



ESPAÑA

19 ES	21	NUMERO	10 A 1
	21	436.513	
	22	FECHA DE PRESENTACION	
		10.4.75	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
460.258	11.4.74	Estados Unidos
489.688	18.7.74	" "
547.415	6.2.75	" "

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	AGIK	

64 TITULO DE LA INVENCION
UN METODO PARA PURIFICAR EXTRACTOS QUE CONTIENEN PRODUCTOS UTERO-EVACUANTES OBTENIDOS A PARTIR DE LA PLANTA ZOAPATLE.

71 SOLICITANTE (S)
ORTHO PHARMACEUTICAL CORPORATION

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
RARITAN, New Jersey, Estados Unidos.

72 INVENTOR (ES)
Jose Luis Mateos, Luis Noriega, mejicanos Richard Huetteman, Ramesh Kanojia, Michael Wachter, estadounidenses los cuales han cedido sus derechos a la Cía. solicitante.

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE
D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

1

Esta invención se refiere a un método para extraer una substancia biológicamente activa de productos de plantas, y a un método para aislar, separar y purificar extractos de la planta zoapatle que conduce a compuestos puros.

5

10

La planta zoapatle es un arbusto de unos 2 m de alto que se desarrolla silvestre en Méjico. Botánicamente se conoce como Montanoa tomentosa de acuerdo con Cervantes, Fam. Compositae, Raza Heliantheae; otra variedad de la especie es Montanoa floribunda. La planta se describe con gran detalle en Las Plantas Medicinales de México, tercera edición Ediciones Botas (1944).

15

20

La planta se ha utilizado durante siglos en forma de un "te" u otras preparaciones acuosas impuras básicamente como un inductor del parto o inductor de menstruación para las personas. Su utilización ha sido documentada en la bibliografía pero no se han llevado a cabo estudios químicos y farmacológicos definitivos. Que se haya hecho tan poco empleo de una substancia real es contradictorio en sus conclusiones.

25

30

En el uso popular común de la planta Zoapatle la consumidora de modo típico bebe un "te" de sabor amargo elaborado a partir de las hojas de la planta hirviéndolas con agua del mismo modo que el utilizado para preparar un brebaje caliente. Ella normalmente hace esto después de haber pasado sin un periodo menstrual y de este modo probablemente estar embarazada, aunque es sabido que muchas mujeres francamente embarazadas utilizan el te para poner fin a un embarazo no deseado. El "te" evidentemente contiene una mez-

1 cla de productos complejos, muchos de los cuales pueden ser
indeseables e innecesarios para producir el efecto deseado.
Las sustancias de plantas naturales se sabe que generalmen-
te son excesivamente complejas en su composición. Muchos
5 compuestos de propiedades físicas y químicas similares, asi
como los de propiedades notablemente distintas, se encuen-
tran normalmente en estas sustancias y generalmente presen-
tan un trabajo de separación e identificación difícil. An-
tes de la presente invención, no se ha descrito un método
10 para separar las sustancias activas de la planta zoapatle.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar
un método para separar sustancias útero-evacuantes puras
a partir de extractos impuros de la planta zoapatle.

15 Otro objeto de la invención es proporcionar compues-
tos esencialmente puros aislados a partir de extractos im-
puros de la planta zoapatle que son útiles como agentes
útero-evacuantes.

METODO A

20 En el método A) de la presente invención, se utiliza
la extracción acuosa, pero siempre es precedida o seguida
de una extracción orgánica. Por ejemplo, métodos adecuados
suponen el tratamiento de una parte de la planta, preferen-
temente las hojas, que contienen las sustancias útero-eva-
cuantes como sigue:

25 (a) extracción acuosa de las hojas de la planta se-
guida por extracción con un disolvente orgánico
de la capa acuosa.

30 (b) extracción con un disolvente orgánico de las ho-
jas de la planta seguida por extracción acuosa
de la capa orgánica.

1 Por útero-evacuante se quiere decir un agente que ha-
ce que el útero de animales de sangre caliente se contrai-
ga o expulse su contenido. Tales agentes se emplean general-
mente para inducir la menstruación, para expulsar una mola
5 hidatiforme, para expulsar o reabsorber un feto, para pro-
vocar el aborto o demorar el parto y en situaciones en las
que el contenido del útero, tal como el feto o la placenta,
se debe evacuar.

 El método preferido de la invención A), se represen-
10 ta por (a) anteriormente. De modo característico los disol-
ventes preferidos en este procedimiento son los ésteres de
cadena corta alifáticos no miscibles con el agua tales como
el acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de butilo
y otros ésteres de cadena mas larga, hidrocarburos alifáti-
15 cos tales como pentano, hexano y heptano e hidrocarburos
clorados tales como cloroformo, tetracloruro de carbono,
cloruro de metileno e hidrocarburos aromáticos tales como
benceno, tolueno, xileno y similares; alcoholes alifáticos
superiores no miscibles con el agua tales como butanol y
20 pentanol. Si bien la extracción acuosa es una parte impor-
tante de este procedimiento, se debe indicar que los disol-
ventes miscibles con el agua se pueden emplear con buenos
resultados mezclados con agua durante la fase de extracción
acuosa. De este modo, se puede emplear metanol o etanol a-
25 cuoso de modo adecuado en la fase de extracción acuosa de
este procedimiento seguida o precedida de la extracción or-
gánica. Además, se pueden utilizar pasos y técnicas inter-
medias para un buen beneficio como será evidente de una des-
cripción detallada de la presente invención mas adelante.

