrice solida così ottenuta con una combinazione di due solventi tra loro miscibili, con l'ottenimento di una soluzione contenente una miscela di guayulina A e guayulina B, e una matrice solida contenente argentatina B.

Preferibilmente, il trattamento della matrice solida così ottenuta viene eseguita con una combinazione di solventi che è la medesima della combinazione di solventi della fase di adsorbimento su matrice solida.

Preferibilmente, la fase di adsorbimento su matrice solida è seguita da evaporazione della combinazione di solventi.

Preferibilmente, l'adsorbimento su matrice solida viene eseguito in un pallone di reazione o su un supporto filtrante, più preferibilmente in un pallone di reazione.

Preferibilmente, l'adsorbimento su matrice solida viene eseguito a pressione compresa tra 1,0 mbar e 2,5 mbar, più preferibilmente tra 1,5 mbar e 2,0 mbar e a una temperatura compresa tra 25°C e 35°C, più preferibilmente tra 28°C e 32 °C.

Preferibilmente, la matrice solida è scelta nel

gruppo che comprende: gel di silice base, gel di silice legati a idrocarburi aventi gruppi alchilici da Cs a C18 (ossia a fase inversa), gel di silice legati a gruppi cianidrici o equivalenti, gel di silice legati a gruppi fenilalchilici o equivalenti, e loro combinazioni, più preferibilmente gel di silice base.

Preferibilmente, nella ripartizione di tipo solido-liquido di fase c), la combinazione di solventi è una combinazione di un solvente polare e un solvente apolare, più preferibilmente in un rapporto volumetrico del solvente apolare rispetto al solvente polare compresa tra 4:1 e 49:1, più preferibilmente tra 5,5:1 e 19:1, ancora più preferibilmente di circa 9:1.

Preferibilmente, la matrice solida presenta dimensioni della maglia (mesh) comprese tra 70 e 230.

Preferibilmente, il rapporto, espresso in percentuale in volume sul volume, tra la combinazione di solventi e la matrice solida è compresa tra 1:5 e 1:2, più preferibilmente tra 1:4 e 1:3.

Preferibilmente, nella ripartizione di tipo solido-liquido di fase c), nella combinazione di solventi, i solventi sono uniti all'estratto apolare ottenuto in fase b) in un rapporto, espresso in volume di combinazione di solventi rispetto al peso secco dell'estratto apolare, compreso tra 5 e 9 ml/g, più preferibilmente 7 ml/g.

Preferibilmente, nella ripartizione di tipo solido-liquido di fase c), il solvente polare è scelto nel gruppo che comprende: etanolo, metanolo, acetone, acido acetico, etil acetato, acetonitrile, diclorometano, e loro combinazioni; e il solvente apolare è scelto nel gruppo che comprende: petrolettere

e n-esano e loro combinazioni.

Preferibilmente, la resa della miscela di guayulina A e guayulina B nella soluzione contenente la miscela di guayulina A e guayulina B ottenuta in fase 5 c), espressa in percentuale in peso secco rispetto al peso secco della resina degrassata di fase a) è di almeno 5,0%, più preferibilmente di almeno 8,0%.

Preferibilmente, la resa di argentatina B nella matrice solida ottenuta in fase c), espressa in 10 percentuale in peso secco rispetto al peso secco della resina degrassata di fase a) è di almeno 2,0%, più preferibilmente di almeno 3,2%.

Preferibilmente, la matrice solida contenente 15 argentatina B viene sottoposta a un ulteriore trattamento, preferibilmente lavaggio con un solvente polare, con l'ottenimento di una soluzione di argentatina B.

Preferibilmente, nell'ulteriore trattamento della matrice solida, il solvente polare è scelto nel gruppo 20 che comprende etanolo, metanolo, acetone, acido acetico, etil acetato, acetonitrile, diclorometano, e loro combinazioni, preferibilmente acetato di etile.

Preferibilmente, l'ulteriore trattamento della matrice solida viene eseguito a una temperatura 25 compresa tra 15°C e 30°C, più preferibilmente compresa tra 20°C e 25°C.

Preferibilmente, l'ulteriore trattamento della matrice solida è seguito da una fase di filtrazione ed essiccazione della soluzione di argentatina B così 30 separata.

Preferibilmente, in fase c), l'almeno un costituente isoprenico è scelto tra argentatina A,

argentatina C, argentatina D o loro miscele e la fase c) comprende una fase di sottoporre l'estratto polare ottenuto in fase b) a ripartizione di tipo liquido-liquido.

5 Preferibilmente, in fase c), la ripartizione di tipo liquido-liquido comprende la fase di sottoporre l'estratto polare ottenuto in fase b) a separazione in una combinazione di un solvente polare e un solvente apolare con l'ottenimento di una fase organica 10 contenente argentatina A e una fase acquosa contenente una miscela di argentatina C e argentatina D.

Preferibilmente, nella ripartizione di tipo liquido-liquido di fase c), il solvente apolare e il solvente polare sono in un rapporto volumetrico del 15 solvente apolare rispetto al solvente polare compreso tra 1:2 e 1:8, più preferibilmente tra 1:5 e 1:7, ancora più preferibilmente di circa 1:6.

Preferibilmente, in fase c), la fase di ripartizione di tipo liquido-liquido è ripetuta una o 20 più volte.

Preferibilmente, nella fase di ripartizione liquido-liquido di fase c), il solvente apolare è scelto nel gruppo che comprende cicloesano, n-esano, petroletere e loro combinazioni, più preferibilmente 25 cicloesano.

Preferibilmente, nella fase di ripartizione di tipo liquido-liquido di fase c), il solvente polare è scelto nel gruppo che comprende acqua, metanolo, etanolo, isopropanolo, tertbutanolo, e loro 30 combinazioni, preferibilmente metanolo e acqua.

Preferibilmente, nella fase di ripartizione liquido-liquido di fase c), il solvente polare

comprende il solvente di sospensione dell'estratto polare ottenuto in fase b).

Preferibilmente, nella fase di ripartizione liquido-liquido di fase c), la ripartizione liquido-5 liquido è preceduta da una fase di concentrazione dell'estratto polare ottenuto in fase b).

Preferibilmente, la fase organica contenente argentatina A così ottenuta viene essiccata.

Preferibilmente, la fase acquosa contenente una 10 miscela di argentatina C e argentatina D viene ulteriormente trattata con un solvente polare e più preferibilmente essiccata.

Preferibilmente, la resa di argentatina A nella 15 fase organica ottenuta in fase c), espressa in percentuale in peso secco rispetto al peso secco della resina degrassata di fase a) è di almeno 3,0%, più preferibilmente di almeno 8,0%.

Preferibilmente, la resa di miscela di argentatina 20 C e argentatina D nella fase acquosa ottenuta in fase c), espressa in percentuale in peso secco rispetto al peso secco della resina degrassata di fase a) è di almeno 0,5%, più preferibilmente di almeno 3,0%.

Preferibilmente, la fase c) è seguita da almeno 25 una fase d) di purificazione di almeno un suddetto costituente isoprenico.

Preferibilmente, la fase d) di purificazione comprende una fase di cristallizzazione di almeno un costituente isoprenico, con l'ottenimento di almeno un costituente isoprenico della resina in forma 30 cristallina sostanzialmente pura.

Preferibilmente, in fase d), la fase di cristallizzazione è una cristallizzazione diretta con

solventi apolari, più preferibilmente petroletere e/o n-esano, a basse temperature, più preferibilmente a una temperatura pari o inferiore a 0 °C.

Preferibilmente, nella fase di cristallizzazione 5 della guayulina A, dell'argentatina A, C e D, la temperatura di cristallizzazione è circa -23 °C.

Preferibilmente, la fase d) comprende una fase d1) in cui la miscela di guayulina A e guayulina B ottenuta in fase c) è sottoposta a precipitazione della 10 guayulina A mediante trattamento con un solvente apolare, preferibilmente scelto nel gruppo che comprende petroletere, n-esano e loro combinazioni, ancora più preferibilmente n-esano, con raffreddamento, più preferibilmente a una temperatura compresa tra 0 e 15 -23°C, ancora più preferibilmente -23°C, ottenendo così un precipitato di guayulina A purificata e un surnatante contenente una miscela di guayulina A e guayulina B.

