

P 2001

EX-J



SECCION TECNICA
CLASIFICACION I. P. C.
CLASE <u>C-07</u>
SUBCLASE <u>D</u>

P A T E N T E   D E   I N V E N C I O N

por VEINTE años

cuyo privilegio se solicita para España,  
sus territorios y plazas de soberanía, a  
favor de:

DAIICHI SEIYAKU COMPANY LIMITED

entidad japonesa, domiciliada en No. 1-2,  
3-chome, Edobashi, Nihonbashi, Chuo-ku,  
Tokyo, Japón, relativa a:

"METODO DE PREPARACION DEL ACIDO COMENICO  
Y/O DERIVADOS DEL MISMO"

=====

Inventores: Shunichiro Oga, Katsumi Imada  
y Kazuo Asano



MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un método nuevo para preparar ácido coménico (5-hidroxi-2-carboxi-4-pirona), y más particularmente a un procedimiento para preparar ácido coménico a partir del ácido 2,5-dicetoglucónico y para la obtención de ácido coménico de la mezcla de reacción resultante. Además el ácido coménico puede obtenerse en forma de una sal metálica o de un ester del mismo. - - - - -

5.

Hay pocas publicaciones que traten de la preparación del ácido coménico. Por ejemplo, Aida et al. comunicaron que la presencia de ácido coménico, ácido rubiginoso y rubiginol fue confirmada por cromatografía sobre papel de una disolución de ácido 2,5-dicetoglucónico incubada con *Gluconoacetobacter liquefaciens* y un tampón fosfórico (Aida et al; Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan 21, 30-37 (1957)). Además, comunicaron que el ácido coménico y otros derivados de gamma-pirona se producían por la fermentación de *Gluconoacetobacter liquefaciens* en un medio que contenía glucosa (9,3%), extracto de fermento (0,8%) y carbonato cálcico (2,5%) durante 10 días (Aida et al; Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan 19, 97, (1955)). Este método de fermentación, sin embargo, no tiene utilidad ninguna para la fabricación de ácido coménico debido a su pobre rendimiento

10.

15.

20.



(por ejemplo, sólo se obtuvieron 0,5g de ácido coménico a partir de 140 de glucosa por medio de la fermentación). - -

Por otra parte, se conocen métodos químicos. Los procedimientos químicos implican la oxidación del ácido kójico obtenido por descarboxilación del ácido mecónico. Estos métodos no son económicos debido a que los productos de partida son muy caros. - - - - -

5.

El ácido coménico puede obtenerse por calentamiento de una disolución acuosa de ácido 2,5-dicetoglucónico a una temperatura en el intervalo de 20-200°C y a un pH entre 1,0 y 7,0. El ácido coménico puede separarse fácilmente de la mezcla de reacción que contiene derivados de gamma-pirona por recristalización con agua utilizando la diferencia de solubilidad entre el ácido coménico y los derivados de gamma-pirona. Las sales del ácido coménico se obtienen haciendo reaccionar una sal metálica del ácido glucónico por el presente procedimiento y los ésteres se obtienen efectuando la presente reacción en presencia de un alcohol alifático de cadena corta y un ácido mineral. - - - - -

10.

15.

20.

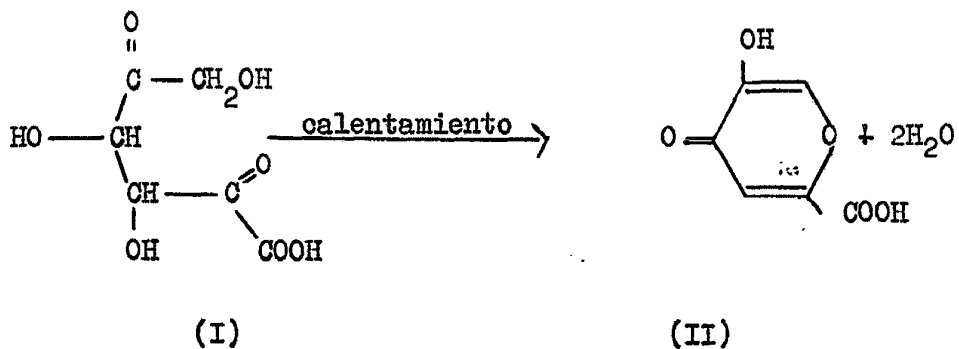
Así un objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento nuevo y valioso para la obtención de ácido coménico que es útil para la preparación de maltol, un aditamento de los alimentos útil como sabor. - - - - -

25.

