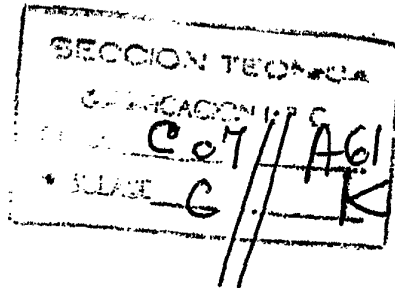


367906



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

por "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE POLIHIDROXIFENILCROMONAS ESTABILIZANTES DE LA ESTRUCTURA CELULAR Y EL CITOMETABOLISMO", a favor de la firma alemana DR. MAD AUS & CO., residente en Ostmerheimer Str. 198, KÜLN-MERHEIM (Alemania).

= . =

MEMORIA DESCRIPTIVA

5. Se ha descubierto que ciertas polihidroxifenilcromonas (por ejemplo, la silimarina) ejercen efecto protector y estabilizador sobre las biomembranas intracelulares en los lugares del citometabolismo y a causa de esta acción inédita constituyen medicamentos valiosos.

10. Para obtenerlas en escala industrial son impropias las propuestas emitidas hasta hoy día para el aislamiento a escala de laboratorio, pues el material de partida, el fruto del *Silybum marianum* Gaerth., contiene hasta el 30 % de aceites grasos y materias concomitantes difíciles de separar y



únicamente se obtienen concentrados crasos que vuelven extraordinariamente difícil la elaboración ulterior. Asimismo, la operación según dichas propuestas sería mala de realizar en escala técnica a causa del grandísimo dispendio de tiempo y de los muchos disolventes distintos que se utilizan por separado y en repetición consecutiva para separar las materias concomitantes inactivas y los aceites grasos.

5. Así, el método, usual para los procedimientos de obtención, de desengrarse por extracción exige varios días y la mayoría de las veces no es suficiente.

10. En cambio, si se renuncia, como prevé el invento, al desengrase completo y se modifica la operación de manera que pueda utilizarse material de partida con un 5 a 10 % de grasa, el desengrase puede efectuarse mediante presión alta, de preferencia con empleo de prensas helicoidales, como las que se utilizan para las semillas oleaginosas, y puede separarse del 20 al 25 % del aceite graso sin pérdida de substancia activa.

15. Con este método de desengrase se ahorra también la molidura que en otro caso es necesaria, pues el complejo celular se desgarró hasta tal punto con la gran presión y la trituración en la prensa helicoidal que las materias activas pueden pasar de manera rápida y completa al medio de extracción.

20. Pero a causa del contenido residual de aceite graso, debe todavía buscarse primeramente un agente de extracción en el que tengan muy buena solubilidad tanto los agentes grasos como las materias activas. En ensayos en serie se ha hallado que la aptitud óptima corresponde al acetato de etilo. Este

25.



permite una extracción a fondo ya en 24 horas, mientras que para la extracción con acetona en escala de laboratorio se indicaba un tiempo de extracción de 14 días.

5. Aunque después de la evaporación del acetato de etilo se obtiene un producto parcialmente grumoso, oleoso y craso, con un 20 a 30 % de materia activa, había de intentarse, para evitar tratamientos repetidos con diversos disolventes, separar las materias activas de las materias concomitantes y los aceites grasos valiéndose de un proceso de distribución entre dos fases líquidas limitadamente miscibles.
- 10.

- La busca de un sistema disolvente apto para esto fracasó durante mucho tiempo porque, en todos los pares de fases investigados, del índice de distribución G_M de la mezcla de las materias concomitantes y el aceite graso y del índice de distribución G_W de las materias activas se derivaba un factor de separación β tan bajo que el número de las etapas de distribución necesarias hubiera exigido un gasto de equipo insoportable.
- 15.

- Con el par de fases metanol/éter de petróleo (40-60°), que se investigó por último, se calculó a base de los coeficientes de distribución $G_M = 0,25$ y $G_W = 0,038$ resultantes para una concentración de sustancia del 2 % el factor de separación β 6,5, lo que teóricamente, para un enriquecimiento del 70 a 80 %, hubiera exigido todavía alrededor de 20 etapas de distribución. Pero en la realización práctica apareció, durante la distribución, un corrimiento de fases muy intenso dentro del sistema. Los intentos de reducirlo por adición de
- 20.
- 25.



agua dieron buen resultado.

5. El sistema ternario metanol/agua/éter de petróleo que a continuación se investigó demostró ser utilizable. Por último, se halló que lo óptimo era una mezcla de metanol-agua-éter de petróleo : metanol/agua (95 : 5) como fase inferior en equilibrio con éter de petróleo puro (40 - 60°). El sistema puesto en equilibrio mostró además la ventaja de un corrimiento inesperado de los índices de distribución en favor del proceso de purificación perseguido para las materias activas.