Preferibilmente, il precipitato di guayulina A 20 purificata è sottoposto a cristallizzazione, più preferibilmente mediante cristallizzazione diretta con n-esano, con l'ottenimento di cristalli di guayulina A pura.

Preferibilmente, la resa di guayulina A pura, 25 espressa in percentuale in peso secco rispetto al peso secco della resina degrassata di fase a), è di almeno 2,0%, più preferibilmente almeno 5,0%.

Preferibilmente, la resa della miscela di guayulina A e guayulina B ottenuta in fase d1), 30 espressa in percentuale in peso secco rispetto al peso secco della resina degrassata di fase a), è di almeno 0,5%, più preferibilmente almeno 2,8%.

Preferibilmente, la fase d) comprende una fase d2) in cui l'argentatina B ottenuta in fase c) è sottoposta a precipitazione con un solvente apolare, preferibilmente scelto nel gruppo che comprende 5 petroletere, n-esano e loro combinazioni, ancora più preferibilmente petroletere, con raffreddamento, più preferibilmente a una temperatura compresa tra 0 e -23°C, ancora più preferibilmente 0°C, ottenendo così un precipitato di argentatina B purificata.

10 Preferibilmente, il precipitato di argentatina B purificata è sottoposto a cristallizzazione, più preferibilmente mediante cristallizzazione diretta con petroletere, con l'ottenimento di cristalli di argentatina B pura.

15 Preferibilmente, la resa della argentatina B pura, espressa in percentuale in peso secco rispetto al peso secco della resina degrassata di fase a), è di almeno 1,5%, più preferibilmente almeno 3,4%.

Preferibilmente, la fase d) comprende una fase d3) 20 in cui l'argentatina A ottenuta in fase c) è sottoposta a precipitazione con un solvente apolare, preferibilmente scelto nel gruppo che comprende cicloesano, n-esano, etere etilico, petroletere e loro combinazioni, ancora più preferibilmente etere etilico 25 e n-esano, con raffreddamento, più preferibilmente a una temperatura compresa tra 0 e -23°C, ancora più preferibilmente -23°C, ottenendo così un precipitato di argentatina A purificata.

Preferibilmente, il precipitato di argentatina A 30 purificata è sottoposto a cristallizzazione, più preferibilmente mediante cristallizzazione diretta con n-esano e etere etilico, con l'ottenimento di cristalli

di argentatina A pura.

Preferibilmente, la cristallizzazione del precipitato di argentatina A purificata viene eseguita a una temperatura compresa tra 0 e -78°C.

5 Preferibilmente, la fase d) comprende una fase d4) in cui la miscela di argentatina C e argentatina D ottenuta in fase c) è sottoposta a precipitazione dell'argentatina D con un solvente apolare, preferibilmente scelto nel gruppo che comprende 10 petroletere, n-esano e loro combinazioni, ancora più preferibilmente petroletere, con raffreddamento, più preferibilmente a una temperatura compresa tra 0 e -23°C, ancora più preferibilmente -23°C, ottenendo così 15 un precipitato di argentatina D purificata e un surnatante contenente argentatina C.

Preferibilmente, il precipitato di argentatina D purificata è sottoposto a cristallizzazione, più preferibilmente mediante cristallizzazione diretta con petroletere, con l'ottenimento di cristalli di 20 argentatina D pura.

Preferibilmente, la resa della argentatina D pura, espressa in percentuale in peso secco rispetto al peso secco della resina degrassata di fase a), è di almeno 0,3%, più preferibilmente almeno 0,8%.

25 Preferibilmente, la fase d4) è seguita da una fase d5) in cui il surnatante contenente argentatina C è sottoposto a evaporazione del solvente e il residuo disiolto in un solvente apolare, preferibilmente scelto nel gruppo che comprende cicloesano, 30 petroletere, etere etilico, n-esano e loro combinazioni, ancora più preferibilmente etere etilico, con raffreddamento, più preferibilmente a una

temperatura compresa tra 0 e -23°C, più preferibilmente -23°C, con l'ottenimento di un precipitato di argentatina C purificata.

Preferibilmente, il precipitato di argentatina C purificata è sottoposto a cristallizzazione, più preferibilmente mediante cristallizzazione diretta con n-esano, con l'ottenimento di cristalli di argentatina C pura.

Preferibilmente, la resa della argentatina C pura, espressa in percentuale in peso secco rispetto al peso secco della resina degrassata di fase a), è di almeno 0,1%, più preferibilmente almeno 0,3%.

Preferibilmente, la fase d4 è preceduta da una fase di concentrazione della fase acquosa ottenuta in fase c).

Preferibilmente, la fase c) è seguita da una fase e1) che comprende una reazione di idrolisi basica della guayulina A ottenuta in fase d1) e/o della miscela di guayulina A e guayulina B ottenuta in fase c) con l'ottenimento di una soluzione contenente parteniolo.

Preferibilmente, la reazione di idrolisi basica viene condotta in una miscela di reazione che comprende la guayulina A e/o la miscela di guayulina A e guayulina B e una soluzione basica, in cui la soluzione basica è più preferibilmente scelta nel gruppo che comprende idrossido di potassio, idrossido di sodio e loro combinazioni, il più preferibilmente idrossido di potassio, in cui la guayulina A e/o la miscela di guayulina A e guayulina B e la soluzione basica si trovano in un rapporto peso (g) su volume (ml) della guayulina A e/o la miscela di guayulina A e guayulina B rispetto alla soluzione basica compreso tra 1:2 e 1:10,

più preferibilmente tra 1:1.5 e 1:10, ancora più preferibilmente di circa 1:5, più preferibilmente con agitazione, con l'ottenimento di una fase organica contenente parteniolo.

5 Preferibilmente, la miscela di reazione comprende inoltre metanolo e acqua, in cui il rapporto volume su volume tra acqua e metanolo è compreso tra 1:20 e 1:100 e più preferibilmente tra 1:50.

10 Preferibilmente, la soluzione contenente parteniolo viene sottoposta a cristallizzazione, più preferibilmente mediante cristallizzazione diretta con petroletere, con raffreddamento, più preferibilmente a 0°C, con l'ottenimento di parteniolo puro.

15 Preferibilmente, la resa di parteniolo puro ottenuto per idrolisi dalla miscela di guayulina A e guayulina B dalla fase d1), espressa in percentuale in peso secco rispetto al peso secco della resina degrassata di fase a), è di almeno 0.5%, più preferibilmente almeno 1,5%.

20 Preferibilmente, la fase e1) è seguita da una fase e2) di esterificazione del parteniolo così ottenuto, con l'ottenimento di una soluzione contenente guayulina B.

25 Preferibilmente, l'esterificazione del parteniolo viene eseguita con acido anisico o cloruro di anisile.

Preferibilmente, nella fase di esterificazione del parteniolo, l'acido anisico o il cloruro di anisile sono utilizzati in una quantità pari a 1 equivalente rispetto al parteniolo.

30 Preferibilmente, la soluzione contenente guayulina B così ottenuta in fase e2) è sottoposta a evaporazione e il residuo disciolto in un solvente apolare,

preferibilmente scelto nel gruppo che comprende, cicloesano, n-esano, etero etilico, petroletere e loro combinazioni, ancora più preferibilmente petroletere, con l'ottenimento di un precipitato di guayulina B 5 purificata.

Preferibilmente, il precipitato di guayulina B purificata è sottoposto a cristallizzazione, con raffreddamento, più preferibilmente a una temperatura compresa tra 0 e -23°C, più preferibilmente 0°C, con 10 l'ottenimento di cristalli di guayulina B pura.

Preferibilmente, la resa di guayulina B pura, espressa in percentuale in peso secco rispetto al peso secco della resina degrassata di fase a), è di almeno 0,55% (resa reazione 38% molare della reazione).

15 Preferibilmente, la fase c) è seguita da una fase e3) che comprende una reazione di riduzione dell'argentatina B ottenuta in fase c) e/o in fase d2) con l'ottenimento di una soluzione contenente argentatina D.

20 Preferibilmente, la reazione di riduzione viene condotta in una miscela di reazione comprendente l'argentatina B e litio alluminio idruro LiAlH₄ o sodio boro idruro, più preferibilmente sodio boro idruro NaBH₄, in cui preferibilmente la miscela di reazione 25 presenta una concentrazione, espressa in peso secco di argentatina B rispetto al volume della miscela, compresa tra 2,5 e 1,5 g/100 ml, più preferibilmente 2,0 g/100 ml, più preferibilmente con agitazione, con l'ottenimento di una soluzione contenente argentatina 30 D.