30 Una cantidad adecuada, del orden de 3,5 Kg, de hojas

1 de zoapatle, secas o frescas, se elige y lava con agua fría; opcionalmente, las hojas se pueden partir en pequeñas tri-
zas y luego extraer con agua, preferiblemente caliente, o
5 con un disolvente orgánico, como se indicó de modo general anteriormente. La etapa de extracción con agua se hace convenientemente a temperaturas de 25°C a 100°C y preferiblemente a ebullición durante 10 minutos o mas. Tiempos de extracción prolongados superiores a 2 horas normalmente no
10 son necesarios y son antieconómicos. A continuación la capa acuosa así obtenida se separa del residuo de la planta obteniendo una disolución de color oscuro.

Esta disolución es luego utilizable para la etapa de extracción con disolvente orgánico descrita de modo general anteriormente. En la práctica es preferible utilizar un vo-
15 lumen igual del disolvente orgánico adecuado en la extracción de la fase acuosa. Este aspecto de la invención se lleva a cabo convenientemente a temperaturas que oscilan desde muy poco por encima de la temperatura ambiente hasta el punto de ebullición del disolvente particular. Se prefiere extraer a la temperatura del punto de ebullición del disol-
20 vente.

La extracción orgánica se prolonga hasta que se obtiene la cantidad deseada de producto normalmente del orden de 1-2 horas. Se mezclan los extractos orgánicos, se evapora a sequedad preferiblemente a presión reducida, y a temperaturas preferiblemente en el intervalo de 30-80°C.
25

Como se indicó anteriormente, la etapa de extracción acuosa puede ser precedida de la etapa de extracción con un disolvente orgánico. En tal caso, las condiciones descritas anteriormente con respecto a cada etapa, se aplican i-
30

1 igualmente a la extracción de hojas o a la extracción del
extracto de hojas. Por otra parte, el producto que resulta
del procedimiento de extracción doble se puede tratar ulte-
riormente con disolventes adecuados para mejorar la calidad
5 del producto. Este aspecto se expone en los ejemplos, espe-
cialmente en el Ejemplo I.

Como resultado del procedimiento anterior, se obtiene
un extracto útero-evacuante muy reducido en la cantidad de
impurezas en comparación con el material de partida.

10 La presencia de productos útero-evacuantes en el ex-
tracto impuro se determina mediante el uso de procedimien-
tos empleados para la detección de contracciones uterinas
e interrupción del embarazo en animales hembra. En los ex-
tractos llevados a cabo sobre los extratos impuros, las
15 contracciones uterinas se detectan cuando se emplean apro-
ximadamente 150-500 mg/Kg de extracto. La interrupción del
embarazo en conejillos de Indias se observa cuando el es-
tracto impuro se administra en dosis que oscilan entre
300-500 mg/Kg.

20 METODO B

El producto obtenido por el procedimiento de extrac-
ción inicial A) aunque conteniendo el principio activo y
poseyendo actividad biológica útil, todavía contiene algu-
nos materiales indeseables que no son necesarios para pro-
ducir el efecto deseado. Este producto puede ser purificado
25 posteriormente por el método descrito mas abajo.

Se emplea como materia prima producto semi-purificado
adecuado, tal como, por ejemplo, el obtenido a partir del
extracto acuoso/disolvente orgánico del método A). En un mé-
30 todo de purificación el material a purificar se disuelve

1 primero en un disolvente orgánico; la disolución resultante se filtra y se lava con una disolución acuosa de una base débil, tal como, por ejemplo,

5 bicarbonato sódico, carbonato sódico, acetato sódico y similares para extraer las impurezas solubles en agua y ácidas. Es preferible utilizar una disolución saturada de la base. Los disolventes orgánicos adecuados son éteres alifáticos inferiores tales como éter dietílico y éter dibutílico, ésteres alifáticos inferiores tales como acetato de metilo,

10 acetato de etilo, acetato de butilo y otros ésteres de cadena larga, hidrocarburos alifáticos tales como pentano, hexano y heptano, hidrocarburos clorados tales como cloroformo, tetracloruro de carbono y cloruro de metileno, e hidrocarburos aromáticos tales como benceno y tolueno, y similares.

15 La disolución se puede concentrar y utilizar en la etapa siguiente, o el disolvente orgánico se puede eliminar por técnicas conocidas a los expertos en la materia y el residuo se pasa a través de una columna de material adsorbente en un disolvente orgánico. Los disolventes orgánicos adecuados son benceno y tolueno, y similares. Los materiales adsorbentes que se pueden utilizar son los materiales copolímeros polímeros tales como el copolímero de acetato de vinilo, varios tipos de gel de sílice, y alúmina. El adsorbente preferido es el copolímero de acetato de vinilo. Generalmente se recogen varias fracciones y el material biológicamente activo se observa por cromatografía en capa fina. Sin embargo, cuando se desea material mas puro, las fracciones que contienen el principio activo se mezclan y cromatografían sobre un material adsorbente tal como gel de sílice, florisil o alúmina. La columna se eluye con un di-

20

25

30

1 solvente orgánico o con una mezcla de disolventes. Los di-
solventes adecuados son hidrocarburos aromáticos tales como
benceno, tolueno, xileno y similares, y ésteres alifáticos
inferiores tales como acetato de metilo, acetato de etilo,
5 acetato de butilo y similares, o mezclas de estos disolven-
tes. Se recogen varias fracciones y el principio activo
se observa de nuevo por cromatografía en capa fina. Se mez-
clan las fracciones que contienen el producto deseado y se
separa el disolvente para obtener un producto útero-eve-
10 cuante.