10. En la utilización práctica del sistema según este invento se comprobó, sorprendentemente, que un número de etapas $n = 6$ basta ya para obtener un enriquecimiento de materia activa del 70 al 80 %.

15. En la distribución multiplicativa, que puede efectuarse por saltos o uniformemente y que de preferencia se realiza en contracorriente. Las materias activas se enriquecen en la fase inferior y pueden ser retiradas con la fase inferior al final de la instalación.

20. En el aspecto de equipo se necesitan para la distribución multiplicativa uniforme seis etapas individuales, por ejemplo con un separador centrífugo y un emulsionador para cada una, conectados de tal modo uno tras otro que la materia activa purificada salga continuamente con la fase pesada, mientras que la fase superior, llevada en contracorriente contra la fase inferior, sale por el extremo opuesto de la batería después de pasar por seis etapas de emulsión y separación.

25.



Se logra un grado de acción comparable en una instalación de columnas según Ziehl, para lo cual hay que disponer un número teórico de fondos de 10 a 12 (calculado a base de HTU = height for one transfer unit).

5. En ambas modalidades de procedimiento se ha acreditado tanto el aporte de substancia al principio de la batería, según Jantzen, como el aporte al centro, según van Dyk. El aporte se efectúa en forma de disolución al 2 % en la fase inferior.
10. Después de la distribución, pueden obtenerse de la fase inferior, por evaporación, las materias activas purificadas, en forma de producto seco de color beige. Este producto contiene de 70 a 80 % de silimarina y puede utilizarse directamente en esta forma o también después de ulterior purificación o separación.
15. En la separación por cromatografía de capa delgada de la silimarina obtenida pueden discernirse sobre placas de poliamida con el separador cloroformo : metanol : metiletilcetona (60 : 14 : 26) y una solución al 1 % de dinitrofenilhidracina cuatro substancias I, II, III y IV, claramente separadas una de otra.
20. La substancia silimarina I, que presenta el índice R_f mayor, pudo ser dilucidada en su estructura esencial. Tiene la fórmula aditiva $C_{25}H_{22}O_{10}$ y es un 5,7-dihidro-2-(3'-metoxi-4'-hidroxifenil)-cromanon-3-ol que está substituído en la posición 3 con un radical $C_9H_9O_3$. Presenta un punto de fusión de 167° C.
- 25.



Las otras sustancias II, III y IV no están todavía dilucidadas en su estructura, pero pueden separarse por cromatografía en columna y por cristalización. Todas ellas presentan en la prueba farmacológica las mismas acciones que la silimarina I.

5.

Por tanto, a causa de la gran coincidencia farmacológica, está justificado retener para el producto del procedimiento constituido por una mezcla de las sustancias I, II, III y IV la designación de "silimarina" y llamar a los componentes individuales "silimarina I", "silimarina II", "silimarina III" y "silimarina IV".

10.

La silimarina I puede separarse inmediatamente, por cristalización, de la fase inferior que sale del aparato de distribución. Para ello, después de tratar la fase inferior con carbón activo, se la concentra primeramente sólo hasta el punto de que, después de separar el carbón activo, la silimarina I se precipite en forma cristalina cuando se prosigue la concentración.

15.

La obtención de las polihidroxifenilcromonas, y en particular de la silimarina o de sus componentes, abarca por lo tanto, según este invento, los pasos de procedimiento siguientes :

20.

1). Expresión bajo presión alta, preferentemente en una prensa helicoidal, de la cantidad principal de los aceites grasos.

25.

2). Extracción a fondo, con acetato de etilo, de los residuos de prensa todavía oleosos, evaporación del disolvente



y obtención de un extracto primario oleoso y craso.

3). Distribución multiplicativa uniforme del extracto primario en el sistema disolvente de este invento y obtención de un producto seco con un contenido de 70 a 80 % de silimarina.

5. 4(. Eventualmente, separación previa de la silimarina I, por cristalización, de la fase unferior y obtención de las otras polihidroxifenilcromonas de las aguas madres.

Ejemplo

10. 1).- En una prensa helicoidal para semillas oleaginosas se exprimen bajo gran presión 100 kg de frutos desecados de *Silybum marianum*, para separar la cantidad principal de aceites grasos. Quedan alrededor de 75 a 80 kg de residuos de prensa con un contenido de aceite residual de 5 a 10 %.

15. 2).- Se extraen a fondo con acetato de etilo 80 kg de los residuos de prensa. Después de evaporar el acetato de etilo, quedan alrededor de 5 a 6 kg de un residuo seco, oleoso y graso, en parte grumoso, con un contenido de materia activa de 20 a 30 %.