Se ha encontrado, como resultado de la experimentación de los inventores, que el ácido 2,5-dicetoglucónico puede convertirse primordialmente en ácido coménico y otros derivados de gamma-pirona con altos rendimientos. La reacción tie



ne lugar a partir del ácido 2,5-dicetoglucónico (I) a ácido coménico (II) como resultado de una deshidratación y de una reacción de transposición como se muestra en el esquema siguiente: - - - - -



5. De acuerdo con la presente invención, el ácido coménico (II) se obtiene económicamente calentando una disolución acuosa de ácido 2,5-dicetoglucónico(I). El ácido coménico puede separarse con buenos rendimientos de la mezcla de reacción junto con otros derivados de gamma-pirona obtenidos como sub-productos. - - - - -

10.

El producto de partida utilizado en la presente invención, a saber, el ácido 2,5-dicetoglucónico (I), se obtiene fácilmente como un metabolito por métodos de preparación conocidos, tales como la fermentación del *Gluconobacter melanogenum* MA 62 y/o bacterias oxidantes pertenecientes al *Gluconoacetobacter liquefaciens*, en un medio de glucosa (Katznelson et al., J. Biol. Chem. 204, 43 (1953); Aida et al. Bull. Agr. Chem. Soc. Japan, 21, 30-37 (1957)). - - - - -

15.

Según la presente invención, el ácido coménico (II) se



5. obtiene calentando una disolución acuosa de ácido 2,5-dicetoglucónico (I) al 1-30% o un líquido de fermentación que contiene ácido 2,5-dicetoglucónico (I) a una temperatura de 20-200°C. El intervalo de temperatura preferido es de 50-120°C y el pH de la disolución de reacción que contiene el ácido 2,5-dicetoglucónico (I) puede estar en el intervalo de 1,0 a 7,0, preferentemente de 1,0 a 4,0. Así, el ácido glucónico (I) se convierte en varios derivados de gamma-pirona . - - -

10. Se halló que el ácido 2,5-dicetoglucónico (I) se convertía en derivados de gamma-pirona con un rendimiento 20% superior. (en comparación con el caso en que no estaban presentes sales de metales alcalinoterreos) en presencia de un carbonato de metal alcalinotérreo, tal como carbonato cálcico o carbonato bórico, en la disolución de reacción. La existencia de 15. trazas de sales de hierro, níquel o cobalto en la disolución también afectaba la reacción de una manera favorable, indicando un efecto catalítico, aunque la razón por la que estos iones metálicos actúan efizcamente no ha sido determinada. - -

20. Una gran cantidad de ácido coménico y pequeñas cantidades de otros derivados de gamma-pirona, tales como ácido rubiginico, ácido piromecónico, rubiginol, etc. que reaccionan positivamente con sulfato férrico, se extrajeron de la mezcla de reacción con un disolvente orgánico tal como éter. - - - -

25. El rendimiento de derivados de gamma-pirona fue influenciado negligiblemente por las condiciones de la reacción. Por ejemplo, una disolución acuosa de ácido glucónico (I) al 5% se calentó a 120°C durante unos 30 minutos. Las proporciones de productos obtenidos se indican a continuación: - - - - -



Acido coménico/Acido rubiginico/Acido piromecónico/  
Rubiginol/Otros productos positivos al sulfato férrico = 70/  
9,4/5,4/5,4/9,4. - - - - -

5. Además, un producto de reacción compuesto de una gran proporción de ácido coménico y trazas de otros derivados de gamma-pirona se obtuvo calentando a 50°C durante varios días.

10. Se realizó un análisis cuantitativo de los derivados de gamma-pirona según el método colorimétrico del ácido kójico (Ishie et al., Nippon Nogeikagaku Kaishi 46, 353-358 (1966)). La cantidad total de gamma-pirona (igual al ácido coménico) se calculó a partir de la densidad óptica medida a 500m $\mu$  con un espectrofotómetro. La formación de color se determinó como sigue: - - - - -

15. Medio mililitro de la muestra a probar (que contenía derivados de gamma-pirona) se trata sucesivamente en un tubo con 1,2 ml de ácido sulfúrico al 10%, 0,4 ml de sulfato férrico al 5% y 2,9 ml de agua destilada. La proporción de la cantidad de cada derivado de gamma-pirona se calculó por comparación con el valor que se había medido por el análisis colorimétrico antes descrito, comparando las manchas separadas en un cromatograma de papel obtenido a partir de la mezcla de reacción. - -