Preferibilmente, nella reazione di riduzione, il litio alluminio idruro LiAlH₄ o sodio boro idruro sono

presenti in una quantità pari a 3 equivalenti rispetto all'argentatina B.

Preferibilmente, la miscela di reazione comprende inoltre metanolo, in cui il metanolo è presente in una 5 concentrazione espressa in percentuale in peso (g) sul volume (ml) compreso tra 70 e 90%, più preferibilmente 80%.

Preferibilmente, in seguito alla reazione di riduzione, la soluzione contenente argentatina D così 10 ottenuta è sottoposta a evaporazione e il residuo disciolto in un solvente apolare, preferibilmente scelto nel gruppo che comprende cicloesano, etere etilico, n-nesano, petroletere e loro combinazioni, ancora più preferibilmente petroletere, con 15 l'ottenimento di un precipitato di argentatina D purificata.

Preferibilmente, il precipitato di argentatina D purificata è sottoposto a cristallizzazione, con raffreddamento, più preferibilmente a una temperatura 20 compresa tra 0 e -23°C, più preferibilmente 0°C, con l'ottenimento di cristalli di argentatina D pura.

Preferibilmente, la resa di argentatina D pura, espressa in percentuale in peso secco rispetto al peso secco della resina degrassata di fase a), è di almeno 25 0,50%, più preferibilmente almeno 0.8%.

Le strutture dei composti purificati ottenuti secondo la presente invenzione sono determinate mediante analisi e caratterizzazione spettroscopica secondo metodi noti nell'arte.

30 E' stato infatti trovato che, sottponendo la resina di guayule (o del tipo guayule) e prodotti dell'estrazione della resina a opportune separazioni

con solventi, in particolare ripartizioni del tipo liquido-liquido e/o liquido-solido, è possibile arrivare alla separazione e alla purificazione di tutti i costituenti isoprenici di interesse, guayulina A, 5 guayulina B, argentatina A, argentatina B, argentatina C e argentatina D, con rese più elevate rispetto alle tecniche note.

Le tecniche note, infatti, sono basate su metodi cromatografici a colonna, che sono costosi e non 10 scalabili a livello industriale.

L'arte nota, inoltre, non descrive la separazione o l'isolamento delle argentatine, anch'esse di notevole interesse nell'ambito di applicazioni nel settore farmacologico.

15 La Richiedente è invece riuscita a individuare un metodo che, sfruttando le caratteristiche di polarità delle molecole di interesse, e sulla base di una precisa sequenza di fasi e scelta di solventi ad ogni stadio, permette di separare e purificare in modo 20 rapido, semplice, versatile ed economico tutte le molecole di interesse.

A titolo di esempio, il metodo della presente invenzione permette di lavorare 1 Kg di resina grezza in due giorni, con l'ottenimento circa 30 g di 25 guayulina A, 20 g di argentatina B e 3 g di argentatina A pure.

Inoltre, il metodo della presente invenzione non pone limiti volumetrici, potendo perciò essere applicato a volumi anche industriali.

30 Per la prima volta, quindi, è stato possibile mettere a disposizione i costituenti guayulina A, guayulina B, argentatina A, argentatina B, argentatina

C, e argentatina D, ad un grado di purificazione e in volumi tali da permettere di studiare le loro caratteristiche e le loro applicazioni industriali in larga scala.

5 Le suddette molecole possono avere interessanti applicazioni in diversi ambiti tra cui quello essenziero, agricolo, cosmetico e farmacologico.

Il metodo della presente invenzione permette inoltre, attraverso reazioni di semisintesi di ottenere 10 isoprenoidi minori e di difficile derivazione dalla resina, quali la guayulina B e l'argentatina D, che non sarebbero altrimenti separabili in quantità soddisfacenti.

Questi prodotti semisintetici rappresentano una 15 via razionale per ottenere prodotti naturali e sintetici con elevato potenziale di applicabilità industriale, partendo da prodotti separati e purificati grazie al metodo della presente invenzione, che risulta essere maggiormente versatile ed ecosostenibile 20 rispetto ai laboriosi e costosi metodi già descritti nello stato dell'arte.

Una caratteristica peculiare dell'intero metodo della presente invenzione è costituita dall'assenza di tecniche cromatografiche a colonna, permettendo però 25 nel contempo, in forme di realizzazione preferite, l'ottenimento di prodotti cristallini purificati ulteriormente per cristallizzazione diretta con solventi apolari a basse temperature. La separazione versatile ed efficiente ottenuta tramite la presente 30 invenzione risulta sorprendente in quanto apparentemente in contrasto con le teorie accettate e

descritte nello stato dell'arte, secondo le quali sarebbero invece necessari costosi passaggi di purificazione cromatografica a colonna per ottenere risultati confrontabili a quelli ottenuti secondo il 5 metodo della presente invenzione.

Ciò non toglie che, qualora lo si voglia, le fasi di purificazione della presente invenzione sono idonee ad essere applicate anche a prodotti non completamente separati o purificati precedentemente sottoposti a 10 cromatografia.

Il metodo della presente invenzione permette di ridurre il numero dei passaggi per la separazione e la purificazione dei costituenti rispetto ai metodi noti nello stato dell'arte, rendendo il metodo più semplice 15 e versatile ed al contempo ottimizzando le rese di ottenimento dei prodotti puri, così come i costi e i tempi impiegati. Inoltre, il metodo della presente invenzione non prevede l'uso di solventi pericolosi.

Il metodo della presente invenzione è applicabile 20 a resina ottenuta a partire da tutte la parti della pianta senza alcun particolare accorgimento. Il metodo può infatti essere applicato non solo su resina ottenuta a partire dalla pianta intera ma anche a partire dalle foglie, i rami o i fusti (presi insieme o 25 singolarmente), nonché addirittura da sue colture cellulari.

Grazie al metodo della presente invenzione si ottiene un significativo aumento in termini di resa (5% di guayulina A pura secondo il metodo della presente 30 invenzione rispetto all'1% del metodo Zoeller et al. 1994).

Con il metodo della presente invenzione è possibile accedere e sfruttare le potenzialità dei prodotti ottenuti, recuperando così un materiale tradizionalmente considerato di scarto della lavorazione delle piante di guayule per ottenere la gomma naturale.

Il metodo della presente invenzione fornisce inoltre una soluzione interessante ai problemi di ottenimento e di accessibilità dei composti isoprenoidi non polimerici del guayule rendendo disponibili prodotti puri che possono essere modificati chimicamente per dare analoghi strutturali di potenziale interesse in vari campi di applicazione.

15 Breve descrizione dei disegni

La Figura 1 è uno schema a blocchi completo di una forma di realizzazione del metodo della presente invenzione, a partire da un estratto grezzo ottenuto dalla bagassa di *Parthenium argentatum*. I numeri tra parentesi rappresentano la quantità di prodotto espresso in grammi.

La Figura 2 è uno schema a blocchi di una forma di realizzazione del metodo della presente invenzione, a partire da un estratto grezzo ottenuto dai rami ed dal fusto di *Parthenium argentatum*, che mostra l'ottenimento di guayulina A, e argentatine A e B. I numeri tra parentesi rappresentano la quantità di prodotto espresso in grammi.

La Figura 3 è uno schema a blocchi di una forma di realizzazione del metodo della presente invenzione, a

partire da un estratto grezzo ottenuto dalle foglie di *Parthenium argentatum*, che mostra l'ottenimento di guayulina A, e argentatine A e B. I numeri tra parentesi rappresentano la quantità di prodotto
5 espresso in grammi.

La Figura 4 è uno schema a blocchi parziale di una forma di realizzazione del metodo della presente invenzione, che illustra la semisintesi delle guayuline ed argentatine naturali minori a partire dai
10 maggiori costituenti isoprenici non polimerici (guayulina A e argentatina B) deparati e purificati con il metodo della presente invenzione. I numeri tra parentesi rappresentano le rese in peso con cui si ottengono i prodotti raffigurati mediante simisintesi.

15

Descrizione dettagliata dell'invenzione

L'invenzione verrà ora descritta ulteriormente con riferimento a degli esempi di realizzazione forniti a scopo illustrativo e non limitativo.