Así mismo, el extracto semi-puro obtenido mediante
los procedimientos de purificación iniciales se puede puri-
ficar posteriormente mediante cromatografía sobre materia-
les adsorbentes tales como, por ejemplo, ácido silícico,
15 gel de sílice o florisil utilizando una mezcla de disolven-
tes polares y no polares como eluyente. El adsorbente pre-
ferible es el ácido silícico. Se puede emplear ácido silí-
cico neutro o ácido, pero es preferible emplear ácido silí-
cico neutro. El material que se cromatografía preferible-
20 mente se disuelve primero en un disolvente adecuado, el di-
solvente preferido es cloroformo, se añade a una columna
del material adsorbente relleno en un disolvente adecuado
y la columna se eluye con una mezcla de un disolvente polar
y no polar. Los disolventes polares que se pueden utilizar
25 son alcoholes alquílicos inferiores tales como etanol, me-
tanol, propanol, isopropanol, butanol y similares, ésteres
alquílicos inferiores tales como acetato de etilo, acetato
de butilo y similares, cetonas alifáticas, tales como aceto-
na, metil etil cetona, metil isobutil cetona y similares.
30 Disolventes no polares son hidrocarburos clorados tales co-

1 mo cloroformo, disolventes hidrocarburos tales como pentano,
hexano, heptano y similares e hidrocarburos aromáticos ta-
les como benceno, tolueno y similares. La mezcla de disol-
ventes preferible es isopropanol-cloroformo. Las fracciones
5 recogidas se evaporan a sequedad a temperaturas que oscilan
entre la temperatura ambiente y aproximadamente 40°C. La
composición de las fracciones recogidas se controla median-
te cromatografía en capa fina o cromatografía gaseosa. Asi-
mismo, la disolución del extracto impuro se puede cromato-
10 grafiar directamente sin separación del disolvente. La di-
solución se puede concentrar antes de la etapa cromatográ-
fica para facilitar la manipulación.

En otro procedimiento posible, la materia prima semi-
pura se puede purificar utilizando cromatografía líquida
15 de alta presión. La materia prima se disuelve primero en
un disolvente orgánico adecuado y la disolución resultante
se lava con un álcali débil. Se elimina el disolvente por
técnicas conocidas a los expertos en la materia y el resi-
duo se mezcla con una pequeña cantidad de material de relleno
20 no utilizado en cromatografía líquida. Se pueden emplear
como adsorbente rellenos tales como los distintos tipos de
gel de sílice, alúmina y cutícula de poliamida. Como relleno
es preferible utilizar gel de sílice. La mezcla de resi-
duo y adsorbente se coloca en una columna preparativa que
25 contiene relleno adicional y la columna se eluye con un di-
solvente no polar o con una mezcla de disolventes no pola-
res tales como dioxano, heptano, hexano, pentano y simila-
res. Las fracciones recogidas se controlan mediante cromato-
grafía gaseosa y/o cromatografía en capa fina. A continua-
30 ción se mezclan las fracciones que contienen el principio

1 activo y se separa el disolvente. En la realización de la
cromatografía líquida de alta presión en general se puede
emplear una presión desde aproximadamente 21 a 35 atmósfe-
ras. El intervalo preferible es desde 24,6 a 31,6 atmósfe-
5 ras a la temperatura ambiente.

Como consecuencia de los procedimientos de purifica-
ción anteriores se obtienen productos útero-evacuantes que
contienen por lo menos tres componentes mayoritarios en la
mezcla como se demuestra mediante cromatografía gaseosa. La
10 presencia de productos útero-evacuantes en la mezcla se de-
termina a través de la utilización de procedimientos emplea-
dos para la detección de contracciones uterinas e interrup-
ción del embarazo en animales hembra. La interrupción del
embarazo en conejillos de Indias se observa cuando la mez-
15 cla se administra en dosis que oscilan desde aproximadamen-
te 75-100 mg/Kg. Las contracciones uterinas se observan
cuando se emplean aproximadamente 2,5-5,0 mg/Kg de la mez-
cla.

METODO C

20 Los productos útero-evacuantes purificados se pueden
separar de los extractos anteriores mediante etapas de pu-
rificación adicionales como se describe a continuación.

El extracto inicial a partir del cual se obtienen los
productos útero-evacuantes purificados se obtienen a partir
25 de la planta zoapatle a través de una serie de etapas de
extracción y purificación. En un método las hojas se sus-
penden primero en agua y la mezcla se calienta a aproxima-
damente 98-100°C durante varias horas. Se filtra la mezcla
caliente y el residuo sólido se lava con agua caliente. Se
30 filtra la mezcla por segunda vez y se mezclan los filtra-

1 dos. Los extractos acuosos mezclados se extraen varias ve-
ces con un disolvente orgánico. Después de la separación
de las capas acuosa y no acuosa, se elimina el disolvente
orgánico mediante técnicas conocidas por los expertos en
5 la materia. Los disolventes adecuados para la extracción
orgánica son ésteres alifáticos no miscibles con el agua
tales como acetato de etilo y acetato de butilo, hidrocar-
buros alifáticos tales como pentano, hexano y heptano, hi-
drocarburos clorados tales como cloroformo, tetracloruro
10 de carbono y cloruro de metileno, hidrocarburos aromáticos
tales como benceno y tolueno, y alcoholes alifáticos no
miscibles con el agua tales como butanol, pentanol, hexanol
y similares. El disolvente preferible es el acetato de eti-
lo. El residuo obtenido después de la eliminación del di-
15 solvente orgánico se extrae a continuación varias veces con
un disolvente orgánico caliente tal como benceno o tolueno.
El disolvente se elimina de nuevo y el residuo se lava va-
rias veces con un disolvente orgánico caliente, preferible-
mente hexano a reflujo. Como etapa de purificación adicio-
20 nal, el residuo así obtenido se disuelve en un disolvente
adecuado tal como acetona, por ejemplo, y se agita con un
adsorbente tal como carbón vegetal. El residuo así obteni-
do después de filtración y eliminación del disolvente se
utiliza como materia prima a partir de la cual se obtienen
25 los productos útero-evacuantes purificados, que son objeto
de esta invención.