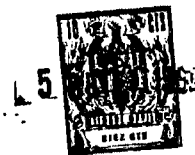
25. El ácido coménico (II) se separó fácilmente en estado puro de los otros derivados de gamma-pirona por recristalización con agua, puesto que el ácido coménico (II) tiene una solubilidad muy distinta. En vista del hecho anterior, los extractos que contenían ácido coménico y otros derivados de gamma



5. -pirona pueden disolverse en agua por calentamiento, tratarse con carbón activo, filtrarse por succión mientras se mantienen calientes y el filtrado se condensa a presión reducida. Entonces cristaliza el ácido coménico. La recrystalización del ácido coménico en agua da cristales en forma de placas o rosetas que funden a 276°C. Los cristales obtenidos son idénticos a los de ácido coménico normal (obtenido por otros métodos de preparación) por lo que se refiere al análisis elemental, al análisis del espectro UV, al análisis del espectro IR y a los ensayos de fusión mixta. - - - - -

15. Además, puesto que el procedimiento de la presente invención es eficaz cuando el ácido glucónico se emplea en forma de una sal metálica del mismo, por ejemplo, tal como una sal de calcio, sodio, potasio y similares, es posible utilizar una disolución de fermentación utilizada para la obtención del mencionado ácido 2,5-dicetoglucónico, en la forma en que está, en la reacción de conversión a ácido coménico, lo que es muy ventajoso. El ácido coménico, que es el producto deseado, está en una forma libre, y es posible, de hecho, obtenerlo en forma de una sal metálica.- - - - -

25. También, es fácil obtener un éster alifático del ácido coménico por el método de esta invención. En otras palabras, es posible obtener un comenato de alcohol en una sola etapa llevando a cabo la reacción de conversión a ácido coménico en presencia de catalizador ácido mineral disuelto en un alcohol que dé el éster deseado. La esterificación tiene lugar al mismo tiempo que la conversión en ácido coménico. Un catalizador tí-



5. pico es una disolución del 3 al 10% de ácido clorhídrico, en estado gaseoso, en alcohol. De esta manera, la reacción tiene lugar fácilmente bajo las mismas condiciones que las utilizadas para la preparación de ácido coménico. El alcohol utilizado en la esterificación contiene de 1 a 6 átomos de carbono. -

10. Para definir mejor la invención, cuando se utiliza un carbonato, puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1 a 5 por ciento en peso (peso total). El "catalizador" (sales de hierro, níquel, cobalto) está generalmente presente en una cantidad aproximada de 0,01 a 1 miligramos. - - - - -

Quando se utiliza un líquido de fermentación, se ha encontrado generalmente que la concentración de ácido glucónico en el mismo es aproximadamente de 1 a 30 por ciento en peso. -

15. Para definir mejor el "tiempo de calentamiento" de la presente invención, este tiempo puede variar generalmente de unos 30 minutos a unas 100 horas, con condiciones de temperatura de unos 50 a unos 120°C. - - - - -

20. Los símbolos de porcentaje utilizados en esta memoria indican porcentajes en peso. Desde luego, esto se aplica a los ejemplos y a las reivindicaciones. - - - - -

Como se describió anteriormente, el método de preparación de ácido coménico es simple, de utilidad industrial, y además tiene la gran ventaja de obtenerse con altos rendimientos. Los ejemplos siguientes ilustran la invención. - - - - -



EJEMPLO I

Se disolvieron en agua 20 g de 2,5-dicetogluconato cálcico crudo (de una pureza de alrededor del 45% calculada por el método de reducción de Katznelson) y se añadió a la disolución una resina de intercambio catiónico (Amberlite IR-120) para eliminar las sales. La resina se separó por filtración y el filtrado se diluyó hasta 200 ml con agua. La disolución resultante de ácido 2,5-dicetogluconico al 4,5% se calentó a 100°C durante una hora, convirtiéndose el 66,5% del producto de partida en derivados de gamma-pirona. La proporción de obtención de cada derivado de gamma-pirona fue como sigue: Acido coménico/otros derivados de gamma-pirona = 7,5/2,5. - - - - -

La mezcla de reacción se extrajo continuamente con éter durante 45 horas. Después de la eliminación del éter, la mezcla de derivados de gamma-pirona se lavó con una pequeña cantidad de agua fría, el residuo insoluble se disolvió en agua caliente, se decoloró con carbón y la disolución se concentró a presión reducida. Se obtuvieron cristales en forma de placas o rosetas (rendimiento 2,76 g; 45%) que fundían a 276°C. - - - -

EJEMPLO II

Una cepa de Acetobacter melanogenum IFO 3292 se hizo fermentar en el siguiente medio de cultivo durante 3 días.