20

Tutte le percentuali indicate sono in peso e tutte le proporzioni delle miscele di solventi sono in volume, se non diversamente indicato.

ESEMPIO 1

Winterizzazione dell'estratto grezzo di *Parthenium argentatum* (Figura 1)

108 g di estratto grezzo ottenuto dalla bagassa di *Parthenium argentatum* sono stati sciolti lentamente in agitazione continua a 40°C in metanolo (800 mL) utilizzando un volume di solvente di 1,0 L/100 g di
30 estratto grezzo.

A dissoluzione completa la miscela è stata raffreddata a temperatura ambiente per 1 ora e successivamente a 0°C per 24 ore. Si è formato un precipitato compatto che è stato recuperato per 5 filtrazione a 1,5 mbar.

Il residuo di consistenza gommosa è stato successivamente lavato con metanolo raffreddato a 0°C ed essiccato all'aria a temperatura ambiente ottenendo 44 g di grassi e gomme a basso peso molecolare.

10 La frazione liquida polare (acque madri) contenente la resina degrassata è stata recuperata per le fasi successive.

ESEMPIO 2

Ripartizione liquido-liquido della resina (Figura 1)

15 800 mL di soluzione metanolica ottenuta dal processo di winterizzazione, per separare la componente lipofila della resina grezza, sono stati diluiti ad un volume finale di 1 L con 200 mL di acqua ottenendo una miscela metanolo/acqua 4:1.

20 La miscela ottenuta è stata sottoposta a processo di ripartizione con petrolettere(200 mL). Dopo il raggiungimento dell'equilibrio tra le fasi, la fase organica è stata separata da quella acquosa.

Quest'ultima è stata estratta nuovamente con 200 mL di petrolettere per 3 volte. La fase organica risultante è stata successivamente lavata con 200 mL di una miscela di metanolo/acqua (4:1), recuperata, anidrificata e concentrata a basse pressioni fino al completo essiccamiento ottenendo 7,7 g di prodotto.

Il processo di ripartizione è stato monitorato mediante TLC (Thin layer chromatography).

ESEMPIO 3

Ripartizione solido-liquido dell'estratto apolare
5 (Figura 1)

7,7 g di estratto apolare ottenuto dal processo di ripartizione liquido-liquido di 108 g di resina grezza sono stati scolti in 60 mL (~7 mL/g) di una miscela di petroletere ed etile acetato 9 : 1 e adsorbiti su di un 10 letto di 200 mL di gel di silice (70-230 mesh, 25 mL/g).

Il solvente è stato rimosso dalla sospensione per evaporazione a pressione ridotta o per filtrazione sotto vuoto, e la matrice solida risultante è stata 15 lavata tre volte con 100 mL della miscela solvente utilizzata per l'adsorbimento.

Questa operazione è stata condotta in un pallone di reazione secondo un metodo noto al tecnico del ramo. La soluzione di de-adsorbimento è stata fatta 20 evaporare, ottenendo una miscela di guayuline (5.0 g). La matrice solida è stata poi ora lavata con 200 mL di acetato di etile, recuperando l'argentatina B (2.3 g).

ESEMPIO 4

Ripartizione liquido-liquido della frazione polare
25 (Figura 1)

1,2 L di soluzione metanolo/acqua 4:1 ottenuti dal primo processo di ripartizione liquido-liquido descritto all'Esempio 2, sono stati sottoposti ad un ulteriore processo di ripartizione con cicloesano (200

mL).

Dopo il raggiungimento dell'equilibrio tra le fasi, la fase organica è stata separata da quella acquosa. Quest'ultima è stata estratta nuovamente con 5 200 mL di cicloesano per 3 volte.

La fase organica risultante è stata successivamente lavata con 200 mL di una miscela di metanolo/acqua (4:1), recuperata, anidrificata e concentrata a basse pressioni fino al completo 10 essiccamento ottenendo 5,25 g di estratto.

La fase metanolica della ripartizione, comprendente le argentatine C e D, è stata estratta con 200 mL di etile acetato per 3 volte, anidrificata e concentrata a basse pressioni fino al completo 15 essiccamento ottenendo 1,77 g di estratto.

Il processo di ripartizione è stato monitorato mediante TLC (Thin layer chromatography).

ESEMPIO 5

Cristallizzazione diretta di guayuline ed argentatine
20 (Figura 1)

a. Guayulina A: 5,0 g di miscela guayulinica ottenuta dalla ripartizione solido-liquido descritto all'Esempio 3, sono stati discolti in 10 mL di n-esano. Per raffreddamento della soluzione a -23°C 25 (bagno di acetone e ghiaccio secco) si è ottenuto un precipitato copioso che è stato raccolto per filtrazione.

Il residuo è stato lavato con n-esano a -23°C fino all'ottenimento di un prodotto cristallino bianco

identificato come guayulina A (3,2 g). IR ν max (KBr): 3081, 2977, 2925, 2860, 1709, 1640, 1496, 1310, 1180, 927, 766, 708, 662, 563, 486 cm^{-1} . ^1H NMR (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, $J = 16$ Hz, 1H), 7.40 (m, 3H), 7.50 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ ppm: 166,2; 144,3; 135,8; 134,5; 130,1; 130,0; 128,8; 10 128,1; 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.

Il surnatante è stato recuperato ed il solvente evaporato a pressioni ridotte ottenendo 1,3 g di miscela di guayulina A e B.

15 b. Argentatina B: 2,3 g di frazione argentatinica ottenuta dalla ripartizione solido-liquido descritta all'Esempio 3, sono stati discolti in 10 mL di petrolettere. Per raffreddamento della soluzione a 0°C (bagno di ghiaccio) si è ottenuto un precipitato 20 copioso che è raccolto per filtrazione.

Il residuo è stato lavato con petrolettere a 0°C fino all'ottenimento di un prodotto cristallino bianco identificato come argentatina B (2,2 g). IR ν max (KBr): 3523, 3048, 2967, 2871, 2723, 1704, 1448, 1372, 25 1336, 1244, 1171, 1112, 1059, 910, 578 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3); 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) and 0.31 (d, 5, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3); δ ppm: 18.83, 19.51, 20.8, 21.03, 21.12, 21.65, 30 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: 5,25 g di estratto derivante dalla fase organica ottenuta dal processo di ripartizione liquido-liquido descritto all'Esempio 4, sono stati disciolti in 30 mL di etere etilico. La soluzione è stata raffreddata a -23°C (bagno di acetone e ghiaccio secco) ed è stato aggiunto n-esano lentamente finché non si è osservato un intorbidimento della soluzione con conseguente precipitazione 10 dell'argentatina A.

Il precipitato è stato recuperato per filtrazione e sottoposto a lavaggi con etere etilico e n-esano fino ad ottenere un prodotto cristallino bianco.

15 Si ottengono 0,3 g di prodotto identificato come argentatina A. IR ν max (KBr): 3386, 2966, 2870, 1705, 1462, 1380, 1249, 1175, 1051, 954, 890, 837 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3); 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, 20 3H), 1.12 (s, 3H), 1.11 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.77 (d, 7, 1H), 0.43 (d, 7, 1H). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3); 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.

25 d. Argentatine C e D: 1,77 g di estratto derivante dalla fase acquosa ottenuta dal processo di ripartizione liquido-liquido descritto all'Esempio 4, sono stati disciolti in 10 mL di petrolettere.

30 Per raffreddamento della soluzione a -23°C (bagno di acetone e ghiaccio secco) si è ottenuto un

precipitato bianco che è stato raccolto per filtrazione. Il residuo è stato lavato con petrolettere a -23°C fino all'ottenimento di un prodotto cristallino bianco identificato come argentatina D (0,54 g). IR ν_{max} (KBr): 3499, 3036, 2972, 2922, 2862, 1710, 1440, 1337, 1162, 1111, 1055, 913, 779, 564 cm⁻¹. ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃); δ ppm: 4.55 (m, 1H), 3.56 (dd, 5, 5, 1H), 3.44 (br t, 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). ¹³C-NMR (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.

Il surnatante derivato dal processo di purificazione dell'argentatina D è stato recuperato ed il solvente completamente evaporato a pressioni ridotte. Il residuo è stato dissolto in 10 mL di etere etilico.