Los compuestos útero-evacuantes purificados de esta
invención se obtienen primero disolviendo el extracto impu-
ro obtenido mediante el procedimiento A en un disolvente
30 orgánico no miscible con el agua, filtrando la disolución

1 resultante y lavando el filtrado con una disolución acuosa
de una base débil, tal como, por ejemplo, bicarbonato sódico,
bicarbonato potásico, carbonato sódico o carbonato po-
tásico, y similares para eliminar las impurezas solubles
5 en agua y ácidas. Es preferible utilizar una disolución sa-
turada de la base. Disolventes orgánicos adecuados son los
éteres alifáticos inferiores tales como el éter dietílico,
éter di-n-propílico, éter diisopropílico, éter metil n-bu-
tílico, éter etil n-butílico y éter dibutílico, ésteres a-
10 lifáticos inferiores tales como acetato de metilo, acetato
de etilo, acetato de butilo, propionato de etilo, y otros
ésteres de cadena larga, tales como acetato de amilo, ace-
tato de hexilo y similares, hidrocarburos clorados tales
como cloroformo, tetracloruro de carbono y cloruro de meti-
15 leno, e hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolu-
eno, xileno y similares.

El disolvente orgánico se elimina mediante técnicas
conocidas por los expertos en la materia, preferiblemente
a vacío, y el extracto semi-puro así obtenido se purifica
20 posteriormente mediante cromatografía sobre un material ad-
sorbente, tal como, por ejemplo, ácido silícico, gel de sí-
lice o florisil, utilizando como eluyente una mezcla de di-
solventes polares y no polares. El adsorbente preferible es
el ácido silícico. Se puede utilizar ácido silícico neutro
o ácido, pero es preferible emplear ácido silícico neutro.
25 El material que se cromatografía preferiblemente se disuel-
ve primero en un disolvente adecuado, el disolvente preferi-
ble es el cloroformo, se añade a una columna de relleno del
material adsorbente en un disolvente adecuado y la columna
30 se eluye con una mezcla de un disolvente polar y no polar.

1 Los disolventes polares que se pueden utilizar son alcoho-
les alquílicos inferiores tales como etanol, metanol, pro-
panol, isopropanol, butanol y similares, ésteres alquílicos
inferiores tales como acetato de etilo, acetato de butilo
5 y similares, cetonas alifáticas tales como acetona, metil
etil cetona, metil isobutil cetona y similares. Los disol-
ventes no polares son hidrocarburos clorados tales como clo-
roformo, cloruro de metileno y tetracloruro de carbono, y
disolventes hidrocarburos alifáticos tales como pentano, he-
10 xano, heptano y similares e hidrocarburos aromáticos tales
como benceno, tolueno y similares. La mezcla de disolventes
preferible es isopropanol-cloroformo. Las fracciones reco-
gidas se evaporan a sequedad a temperaturas que oscilan des-
de la temperatura ambiente hasta aproximadamente 40°C. La
15 composición de las fracciones recogidas se controla median-
te cromatografía en capa fina o cromatografía gaseosa. Asi-
mismo, la disolución del extracto impuro se puede cromato-
grafiar directamente sin eliminación del disolvente. La di-
solución se puede concentrar antes de la etapa cromatográ-
fica para facilitar la manipulación.

20 Como resultado de este procedimiento de purificación
se obtiene un material útero-evacuante que contiene por lo
menos tres componentes mayoritarios en la mezcla como se
demuestra mediante cromatografía gaseosa. La presencia de
25 los productos útero-evacuantes en la mezcla se determina a
través de la utilización de procedimientos utilizados para
la detección de contracciones uterinas e interrupción del
embarazo en animales hembra. La interrupción del embarazo en
conejiillos de Indias se observa cuando se administra la mez-
30 cla en dosis que oscilan entre aproximadamente 75-100 mg/Kg.

1 Las contracciones uterinas se detectan cuando se emplean aproximadamente 2,5-5,0 mg/Kg de la mezcla.

5 Las fracciones que contienen los productos útero-evacuantes se mezclan y cromatografían a través de una columna de un gel polímero compuesto de materiales polímeros orgánicos que se inchan en disolventes orgánicos. Los materiales polímeros adecuados que se pueden utilizar son polímeros tales como el copolímero de acetato de vinilo, dextrano entrecruzado y geles de poliestireno. Los disolventes adecuados son benceno, tolueno, tetrahidrofurano, ciclohexano y similares. El material polímero preferible es el copolímero de acetato de vinilo. La columna se eluye con un disolvente orgánico, preferiblemente aquel en el que se disuelva el residuo. Se recogen generalmente una serie de fracciones
10 y la composición de las mismas se controla mediante cromatografía gaseosa o cromatografía en capa fina. Como resultado del procedimiento anterior, se obtienen por lo menos dos compuestos útero-evacuantes distintos como se evidencia mediante análisis por cromatografía gaseosa y espectral.
15

20 Las propiedades útero-evacuantes de los productos aislados se determinan midiendo el alcance de las contracciones uterinas y el grado al cual se interrumpe el embarazo en animales hembra. Si se desea, se pueden separar las impurezas minoritarias de los compuestos puros mediante ulterior cromatografía sobre adsorbentes, tales como, por ejemplo, ácido silícico o florisil. La columna se eluye con un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes, siendo la cloroformo-isopropanol la mezcla de disolventes preferida, y la composición de las fracciones recogidas se comprueba mediante
25 cromatografía en capa fina.
30

1 Los compuestos útero-evacuantes purificados son efica-
ces cuando se administran en dosis que oscilan desde 1,0 mg
hasta aproximadamente 100 mg/Kg. La dosis real utilizada
5 dependerá de la especie de animal al que se administra el
compuesto. Los compuestos se pueden administrar en formula-
ciones preparadas de acuerdo con prácticas farmacéuticamen-
te aceptables. Las formulaciones adecuadas son formas de do-
sificación en disoluciones, suspensiones y sólido.