20. 3).- Se disuelve el residuo seco, hasta el 2 % en peso, en la fase inferior del sistema, puesto en equilibrio, metanol/agua (95 : 5) / éter de petróleo (40-60°) y se centrifuga para clarificarlo de las materias sólidas floculentas. Volumen final : alrededor de 300 litros de fase inferior.

25. Se conectan en serie 6 separadores centrífugos individuales para separación de líquido/líquido, con intercalación cada vez de una etapa de emulsión y de modo que la fase inferior circule en dirección opuesta a la superior, con lo cual



ambas fases se emulsionan entre sí en cada una de las etapas de emulsión, para cambiar materia. En la etapa de separador que sigue cada vez, la emulsión se vuelve a separar en fase pesada y fase ligera. Las conducciones están dispuestas de modo que la fase superior separada llegue en contracorriente a la fase inferior en la etapa de emulsión que precede en cada caso, y así sucesivamente.

La fase superior y la inferior se llevan primeramente una hacia otra en la batería de distribución sin recargo de sustancias y de manera continua, lo que hace que se establezca el equilibrio de fases. Luego se alimenta continuamente a la fase inferior circulante la solución de sustancia al 2 %. Al alimentar a la entrada de la fase inferior hay que procurar que no se altere la relación de volumen total fluente fase superior : fase inferior = 1 : 1.

La rapidez de circulación de ambas fases depende en gran medida del grado de eficacia de los aparatos de emulsión y de los separadores. El ajuste óptimo puede averiguarse gravimétricamente por medio de determinaciones cuantitativas del índice de transición de materia.

La fase inferior (alrededor de 300 litros) que sale de la batería de distribución se seca en vacío de 20 mm de Hg, lo que da un polvo de color beige hasta pardusco, con un rendimiento ponderal de 3,1 kg. El contenido de materia activa (silimarina) se halla entre 70 y 80 %, de lo que se deduce un rendimiento de materia activa de 2,2 %, calculado respecto al material de partida.



4).- Modificación para la obtención directa de silimarina I de la fase inferior :

5. Se recoge la fase inferior (alrededor de 300 litros) que sale de la batería de distribución, se la trata con 1,5 kg de carbón activo y se la concentra en vacío de 20 mm de Hg hasta 100 litros. Se clarifica en una prensa de filtro la solución todavía caliente y a continuación se la concentra aún más. Al llegar al volumen residual de unos 50 a 30 litros, se inicia una cristalización creciente. Según el grado de concentración, se obtiene un cristalizado de color blanco a ocre.

10. Este cristalizado presenta un punto de fusión de 167 a 169° C. Está constituido por silimarina I y tiene un grado de pureza de 95 a 100 %.

15. Las aguas madres que quedan después de la separación del cristalizado y que contienen silimarina II, III y IV se secan por ulterior concentración en vacío de 20 mm de Hg.

20. Las polihidroxfenilcromonas obtenidas por el procedimiento de este invento mostraron ya en las primeras experiencias con animales marcada acción protectora frente a las influencias nocivas para el hígado. En el interín pudo dilucidarse, en particular mediante investigaciones con el microscopio electrónico, en qué radica la protección, sorprendentemente siempre igual e intensa, contra los agentes nocivos de las mas diversa naturaleza.

25. Las lesiones experimentales con tetracloruro de carbono ocasionan en el hígado de las ratas alteraciones compa-



- rables histológicamente con la hepatitis humana. Las imágenes del microscopio electrónico muestran alteraciones estructurales en las células parenquimatosas, destrucción y tumefacción en los mitocondrios y junto a ellos y un decrecimiento del retículo endoplasmático, de las ribosomas y del glicógeno. Esto es atribuible a una lesión, ocasionada por el tetracloruro de carbono, de las membranas extracelulares e intracelulares que circundan tanto la célula como las diversas partículas endoplasmáticas, pues toda alteración de estas biomembranas altera el curso normal de una o varias funciones parciales y conduce también a una salida de fermentos y otras materias y, viceversa, a la inclusión de materias perjudiciales.

- En los hígados de las ratas que habían recibido silimarina antes del tetracloruro de carbono no se manifestó ya en ninguno de los orgánulos celulares de las células parenquimatosas lesión alguna, los mitocondrios y el retículo endoplasmático estaban estructurados con regularidad y el glicógeno estaba distribuido normalmente en las células parenquimatosas.
- La silimarina ha podido impedir, por lo tanto, la lesión inminente de las biomembranas y las alteraciones de la ultraestructura y del metabolismo de la célula.