La soluzione è stata raffreddata a -23°C (bagno di acetone e ghiaccio secco) ed è stato aggiunto n-esano lentamente finché non si è osservato un intorbidimento della soluzione con conseguente precipitazione dell'argentatina C.

Il precipitato è stato recuperato per filtrazione e sottoposto a lavaggi con etere etilico e n-esano fino ad ottenere un prodotto cristallino bianco. Il surnatante è stato recuperato e ricristallizzato per recuperare altro prodotto.

Si ottengono 0,2 g di prodotto identificato come

argentatina C. IR ν max (KBr): 3346, 2936, 2870, 1714, 1455, 1373, 1288, 1167, 1098, 1064, 917, 732, 669, cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3); δ ppm: 4.55 (m, 1H), 3.58 (s, 2H), 3.56 (dd, 5, 5, 1H), 1.11 (s, 3H), 1.07 (s, 5 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).

ESEMPIO 6

Sintesi dei costituenti isoprenici minori a partire dagli estratti (Figura 4)

10 Partendo dalla miscela guayulinica ottenuta come descritto all'Esempio 3 oppure dalla guayulina A pura ottenuta come descritto all'Esempio 5 ovvero dalle sue acque madri, è stato possibile ottenere mediante semisintesi, prodotti naturali contenuti nella resina 15 ma che per le loro minori concentrazioni sono difficilmente ottenibili mediante metodiche non-cromatografiche.

20 a. Parteniolo: Il parteniolo puro è stato ottenuto mediante reazione di idrolisi basica partendo dalla miscela guayulinica ottenuta dall'estratto in petroletere/etile acetato 9:1 del processo di ripartizione solido/liquido ovvero dalla guayulina A pura. A 5,00 g di miscela guayulinica si sono aggiunti 23,8 mL di una soluzione basica di idrossido di 25 potassio e metanolo (5% p/v; 425,4 mmol; 60eqv) e 510 μL di acqua. La reazione è stata lasciata in agitazione a 40 °C per 24 ore monitorandone l'andamento mediante TLC (*Thin layer chromatography*). La reazione è stata spenta per diluizione con una soluzione satura di acqua 30 e cloruro di sodio ed estratta con petroletere. La fase organica è anidrificata, filtrata ed il solvente è

stato fatto evaporare a pressioni ridotte. Il residuo (5,0 g) è stato successivamente purificato per cristallizzazione in petrolettere a 0 °C (in bagno di ghiaccio). Si è ottenuto un prodotto cristallino bianco 5 (2,6 g) identificato come parteniolo o deacilguayulina. IR ν max (KBr): 3294, 3014, 2976, 2924, 2854, 2730, 1654, 1454, 1204, 1004, 851, 655, 534 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3); 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 10 (d), 4.91 (dd). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz; CDCl_3): δ 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: ad una soluzione di 100 mg di acido anisico (Massa molecolare 152,15; 0,657 mmol) 15 disciolti in 2 mL di diclorometano, si sono aggiunti 380 μL di cloruro di ossalile 98% soluzione in diclorometano (Massa molecolare 126,93; densità 1,335 g/mL; 2,63 mmol; 4 equivalenti) e 66 μL di DMF (100 $\mu\text{L}/\text{mmol}$ di acido) a 0°C e in agitazione per 1 ora. La 20 reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per altre 2,5 ore monitorandone il decorso mediante TLC (*Thin layer chromatography*). La reazione è stata spenta per evaporazione del solvente a pressioni ridotte ottenendo 100 mg di cloruro di anisile. Successivamente 77 mg di cloruro di anisile (Massa 25 molecolare 170,15; 0,454 mmol; 1 equivalente) sono stati aggiunti ad una soluzione di 100 mg di parteniolo (Massa molecolare 220,35; 0,454 mmol) disciolti in 6 mL di piridina. La reazione è stata lasciata in agitazione 30 a temperatura ambiente per 4 ore monitorandone il decorso mediante TLC (*Thin layer chromatography*). La

reazione è stata spenta per diluizione con una soluzione satura di acqua e cloruro di sodio ed estratta con petrolettere. La fase organica è anidrificata, filtrata ed il solvente è stato fatto 5 evaporare a pressioni ridotte. Il residuo è stato successivamente purificato mediante cristallizzazione in petrolettere a 0 °C (in bagno di ghiaccio). Si è ottenuto un prodotto cristallino bianco (0,15 g) identificato come guayulina B. IR ν max (KBr): 3504, 10 2932, 2854, 2790, 2657, 2123, 1707, 1606, 1449, 1359, 1166, 1045, 890, 770, 645, 539 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3); 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, 15 $J = 11.1, 5.3$ Hz, 2H), 5.12 (m), 6.82 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 7.95 (d, $J = 9$ Hz, 2H).

c. Argentatina D semisintetica: Ad una soluzione di 100 mg di argentatina B (Massa molecolare 456,70; 0,218 mmol) ottenuta dalla ripartizione solido-liquido 20 descritta all'Esempio 4 ovvero dalle acque madri derivanti dal processo di cristallizzazione descritto all'Esempio 5, disciolti in 4 mL di metanolo, si sono aggiunti lentamente in bagno di ghiaccio a 0°C, 25 mg di sodio boro idruro NaBH_4 (Massa molecolare 37,83; 25 0,661 mmol; 3,0 equivalenti). La reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 5 minuti, monitorandone il decorso mediante TLC (*Thin layer chromatography*). La reazione è stata spenta per diluizione con una soluzione satura di acqua e cloruro 30 di sodio, aggiunta di una soluzione di acqua ed acido solforico 5% fino a pH neutro ed estrazione della fase

acquosa con etile acetato. La fase organica è anidrificata, filtrata ed il solvente è evaporato a pressioni ridotte. Il residuo è stato successivamente purificato per cristallizzazione in petroletere a 0 °C (in bagno di ghiaccio). Si è ottenuto un prodotto cristallino bianco (0,070 g) identificato come argentatina D. IR ν max (KBr): 3499, 3036, 2972, 2922, 2862, 1710, 1440, 1337, 1162, 1111, 1055, 913, 779, 564 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ ppm: 4.55 (m, 1H), 3.56 (dd, 5, 5, 1H), 3.44 (br t, 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). $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz; CDCl_3): 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.

ESEMPIO 7

Materiale vegetale: estratto grezzo di rami e fusto di
 20 *Parthenium argentatum* (Figura 2)

3,89 g di estratto grezzo, ottenuti dai rami e dal fusto di *Parthenium argentatum* sono stati processati in accordo con questa invenzione per separare la guayulina A e le argentatine A e B. Al processo di separazione della componente lipofila comprendente grassi e gomme a basso peso molecolare, mediante il metodo della winterizzazione, sono seguiti i processi di separazione e di cristallizzazione diretta con le medesime procedure descritte negli Esempi 2-6 ed in rapporto alla quantità di estratto grezzo utilizzato. Si sono ottenuti 1,7 g di miscela lipofila di grassi e

gomme a basso peso molecolare ed alto peso molecolare (HMW), 0,15 g di guayulina A cristallina, 0,08 g di argentatina A, 0,18 g di argentatina B.

ESEMPIO 8

5 Materiale vegetale: estratto grezzo di foglie di
Parthenium argentatum (Figura 3)

4,6 g di estratto grezzo, ottenuti dalle foglie di *Parthenium argentatum* italiano della Basilicata, sono stati processati in accordo con questa invenzione, per 10 separare la componente guayulinica e le argentatine A e B. Al processo di separazione della componente lipofila comprendente grassi e gomme a basso peso molecolare, mediante il metodo della winterizzazione, sono seguiti i processi di ripartizione e di cristallizzazione 15 diretta con le medesime procedure descritte negli Esempi 2-6 ed in rapporto alla quantità di estratto grezzo utilizzato. Si sono ottenuti 0,30 g di miscela guayulinica da cui si ricavano per cristallizzazione diretta con n-esano a -23°C (bagno di acetone e 20 ghiaccio secco) 0,06 g di guayulina A cristallina, 0,06 g di argentatina A e 0,17 g di argentatina B.