10 Los ejemplos que siguen son ilustrativos de la incor-
poración específica de la presente invención.

METODO A

Ejemplo 1.- Extracción con disolventes orgánicos de hojas
seguida por la extracción acuosa de la capa or-
gánica

15 Se someten a reflujo en Cl_3CH durante una hora 2,0
Kg de hojas secas. Después de filtración, el extracto clo-
rofórmico se concentra a sequedad a presión reducida y tem-
peratura de 35-50°C y se producen 196 g de una masa semisó-
lida oscura. Este residuo se extrae con agua-etanol calien-
20 te (1:2). La fase acuosa etanólica se vuelve a extraer con
 Cl_3CH , la capa de Cl_3CH se separa y concentra a sequedad a
presión reducida produciendo un jarabe amarillo-pardo. Es-
te se disuelve en éter y la disolución se lava con una di-
solución acuosa saturada de bicarbonato sódico, hidróxido
25 sódico acuoso al 5 %, agua, y se seca sobre sulfato sódico
anhidro. La evaporación del éter deja el extracto impuro
en forma de un aceite amarillo (11,9 g).

Ejemplo 2.- Extracción con agua de hojas seguida de la ex-
tracción con disolvente orgánico de la capa a-
30 cuosa .

1 Se someten a reflujo con 4,0 l de agua durante una
hora 634 g de hojas secas. Se decanta el extracto y se ex-
trae con cloroformo. La capa clorofórmica se seca y se fil-
tra, y el disolvente se evapora a presión reducida, quedando
5 4,55 g de una masa semisólida. La capa acuosa se vuelve
a extraer con acetato de etilo. La capa orgánica se seca
sobre sulfato sódico anhidro, se filtra, y se concentra a
presión reducida para obtener 1,99 g. Ambos residuos a par-
tir de cloroformo y a partir de acetato de etilo se mezclan
10 para producir el extracto impuro.

Ejemplo 3.- Extracción con agua de hojas seguida por extrac-
ción con acetato de etilo de la capa acuosa

15 Se calientan a reflujo durante una hora 140 g de ho-
jas de zoapatle y 2,5 l de agua. El extracto acuoso se con-
centra a un volumen total de 250 ml, y se extrae cuatro ve-
ces con 750 ml de acetato de etilo. Los extractos se mez-
clan y secan sobre sulfato sódico anhidro. La filtración y
eliminación del disolvente a vacío proporciona 1,3 g de una
masa de color oscuro. Esta se extrae posteriormente con 100
20 ml de cloroformo, se filtra y concentra a vacío para produ-
cir el residuo impuro (0,840 g).

Ejemplo 4.- Extracción con hexano de hojas

25 966 g de hojas de zoapatle secas se calientan a reflu-
jo durante tres horas con hexano suficiente para cubrir to-
talmente las hojas. Después de filtrar y concentrar el lí-
quido resultante a sequedad como se describió anteriormente,
se obtienen 56,8 g de un extracto impuro verdoso oscuro.

Ejemplo 5.- Extracción con hexano seguida por extracción
con agua de la capa orgánica seguida por extrac-
ción con acetato de etilo de la capa acuosa

30

1 350 g de hojas de zoapatle secas se cubren con hexano
y la mezcla se calienta hasta ebullición durante 15 a 20
minutos con agitación. El extracto de hexano se decanta, se
5 filtra y se trata con un volumen igual de agua (aproximada-
mente 700 ml). Se separan las capas y la capa de hexano se
trata de nuevo con un volumen igual de agua con agitación.
Después de la separación de las capas, la capa de hexano
se trata de la misma manera una vez mas. Las capas acuosas
se mezclan todas y se extraen tres veces con un volumen i-
10 gual de acetato de etilo. Los extractos de acetato de etilo
se mezclan y evaporan a sequedad, produciendo 6,6 g del
extracto impuro en forma de un jarabe amarillo parduzco os-
curo.

15 Ejemplo 6.- Extracción con agua de hojas seguida por extrac-
ción con benceno de producto activo

20 Un Kg de hojas de zoapatle secas se calientan con 15
l de agua durante tres horas a reflujo (aproximadamente
92°C) a 585 mm de mercurio de presión. La capa acuosa se
decanta y se filtra a través de gasa. Después de esto se
trata con aproximadamente 700 g de carbón vegetal activado
hasta que se produce la floculación. A continuación se agi-
ta la mezcla durante dos horas, se filtra rápidamente a va-
cío, produciendo un filtrado transparente. El sólido filtra-
do se seca a vacío a temperatura ambiente durante tres días
25 y después de esto se suspende en tres litros de benceno. La
destilación del benceno produce la eliminación de aproxima-
damente 200 ml de agua, quedando una capa de benceno que
cuando se evapora a sequedad como se describió anteriormen-
te produce 3 g del extracto impuro en forma de un aceite.