- Esta acción protectora de la silimarina sobre la estructura celular y el citometabolismo quedó también confirmada en otras numerosas series de ensayos, en los que pudieron evitarse o reducirse considerablemente con la silimarina las consecuencias, llevadas hasta las más graves necrosis, de in-



toxicaciones experimentales, por ejemplo con tioacetamida, alcohol alílico, alfa-amanitina, faloidina y aloxano. Incluso pudieron eliminarse con la silimarina lesiones que ya se habían producido. Por microscopia electrónica se demostró que

5. la estructura de los mitocondrios y del retículo endoplasmático, considerablemente destruída después de administraciones de alfa-amanitina, se restablecía por completo con la silimarina. El restablecimiento de la integridad perturbada significa que la silimarina no sólo ejerce acción protectora, sino

10. también estabilizante.

Se ofrece así, como principio terapéutico completamente nuevo, la actuación directa sobre los elementos estructurales de las células hepáticas.

De 600 casos evaluados de hepatitis crónica, estados

15. posthepáticos y cirrosis del hígado se comprobó, después de un promedio de 5 semanas de administración diaria de 0,2 g de silimarina, una regresión superior al 60 %. Las pruebas más importantes de las funciones del hígado mostraron por término

20. medio una regresión del doble en comparación con un grupo de control tratado del modo ordinario. En la adiposis del hígado, el hallazgo bióptico después del tratamiento con silimarina indicó la curación para el 67 % de los casos, mientras en un grupo de control sólo se halló en el 40 % de los casos.

En todos los casos se advirtió al cabo de breve tiempo

25. mejoría del estado general, remisión del meteorismo y de la sensación de tensión en el hipocondrio derecho, aumento del apetito y del peso corporal y mayor capacidad funcional. No se observaron acciones secundarias aún después de tratamiento prolongado.



N O T A

5. Descrito el objeto del presente invento, se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones con prioridad de la solicitud de patente alemana nº P 19 23 082.1 del 6 de mayo de 1969.

10. 1.- Procedimiento para la obtención de polihidroxiifenilcromonas estabilizantes de la estructura celular y el citometabolismo, caracterizado por desgarrarse en el complejo celular, mediante gran presión mecánica, preferentemente en una prensa helicoidal, frutos desecados de *Silybum marianum* Gaertn., para exonerarlos de la cantidad principal del aceite graso; extraerse a fondo con acetato de etilo el residuo de prensa que

15. presenta todavía un contenido residual de aceite de 5 a 10 %; evaporarse el acetato de etilo; disolverse en el 2 % en peso, en la fase inferior de un sistema disolvente apropiado para la separación de las materias concomitantes indeseadas, por ejemplo el sistema disolvente constituido en esencia por metanol y

20. éter de petróleo, el residuo seco, oleoso-craso y parcialmente grumoso, que contiene alrededor de 20 a 30 % de materia activa; centrifugarse para clarificar y eliminar las partículas flocculentas de materia sólida; someterse el residuo en dicho sistema disolvente a la distribución multiplicativa, de preferencia

25. uniforme, en contracorriente; separarse de la fase inferior saliente, por concentración en vacío, un polvo pardusco que contiene 70 a 80 % de polihidroxiifenilcromonas; y eventualmente



separarse ya directamente de la fase inferior la silimarina I que durante la concentración se segrega en forma de cristalizado de color blanco a ocre.

5. 2.- Procedimiento, según la reivindicación 1, caracterizado por emplearse para la distribución un sistema disolvente ternario de metanol (95), agua (5) y éter de petróleo de 40-60° (100).
10. 3.- Procedimiento, según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por emplearse una batería de distribución constituida por varios (por ejemplo, 6) pares de emulsionadores y separadores y disponerse la conducción de manera que la fase superior separada en un separador llegue, contra la corriente de la fase inferior, a la etapa de emulsión precedente en cada caso y a la fase inferior circulante se alimente continuamente la solución de sustancia al 2 %, cuidando de mantener en 1 : 1 la relación volumétrica total circulante de fase superior/fase inferior.
15. 4.- Procedimiento, según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por tratarse la fase inferior que sale del sistema con 0,5 % aproximadamente de carbón activo; concentrarse en vacío de 20 mm de Hg primeramente sólo hasta un tercio del volumen inicial; clarificarse en una prensa de filtro la solución todavía caliente; y concentrarse en una proporción de una sexta parte hasta una décima parte del volumen
20. 5.- Procedimiento para la obtención de polihidroxifenilcromonas estabilizantes de la estructura celular y el cito-
25. inicial, en cuya gama de concentración se segrega un cristalizado de color blanco a ocre, la silimarina I, que es separada.



metabolismo.

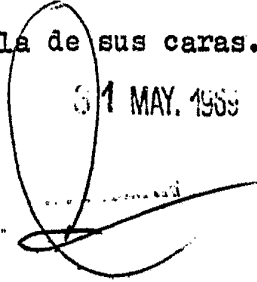
Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de catorce hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

5.

Madrid, a

31 MAY. 1968

p. a.


Firmado: JOSE RODRIGUEZ