(Medio)

- |     |                      |                   |
|-----|----------------------|-------------------|
|     | glucosa              | 5%                |
|     | extracto de fermento | 0,5%              |
| 25. | carbonato cálcico    | cantidad adecuada |
|     | agua                 | hasta 100 ml.     |



El líquido de fermentación obtenido contenía 1,5-2,5% de ácido 2,5-dicetogluconico. Se calentó a 121°C bajo una presión de 15 libras/pulgada<sup>2</sup> (aproximadamente, 1,05 kg/cm<sup>2</sup>) durante 30 minutos. Un 81,5% de metabolito (ácido 2,5-dicetogluconico) se convirtió en derivados de gamma-pirona. (La proporción de obtención de cada derivado de gamma-pirona fue como sigue: ácido coménico/otros derivados de gamma-pirona= 7/3). - - - - -

Se añadieron 0,1 g de carbón a la mezcla de reacción y se filtró inmediatamente por succión. El filtrado se hizo pasar a través de una columna de resina de intercambio catiónico (Amberlite IR-120) para eliminar los iones metálicos. Después de la condensación del eluido resultante a presión reducida, el concentrado se dejó en reposo toda la noche. Cristalizaron 0,8 g de ácido coménico, y cuando las aguas madres se extrajeron y trataron del mismo modo que se describió en el Ejemplo I se obtuvieron otros 0,15 g de ácido coménico. - - - - -

EJEMPLO III

Se centrifugaron 100 ml de líquido de fermentación obtenido según el procedimiento descrito en el Ejemplo II durante 10 minutos a 8000 rpm. Se añadió, al líquido sobrenadante que se formó, una resina de intercambio catiónico (Amberlite IR-120) para eliminar las sales. La mezcla se filtró. El filtrado resultante se calentó a 50°C en un incubador durante varios días, y un 73% del metabolito (ácido 2,5-dicetogluconico) se convirtió en derivados de gamma-pirona (La mezcla de reacción contenía una gran cantidad de ácido coménico y trazas de ácido rubiginico). Cuando la mezcla de reacción se trató del mis-



mo modo descrito en el Ejemplo II, se obtuvieron 1,1 g de ácido coménico. - - - - -

EJEMPLO IV

5. A 10 litros de una disolución que contenía glucosa (8%) y extracto de fermento (0,5%) se le añadió 1 litro de un cultivo fermentado de *Acetobacter melanogenum* (IFO 3292). La mezcla se hizo fermentar durante 3 días a una temperatura de 30°C, y se mantuvo a un pH entre 4,2 y 4,5 por adición automática de disolución de hidróxido sódico durante la fermentación. Después

10. de la fermentación el pH se ajustó a 2,0-4,0 por la adición de ácido sulfúrico, y el líquido de fermentación (que contenía ácido 2,5-dicetoglucónico) se calentó durante 4 horas a 100°C. La mezcla de reacción se decoloró con carbón, se concentró a presión reducida, se aciduló con ácido clorhídrico y se dejó

15. en reposo durante toda la noche. Se obtuvieron 241,5 g de ácido coménico. - - - - -

EJEMPLO V

20. Se calentaron 10 litros del líquido de fermentación obtenido según el procedimiento descrito en el Ejemplo IV durante 4 horas a 100°C. La mezcla de reacción (ajustada a pH 6,0-6,5 con hidróxido sódico) se decoloró con carbón y se evaporó hasta un pequeño volumen a presión reducida con lo que se obtuvieron 250 g de comenato sódico. - - - - -

EJEMPLO VI

25. El filtrado libre de sales obtenido según el procedimiento descrito en el Ejemplo I se evaporó a presión reducida hasta sequedad, y se mezcló con 180 ml de alcohol etílico que contenía



L 5 SET

ácido clorhídrico gaseoso en una concentración del 5%. La mezcla se reflujo durante una hora. Después de reflujo, se evaporó el exceso de alcohol etílico y el residuo se lavó con 200 ml de agua. Los cristales crudos se recrystalizaron en agua caliente dando 4,3 g de comenato de etilo que fundía a 126,5°C. - - - - -

EJEMPLO VII

Se añadieron 225 ml de alcohol etílico que contenía ácido clorhídrico gaseoso en una concentración del 5% a 20 g de 2,5-dicetogluconato cálcico (de una pureza de alrededor del 45% calculado por el método de reducción de Katznelson) y la mezcla se calentó a reflujo durante una hora. Después de calentar, el cloruro cálcico producido en la mezcla de reacción se separó por filtración y el exceso de alcohol etílico se evaporó. El residuo se lavó con 200 ml de agua y los cristales crudos se recrystalizaron en agua caliente dando 4,5 g de comenato de etilo que fundía a 126,5°C. - - - - -