1 Ejemplo 7.- Extracción con agua de hojas seguida por extrac-
ción con acetato de etilo de la capa acuosa

5 Dos Kg de hojas de zoapatle frescas se cubren con a-
gua (10 a 12 l de agua) y se hierve durante una hora. A con-
20 tinuación la mezcla se filtra a través de estopilla mien-
tras está caliente y se deja enfriar. A continuación la par-
te acuosa se extrae dos veces con dos volúmenes cada una
de acetato de etilo. A continuación el acetato de etilo se
lleva a sequedad a 50°C a vacío para producir 12 g de una
masa verde oscura. La masa oscura se trata con 500 ml de
benceno y la mezcla se calienta a ebullición durante apro-
ximadamente 15 minutos. Se decanta la capa de benceno y el
residuo se lava con benceno hasta que no se extrae mas pro-
ducto. Los extractos bencénicos se mezclan y reducen a se-
15 quedad a 50°C a vacío. Se produce una masa parduzca que a
continuación se extrae sucesivamente con porciones separa-
das de hexano de la misma manera que se describió anterior-
mente para el tratamiento con benceno hasta que el hexano
sea incoloro. El residuo resultante, aproximadamente 8 g,
20 tiene la consistencia de jarabe espeso. A continuación es-
te producto se disuelve en acetona (100 ml o menos) y se
añaden a esto 5 g de carbón vegetal activado (Darco). La
mezcla se agita a temperatura ambiente durante una hora has-
ta que flocula el carbón vegetal. Se filtra la mezcla y el
25 filtrado se evapora a sequedad a vacío y calor suave (30°C)
para producir 4 a 6 g del extracto impuro.

METODO B

Ejemplo 8

30 4,33 g del extracto impuro obtenido según el Ejemplo
7 se disuelven en 500 ml de éter y la disolución resultante

1 se filtra y lava con 50 ml de disolución saturada de bicar-
bonato sódico. El éter se seca sobre sulfato sódico anhidro,
se filtra y concentra a sequedad para producir 3,4 g de a-
ceite amarillo claro. A continuación el aceite amarillo se
5 disuelve en 50 ml de benceno y la disolución se pasa a una
columna de 2 m x 10 cm rellena con 2 Kg de OR-PVA Merck-O-
gel 2000[‡]. La columna se eluye con benceno y después de eva-
porar el disolvente se recogen las fracciones siguientes:

	<u>Fracción</u>	<u>Volumen (litros)</u>	<u>Residuo (gramos)</u>
10	1	5,1	0,320
	2	3,1	0,305
	3	5,3	1,1
	4	4,3	0,440

El producto procedente de la fracción Nº 3 (1,1 g)
15 se disuelve en 10 ml de benceno y la disolución se añade
a 60 g de una columna de gel de sílice seco de 1 m x 2 cm.
La columna se eluye con una mezcla de benceno y acetato
de etilo (4:1). Después de recoger 25 fracciones de 125 ml
cada una, se cambia el eluyente a una relación de 1:1 de
20 benceno a acetato de etilo. El producto deseado se encuen-
tra en las fracciones 28-31 según se comprueba mediante la
cromatografía en capa fina. Se elimina el disolvente de
la fracción 28 y se obtienen 0,046 g del producto semi-pu-
ro. 0,350 g de las fracciones 29-31 se disuelven en clo-
25 roformo; el residuo se aplica a cinco placas de cromato-
grafía en capa fina preparativa y las placas se desarro-
llan seis veces con benceno y tres veces con benceno-ace-
tato de etilo (4:1). Se separa la banda mayor y

30 [‡] Un copolímero de acetato de vinilo que se incha en disol-
ventes orgánicos, producido por E. M. Merck, Inc.

1 eluye con acetato de etilo. Se elimina el disolvente para
obtener un producto semi-puro.

Ejemplo 9

5 El extracto impuro obtenido según el Ejemplo 7 (4,5
g) se disuelve en 50 ml de éter y la disolución resultante
se filtra y lava con 50 ml de una disolución saturada de
bicarbonato sódico. A continuación la disolución eterea se
seca sobre sulfato sódico y se evapora a sequedad. El resi-
duo resultante (3,6 g) se disuelve en 25 ml de cloroformo
10 y se añade a una columna (40 mm de diámetro interior, 40,6
cm de altura) de 200 g de gel de sílice neutro relleno en
cloroformo. La columna se eluye con cloroformo, mezclas de
cloroformo-isopropanol, y se recogen fracciones de 25 ml.
Cinco de tales fracciones de 25 ml se mezclan para obtener
15 una fracción de 125 ml. Se recogen aproximadamente 75 de
tales fracciones de 125 ml y se evaporan a sequedad à vacío
a una temperatura por debajo de 40°C. La columna se eluye
como sigue:

Fracciones de 125 ml

20	1-18	Cl ₃ CH
	19-30	isopropanol:Cl ₃ CH (1:99)
	31-44	isopropanol:Cl ₃ CH (1:49)
	45-51	isopropanol:Cl ₃ CH (3:97)
	52-66	isopropanol:Cl ₃ CH (1:24)
25	67-75	isopropanol:Cl ₃ CH (1:19)

Las fracciones se controlan mediante cromatografía en
capa fina como en el Ejemplo 8 anterior. Sobre la base de
la cromatografía en capa fina, se mezclan las fracciones
Nos. 49-66 y se elimina el disolvente para obtener 0,725 g
30 de un residuo aceitoso.

1 El residuo se purifica ulteriormente aplicándolo sobre placas de cromatografía en capa fina preparativa de gel de sílice. Las placas se desarrollan con isopropanol-clorofor-
5 y se evapora para producir un residuo de 540 mg. Una porción de 400 mg de este producto se cromatografía de forma similar para producir 268 mg de un producto semi-puro en forma de un aceite.