Barzani & Zanardo Milano S.p.A.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la separazione di almeno un costituente isoprenico dalla resina di una pianta di guayule e/o del tipo guayule che comprende le fasi di:
 - a) mettere a disposizione una resina degrassata di guayule e/o del tipo guayule;
 - b) sottoporre detta resina degrassata a ripartizione di tipo liquido-liquido con solventi tra loro immiscibili con l'ottenimento di un estratto apolare contenente i costituenti isoprenici guayulina A, guayulina B e argentatina B; e un estratto polare contenente i costituenti isoprenici argentatina A, argentatina C e argentatina D; e
 - c) separare almeno un costituente isoprenico da detto estratto polare e/o da detto estratto apolare così ottenuti, in cui la fase c) comprende una fase in cui detto estratto polare viene sottoposto a ripartizione di tipo liquido-liquido con solventi tra loro immiscibili e/o una fase in cui detto estratto apolare viene sottoposto a ripartizione di tipo solido-liquido.
2. Metodo secondo la rivendicazione 1, in cui detto almeno un costituente isoprenico è scelto nel gruppo che comprende guayulina A, guayulina B, argentatina A, argentatina B, argentatina C, argentatina D e loro miscele.
3. Metodo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui detta resina degrassata di fase a) è ottenuta mediante una fase di degrassazione, più preferibilmente una fase di cristallizzazione frazionata, di un estratto grezzo di una pianta di guayule o del tipo guayule.

4. Metodo secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui, in fase b), i solventi tra loro immiscibili comprendono un solvente polare e un solvente apolare, in cui preferibilmente il solvente polare è scelto nel gruppo che comprende acqua, metanolo, etanolo, isopropanolo, terbutanolo, etil acetato, e loro combinazioni, più preferibilmente una soluzione di metanolo e acqua; e il solvente apolare è scelto tra petroletere, n-esano e loro combinazioni, 10 più preferibilmente petroletere.

5. Metodo secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui, in fase c), la ripartizione di tipo solido-liquido comprende le fasi di sottoporre l'estratto apolare ottenuto in fase b), sciolto in una combinazione di due solventi tra loro miscibili, ad adsorbimento su una matrice solida, preferibilmente per intrappolamento selettivo; e di trattamento, preferibilmente lavaggio, di detta matrice solida così ottenuta con una combinazione di due solventi tra loro 15 miscibili, con l'ottenimento di una soluzione contenente una miscela di guayulina A e guayulina B, e una matrice solida contenente argentatina B.

6. Metodo secondo la rivendicazione 5, in cui detta matrice solida contenente argentatina B viene 25 sottoposta a un ulteriore trattamento, preferibilmente lavaggio con un solvente polare, con l'ottenimento di una soluzione di argentatina B.

7. Metodo secondo una qualsiasi delle precedenti rivendicazioni, in cui, in fase c), la ripartizione di 30 tipo liquido-liquido comprende la fase di sottoporre l'estratto polare ottenuto in fase b) a separazione in una combinazione di un solvente polare e un solvente

apolare con l'ottenimento di una fase organica contenente argentatina A e una fase acquosa contenente una miscela di argentatina C e argentatina D.

8. Metodo secondo la rivendicazione 7, in cui
5 nella fase di ripartizione di tipo liquido-liquido di
fase c), il solvente apolare è scelto nel gruppo che
comprende cicloesano, n-esano, petroletere, e loro
combinazioni, più preferibilmente cicloesano; e il
solvente polare è scelto nel gruppo che comprende
10 acqua, metanolo, etanolo, isopropanolo, tertbutanolo, e
loro combinazioni, preferibilmente metanolo e acqua.

9. Metodo secondo una qualsiasi delle precedenti
rivendicazioni, in cui la fase c) è seguita da almeno
una fase d) di purificazione di almeno un detto
15 costituente isoprenico.

10. Metodo secondo la rivendicazione 9 in cui la
fase d) di purificazione comprende una fase di
cristallizzazione di almeno un costituente isoprenico,
con l'ottenimento di almeno un costituente isoprenico
20 della resina in forma cristallina sostanzialmente pura.

11. Metodo secondo la rivendicazione 9 o 10, in
cui la fase d) comprende una fase d1) in cui detta
miscela di guayulina A e guayulina B ottenuta in fase
c) è sottoposta a precipitazione della guayulina A
25 mediante trattamento con un solvente apolare,
preferibilmente scelto nel gruppo che comprende
petroletere, n-esano e loro combinazioni, più
preferibilmente n-esano, con raffreddamento, ottenendo
così un precipitato di guayulina A purificata e un
30 surnatante contenente una miscela di guayulina A e
guayulina B; e in cui preferibilmente, detto
precipitato di guayulina A purificata è sottoposto a

cristallizzazione con l'ottenimento di cristalli di guayulina A pura.

12. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 9 a 11, in cui detta fase d) 5 comprende una fase d2) in cui detta argentatina B ottenuta in fase c) è sottoposta a precipitazione con un solvente apolare, preferibilmente scelto nel gruppo che comprende petroletere, n-esano e loro combinazioni, più preferibilmente petroletere, con raffreddamento, 10 ottenendo così un precipitato di argentatina B purificata; e in cui preferibilmente detto precipitato di argentatina B purificata è sottoposto a cristallizzazione con l'ottenimento di cristalli di argentatina B pura.

15 13. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 9 a 12, in cui detta fase d) comprende una fase d3) in cui detta argentatina A ottenuta in fase c) è sottoposta a precipitazione con un solvente apolare, preferibilmente scelto nel gruppo 20 che comprende cicloesano, n-esano, etero etilico, petroletere e loro combinazioni, più preferibilmente etero etilico e n-esano, con raffreddamento, ottenendo così un precipitato di argentatina A purificata; e in cui preferibilmente detto precipitato di argentatina A 25 purificata è sottoposto a cristallizzazione con l'ottenimento di cristalli di argentatina A pura.

14. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 9 a 13, in cui detta fase d) comprende una fase d4) in cui detta miscela di 30 argentatina C e argentatina D ottenuta in fase c) è sottoposta a precipitazione dell'argentatina D con un solvente apolare, preferibilmente scelto nel gruppo che

comprende petroletere, n-esano e loro combinazioni, più preferibilmente petroletere, con raffreddamento, ottenendo così un precipitato di argentatina D purificata e un surnatante contenente argentatina C; e 5 in cui preferibilmente detto precipitato di argentatina D purificata è sottoposto a cristallizzazione con l'ottenimento di cristalli di argentatina D pura.

15. Metodo secondo la rivendicazione 14, in cui detta fase d4) è seguita da una fase d5) in cui detto 10 surnatante contenente argentatina C è sottoposto a evaporazione del solvente e il residuo disciolto in un solvente apolare, preferibilmente scelto nel gruppo che comprende cicloesano, petroletere, etere etilico, n-esano e loro combinazioni, più preferibilmente etere 15 etilico, con raffreddamento, con l'ottenimento di un precipitato di argentatina C purificata; e in cui preferibilmente detto precipitato di argentatina C purificata è sottoposto a cristallizzazione con l'ottenimento di cristalli di argentatina C pura.

20. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 5 a 15, in cui detta fase c) è seguita da una fase e1) che comprende una reazione di idrolisi basica della guayulina A ottenuta in fase d1) e/o della miscela di guayulina A e guayulina B ottenuta 25 in fase c) con l'ottenimento di una soluzione contenente parteniolo; in cui preferibilmente detta reazione di idrolisi basica viene condotta in una miscela di reazione che comprende detta guayulina A e/o detta miscela di guayulina A e guayulina B e una soluzione basica; e in cui preferibilmente detta 30 soluzione contenente parteniolo viene sottoposta a cristallizzazione, con raffreddamento, con

l'ottenimento di parteniolo puro.

17. Metodo secondo la rivendicazione 16, in cui detta fase e1) è seguita da una fase e2) di esterificazione del parteniolo così ottenuto, 5 preferibilmente con acido anisico o cloruro di anisile con l'ottenimento di una soluzione contenente guayulina B.

18. Metodo secondo la rivendicazione 17, in cui detta soluzione contenente guayulina B così ottenuta in 10 fase e2) è sottoposta a evaporazione e il residuo disciolto in un solvente apolare, preferibilmente scelto nel gruppo che comprende cicloesano, n-esano, etere etilico, petroletere e loro combinazioni, più preferibilmente petroletere, con l'ottenimento di un 15 precipitato di guayulina B purificata; e in cui preferibilmente detto precipitato di guayulina B purificata è sottoposto a cristallizzazione, con raffreddamento, con l'ottenimento di cristalli di guayulina B pura.