EJEMPLO VIII

De la misma manera que se indicó en el Ejemplo VI, se convirtió el ácido 2,5-dicetogluconico en forma libre en comenato de metilo con buen rendimiento utilizando alcohol metílico en vez de alcohol etílico como en el Ejemplo VI. Así, el comenato de metilo obtenido fundía a 183°C (descomposición). - - - - -

EJEMPLO IX

De la misma manera que se indicó en el Ejemplo VII, se convirtió con buen rendimiento el 2,5-dicetogluconato cálcico en comenato de propilo utilizando alcohol propílico en vez de alcohol etílico como en el Ejemplo VII. Así, el comenato de propilo



obtenido fundía a 105°C. - - - - -

N O T A

Se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - - - - -

R E I V I N D I C A C I O N E S

- 5. 1.- Método de preparación del ácido coménico y/o derivados del mismo, y más particularmente del ácido coménico y sus sales metálicas, caracterizado porque comprende calentar una disolución acuosa de un miembro seleccionado del grupo que consta de ácido 2,5-dicetoglucónico y sus sales metálicas. - - - - -
- 10. 2.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el calentamiento se lleva a cabo a una temperatura de entre unos 20 a 200°C. - - - - -
- 15. 3.- Método según la reivindicación 2, caracterizado porque el calentamiento se lleva a cabo a una temperatura entre unos 20 y unos 120°C. - - - - -
- 4.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la concentración de la disolución acuosa del producto de partida es de 1 a 30% en peso. - - - - -
- 20. 5.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la reacción por calentamiento se lleva a cabo en presencia de por lo menos un carbonato de metal alcalinotérreo. - - - - -
- 6.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la reacción por calentamiento se lleva a cabo en presencia
- 25. de un catalizador seleccionado del grupo que consta de sales fé



rricas, ferrosas, de níquel y de cobalto, y de mezclas de las mismas. - - - - -

7.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el calentamiento se lleva a cabo a un pH de entre unos 1,0 y unos 7,0. - - - - -

5. 8.- Método según la reivindicación 7, caracterizado porque el calentamiento se lleva a cabo a un pH de entre unos 1,0 y unos 4,0. - - - - -

10. 9.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la disolución acuosa está compuesta por un líquido de fermentación que contiene un sal metálica del ácido 2,5-dicetoglucónico. - - - - -

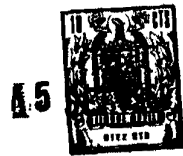
15. 10.- Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la sal metálica se selecciona del grupo que consta de sales de metales alcalinotérreos y sales de metales alcalinos. - - - - -

11.- Método según la reivindicación 10, caracterizado porque el metal alcalinotérreo es calcio. - - - - -

12.- Método según la reivindicación 10, caracterizado porque el metal alcalino es sodio. - - - - -

20. 13.- Método según la reivindicación 10, caracterizado porque el metal alcalino es potasio. - - - - -

25. 14.- Método de preparación del ácido coménico y/o derivados del mismo, y más particularmente de esteres alifáticos de cadena corta del ácido coménico, caracterizado porque comprende calentar un compuesto seleccionado del grupo que consta de ácido



2,5-dicetogluconico y sus sales metálicas con un alcohol ali-  
fático de cadena corta de 1 a 6 átomos de carbono en presencia  
de ácido mineral. - - - - -

5. 15.- Método según la reivindicación 14, caracterizado  
porque el ácido mineral es ácido clorhídrico. - - - - -

16.- Método según la reivindicación 15, caracterizado  
porque la concentración de ácido clorhídrico es de 3 a 10% en  
peso. - - - - -

10. 17.- Método según la reivindicación 14, caracterizado  
porque el mencionado alcohol es metanol. - - - - -

18.- Método según la reivindicación 14, caracterizado  
porque el mencionado alcohol es alcohol etílico. - - - - -

19.- Método según la reivindicación 14, caracterizado  
porque el mencionado alcohol es alcohol propílico. - - - - -

15. 20.- "MÉTODO DE PREPARACION DEL ACIDO COMENICO Y/O DERI-  
VADOS DEL MISMO" - - - - -

Todo ello conforme se describe y reivindica en la presen-  
te memoria que consta de quince hojas, foliadas y mecanografía-  
das por una sola de sus caras.

mcp.

BARCELONA, 5 SET. 1969

P. A. M. CURELL SUÑOL