Ejemplo 10

10 1 g del extracto impuro según el Ejemplo 7 se mezcla poco a poco con 5 ml de éter en un tubo de ensayo de 15 ml. La disolución resultante se mezcla con 2 ml de bicarbonato sódico durante un minuto, se centrifuga la mezcla y se separa el éter. La disolución de bicarbonato se lava con dos
15 porciones de éter adicionales de 2 ml. Se mezclan los extractos etereos y se elimina el disolvente por evaporación. El residuo seco se mezcla con una pequeña cantidad de Pellosil[®], y la mezcla se introduce en el extremo inicial de una columna preparativa (1,22 m x 9,5 mm) que contiene Pellosil[®].
20 La columna rellena se instala en el instrumento (cromatógrafo para líquidos du Pont 830) y la columna se eluye con una variación desde 2,5 % de dioxano en hexano a 7,5 % de dioxano en hexano a 28 atmósferas. La columna se eluye con dioxano al 2,5 % en hexano durante 30 minutos, dioxano al 5,0%
25 en hexano durante 30 minutos y dioxano al 7,5 % en hexano durante 30 minutos. Las fracciones recogidas (el producto deseado se detecta mediante medida cromófera en el U.V. a

[®] Relleno de gel de sílice utilizado para rellenos para cromatografía en fase líquida y fabricado por Reeve Angel & Co. Clifton, New Jersey.

1 la longitud de onda de 254 nm) se controla mediante cromato-
grafía gaseosa y cromatografía en capa fina. Después de re-
coger la fracción del 7,5 % durante 10 minutos, se recoge
5 la fracción de los siguientes 20 minutos y se evapora a se-
quedad bajo atmósfera de nitrógeno a 50°C para producir un
producto semi-puro.

METODO C

OBTENCION DEL MATERIAL DE PARTIDA

10 Diez Kg de hojas de zoapatle y 136 litros de agua se
transfieren a un tanque de acero inoxidable con camisa de
vapor de 454,6 litros. La mezcla se calienta a 98-100°C du-
rante 2,5 horas con agitación periódica. La mezcla caliente
se filtra a través de gasa para obtener una pócima oscura
15 transparente, de aproximadamente 114 litros de volumen. El
residuo sólido se lava en el tanque con 18 litros de agua
caliente, se filtra y el filtrado se mezcla con la pócima
obtenida anteriormente. Los extractos acuosos mezclados se
extraen con 136 litros de acetato de etilo. La mezcla se
20 agita vigorosamente y se deja sedimentar. La capa espumosa
superior se sifona para romper la emulsión y se separa tan-
to acetato de etilo como sea posible. Se añaden a la mezcla
otros 91 litros de acetato de etilo y se repite el procedi-
miento anterior. Los extractos de acetato de etilo mezcla-
dos se evaporan a 50°C a vacío. El residuo se extrae con
25 tres porciones de benceno caliente (75-80°C) (10 litros en
total). Los extractos bencénicos se evaporan a 50°C a vacío
y el residuo se lava tres veces con un total de 8 litros de
hexano a reflujo. El residuo lavado con hexano se disuelve
en 2 litros de acetona, se añaden 10 g de Nuchar, y la mez-
30 cla se agita durante 1 hora a la temperatura ambiente. Se

1 separa por filtración el carbón vegetal y el filtrado se
evapora por destilación a 30°C a vacío para obtener 69 g de
extracto impuro.

Ejemplo 11.

5 50 g de extracto impuro utilizado como materia prima
se disuelven en 5 l de éter y la disolución resultante se
filtra y lava con 500 ml de disolución saturada de bicarbo-
nato sódico. El éter se seca sobre sulfato sódico anhidro,
se filtra y se concentra a sequedad para producir 44,6 g de
10 un aceite amarillo pálido. A continuación este aceite se
disuelve en 400 ml de cloroformo y la disolución se pasa a
una columna (102 mm x 1,22 m) de 2,5 Kg de ácido silícico
neutro relleno en cloroformo. La columna se eluye con clo-
roformo, mezclas de cloroformo-isopropanol, y se recogen
15 110 fracciones. Las fracciones se evaporan a sequedad a va-
cío a una temperatura por debajo de 40°C. La columna se elu-
ye como sigue:

<u>Fracción</u>	<u>Volumen de la fracción (ml)</u>	<u>Eluyente</u>
20 1-7	650	Cl ₃ CH
8-30	500	isopropanol:Cl ₃ CH (1:41,7)
31-60	500	isopropanol:Cl ₃ CH (1:33,3)
61-105	500	isopropanol:Cl ₃ CH (1:28,6)
106-110	500	isopropanol:Cl ₃ CH (1:25)

25 La composición de las fracciones se controla mediante
cromatografía en capa fina (gel de sílice, isopropanol-clo-
roformo (1:12,5)) y mediante cromatografía gaseosa-- 3 % de
OV17 (metil silicona-fenil silicona (1:1)) en la columna
utilizando un programador (150-250°C). Las fracciones Nos.
78-84 se mezclan y el disolvente se elimina a vacío para
30 obtener 5,1 g de un residuo aceitoso que contiene por lo

1 menos tres componentes mayoritarios como se indica mediante cromatografía gaseosa.

5 A continuación una parte del residuo (3,2 g) se disuelve en 50 ml de benceno y la disolución se pasa a una columna (102 mm x 88,9 cm) rellena con 2 Kg de OR-PVA Merck-O-Gel 2000[≠] preparada en benceno. La columna se eluye con benceno y se recogen un total de 47 fracciones. Para controlar la composición de las fracciones se utiliza la cromatografía en capa fina y la cromatografía gaseosa.

10

<u>Fracción</u>	<u>Volumen de la fracción (ml)</u>
1-7	1000
8-45	300
46-47	1000

15 Las fracciones 23-33 contienen 1,73 g, el 54 % del producto aplicado.

A) Las fracciones 24-25 se evaporan para obtener 0,25 g de un compuesto en forma de aceite que tiene las siguientes características espectrales:

20 I.R. (neto) 2,90 μ , 5,96 μ , y 6,21 μ
RMN Cl_3CD 6,11, 5,48, 4,25, 4,13, 3,56, 2,11, 2,08,
TMS 1,48, 1,13 y 1,01 ppm.