19. Metodo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 5 a 18 in cui detta fase c) è seguita da una fase e3) che comprende una reazione di riduzione dell'argentatina B ottenuta in fase c) e/o in fase d2), preferibilmente in cui la reazione di riduzione viene 25 condotta in una miscela di reazione comprendente detta argentatina B e litio alluminio idruro LiAlH_4 o sodio boro idruro, più preferibilmente sodio boro idruro NaBH_4 , con l'ottenimento di una soluzione contenente argentatina B.

20. Metodo secondo la rivendicazione 19, in cui, 30 in seguito a detta reazione di riduzione, detta soluzione contenente argentatina D così ottenuta è

sottoposta a evaporazione e il residuo disciolto in un solvente apolare, preferibilmente scelto nel gruppo che comprende cicloesano, etere etilico, n-esano, petroletere e loro combinazioni, più preferibilmente petroletere, con l'ottenimento di un precipitato di argentatina D purificata; in cui preferibilmente detto precipitato di argentatina D purificata è sottoposto a cristallizzazione, con raffreddamento, con l'ottenimento di cristalli di argentatina D pura.

10

Barzani & Zanardo Milano S.p.A.

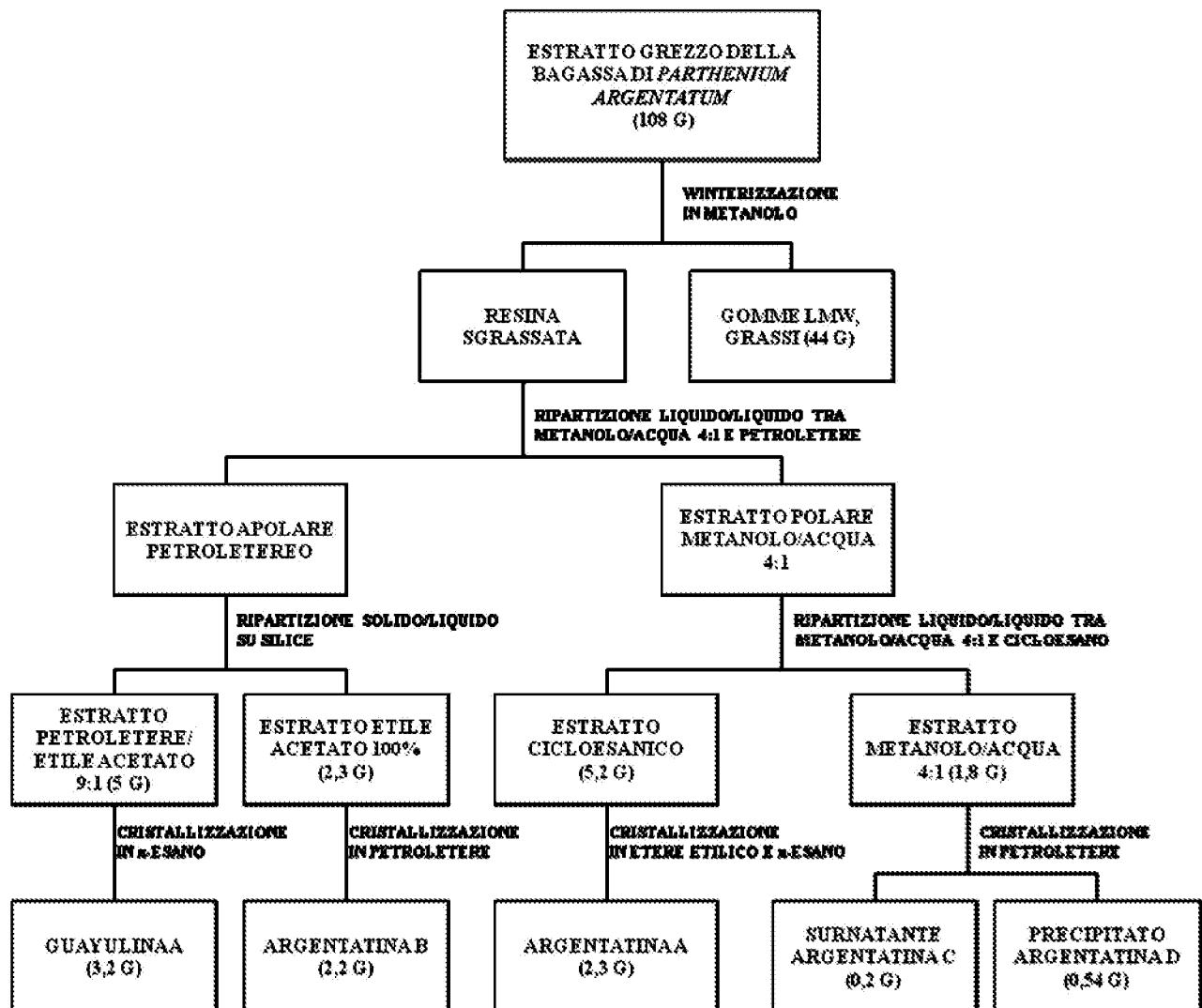


Fig. 1

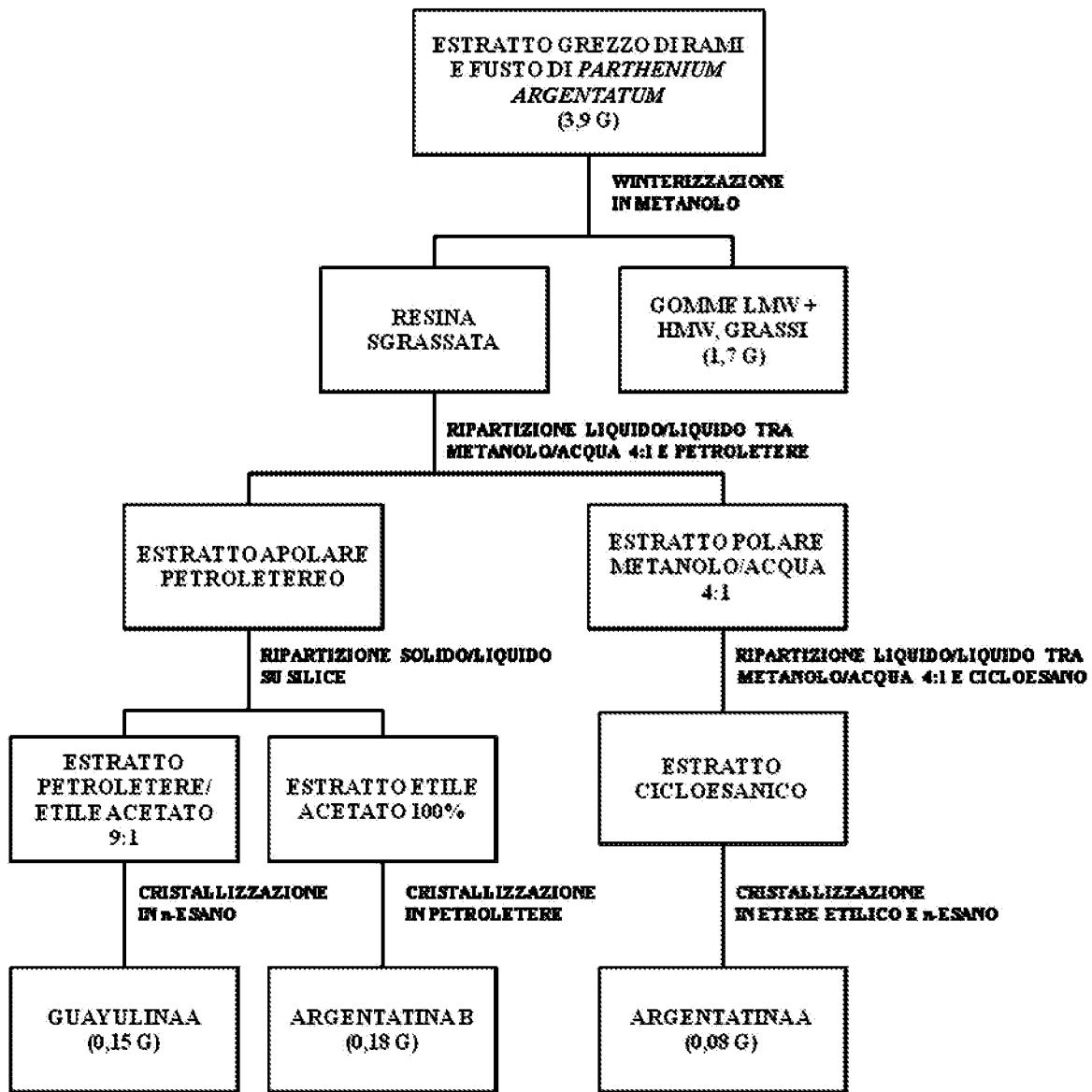


Fig. 2

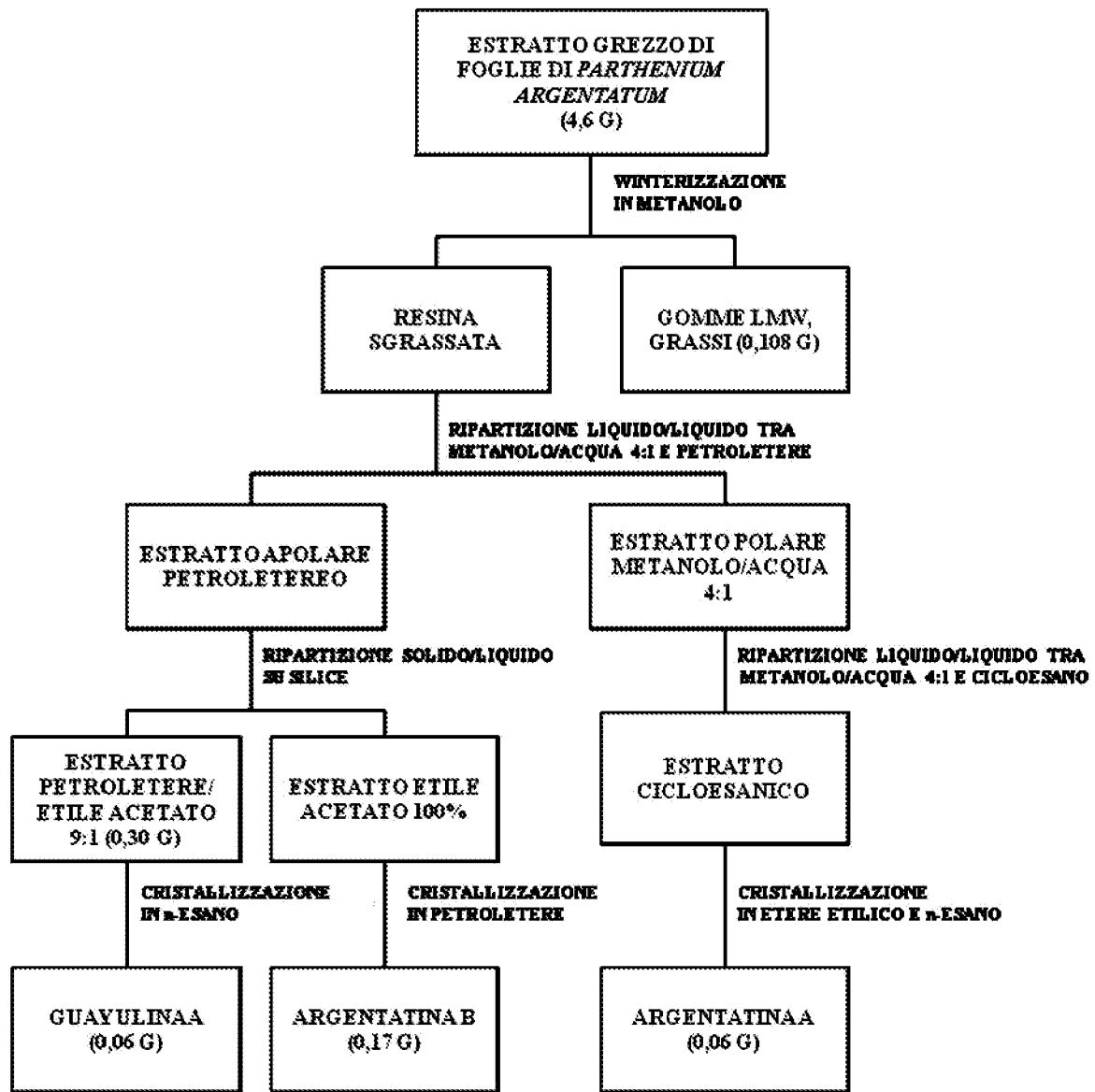


Fig. 3

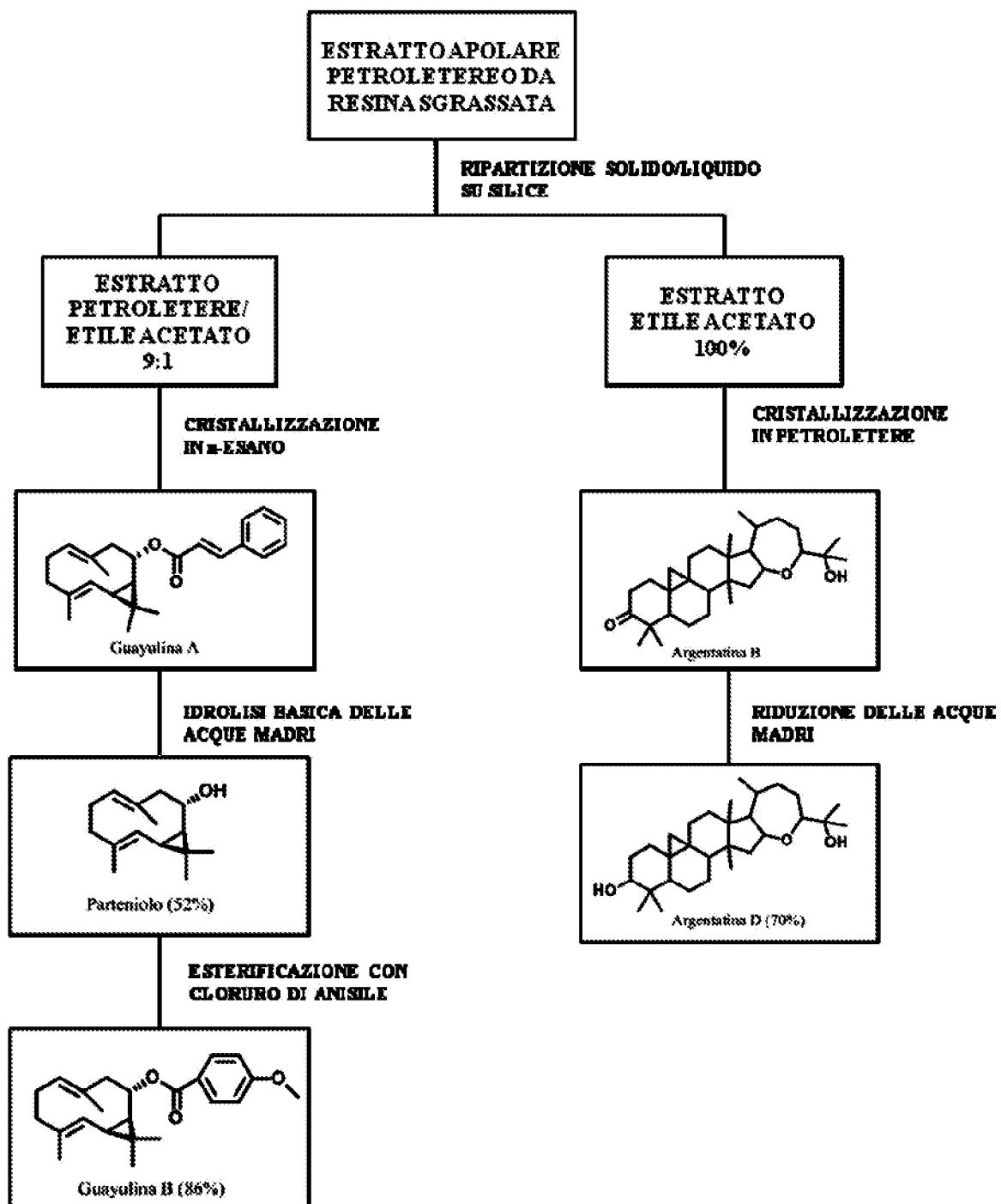


Fig. 4