B) La fracción 31 se evapora para obtener 0,326 g de un compuesto en forma de un aceite que tiene las siguientes características espectrales:

25 I.R. (neto) 2,91 μ y 5,88 μ
RMN Cl_3CD 5,41, 4,26, 4,15, 3,58, 3,18, 2,18, 1,76,
TMS 1,67, 1,15 y 1,04 ppm.

Para detectar las contracciones uterinas en animales

30 [≠] Un copolímero de acetato de vinilo que se incha en disolventes orgánicos, producido por E.M. Merck, Inc.

1 hembra se emplea el siguiente procedimiento general.

PROCEDIMIENTO I

5 Conejos de Nueva Zelanda hembras en edad madura se anestesian con pentobarbital sódico y se les fisura el ovario. A continuación de un periodo de recuperación de una semana, los conejos se tratan con 5 μ g/día s.c. de 17 β -estradiol durante 6 días consecutivos, seguido por el tratamiento con 1,0 mg/día s.c. de progesterona durante 7 días consecutivos. El útero y el oviducto de los conejos se rocian 10 72 horas después de la última dosis de progesterona según el método de Heilman, y otros, (Fertil. Steril. 23: 221-229) con ligeras modificaciones. El útero y el oviducto se rocian a una velocidad de 53 μ l/min. El útero se rocía con un tubo introducido 1,0 cm dentro del lumen del útero desde el extremo oviducal. El útero se liga en la unión útero-15 tubo. Otra cánula se introduce 1,0 cm dentro del útero a través de una pequeña incisión en la vagina con objeto de recoger el líquido del rociado. El producto que se ensaya se administra i.v. a través de la vena yugular en un excipiente que contiene polietilen glicol 200, polietilen glicol 20 400, etanol y tampón de fosfatos. La cánula se conecta a un conversor P23-Dc Stathan que a su vez se acopla a un polígrafo Grass Modelo 5 y se mide la contractilidad uterina.

25 La administración intravenosa del compuesto obtenido de la fracción 31 es eficaz en la inducción de contracciones uterinas y relajación del oviducto en conejos privados de progesterona 72 horas en una dosis que oscila de 1,0-4,0 mg/Kg. El compuesto obtenido a partir de las fracciones 30 24-25 es eficaz cuando se administra en dosis que oscilan

1 desde 25-40 mg/Kg.

Para detectar la interrupción del embarazo después que ha tenido lugar la implantación se emplea el procedimiento general siguiente.

5 PROCEDIMIENTO II

10 Conejillos de Indias hembras, de raza Hartley, adultos se hacen cohabitar continuamente (de forma monogama) con machos hasta que se encuentra en la jaula un tapón vaginal (tapón de copulación). Este momento se considera que es el día 1 de la gestación. Los productos objeto de ensayo se administran a grupos de 5-6 hembras intraperitonealmente en el excipiente descrito en el Procedimiento I en el día 22 de la gestación. Los conejillos se sacrifican entre el día 25 y 45 de la gestación y se examinan para prueba de reabsorción o aborto

15 La administración intraperitoneal del producto obtenido a partir de la fracción 31 es eficaz en la interrupción del embarazo cuando se administra en una dosis que oscila desde 25-85 mg/Kg.

20 En resumen la patente de invención, que se solicita deberá recaer sobre las siguientes:

REIVINDICACIONES

1.- Un metodo para purificar extractos que contienen productos útero-evacuantes obtenidos a partir de la planta zoapatle, que comprende las etapas de:

25 disolución del extracto en un disolvente orgánico no miscible con el agua, lavado de la disolución resultante con una disolución acuosa de una base débil y separación de la capa orgánica de la capa acuosa, cromatografiado de la disolución a través de una columna de material adsorbente, elución de la columna con una mezcla de un disolvente polar y uno no polar

30

1 mezcla de las fracciones que contienen los productos útero-
evacuantes y eliminación del disolvente de la misma, diso-
lución del residuo en un disolvente orgánico no miscible -
con el agua, cromatografiado de la disolución a través de
5 una columna de un gel polímero o orgánico, elución de la -
columna con un disolvente orgánico no polar y recogida de
las fracciones que contienen los productos útero-evacuantes.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la
planta zoapatle es Montanoa tomentosa o Montanoa floribunda

10 3. El método de la reivindicación 1, en el que el
disolvente orgánico no miscible con el agua se elige de un
hidrocarburo aromático, un hidrocarburo clorado o un éter
alifático.

15 4. El método de la reivindicación 3, en el que el
disolvente orgánico se elige de éter, cloroformo o benceno.

5. El método de la reivindicación 1, en el que el
material adsorbente se elige de ácido silícico, gel de sí-
lice y florisil.

20 6. El método de la reivindicación 1, en el que la
mezcla de disolventes polares y no polares consta de cloro-
formo e isopropanol.

7. El método de la reivindicación 1, en el que el
gel de polímero es un copolímero de acetato de vinilo.

25 8. El método de la reivindicación 1, en el que el
disolvente no polar es benceno.

9. El método de la reivindicación 1 en el que la
base débil es bicarbonato sódico.

30 10. Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la patente de invención que se solicita:

1 UN METODO PARA PURIFICAR EXTRACTOS QUE CONTIENEN PRODUCTOS
UTERO-EVACUANTES OBTENIDOS A PARTIR DE LA PLANTA ZEOPATLE.

5 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente memoria descriptiva que consta de veintiocho pági-
nas mecanografiadas.

Madrid, 10 abril de 1975
BERNARDO UNGRIA

P.P.


10

15

20

25

30