

MNL



ESPAÑA

~~ESTADO~~  
**CONCEDIDA**

10 ES	11 NUMERO	16 A1
21	<b>463260</b>	
22	FECHA DE PRESENTACION	
	14 OCTUBRE 1.977	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
43043	15 OCTUBRE 1.976	GRAN BRETAÑA

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C07G//A61K	

54 TITULO DE LA INVENCION

UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN EXTRACTO DE TEUCRIUM MARUN.

71 SOLICITANTE (S)

INSTITUT DE RECHERCHES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES APLIQUES (I.R.C.E.B.A.)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

28 rue de Téhéran- 75008 PARIS (Francia).

72 INVENTOR (ES)

Jacques Debat; Jean Lemoine; Bernard Guay y Mademoiselle Claude Crescioni, nacionalidad francesa.

73 TITULAR (ES)

INSTITUT DE RECHERCHES CHIMIQUES ET BILOGIQUES APLIQUES (I.R.C.E.B.A.)

74 REPRESENTANTE

D. BERNARDO UNGRIA GOIBURU

20 JUN. 1978

Concedido el ~~registro~~ de acuerdo con los ~~requisitos~~ en la presente descripción y según el contenido de la Memoria adjunta.



1 da por los gatos), ha sido descrita principalmente por  
G. Garnier y colaboradores en la obra "Ressources Médicina-  
les de la Flore Française", tomo II, ediciones Vigot, París  
(1961). Se sabe también que se ha propuesto en el pasado  
5 utilizar esta planta en terapéutica, en especial en forma  
de infusión (es decir, de extracto obtenido por tratamien-  
to de la planta con agua caliente, alrededor de 60°C).

La invención tiene por objeto la obtención de un ex-  
tracto de Teucrium marum que sea útil en terapéutica, prin-  
10 cipalmente como agente antiespasmódico y como agente ana-  
léptico respiratorio.

El procedimiento de extracción de la invención, según  
el cual se somete la planta entera (es decir los tallos,  
15 las hojas, las cimas floridas, los frutos y las raíces) o  
una parte de la planta a un tratamiento con un disolvente,  
se caracteriza porque dicho tratamiento se efectúa con un  
disolvente seleccionado entre el grupo formado por agua  
hirviendo y en presencia de NH<sub>3</sub>, pentano, hexano, heptano,  
20 ciclohexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ciclopentano, éter de petróleo y sus  
mezclas y porque, en caso necesario, se somete el extracto  
resultante a purificación.

De forma ventajosa se preconiza utilizar dicho tra-  
tamiento empleando, por cada litro de disolvente, una can-  
25 tidad de 30 a 150 g de planta molida y seca, siendo la  
cantidad preferida de 100 g de planta molida y seca por li

1       tro de disolvente.

5       Para poner en práctica este tratamiento, también  
se puede utilizar el cloroformo. Sin embargo, la experien-  
cia demuestra que este disolvente no es interesante desde  
el punto de vista industrial. En efecto, solubiliza sustan-  
cias contenidas en la planta que no presentan las propieda-  
des antiespasmódicas y analépticas respiratorias deseadas.  
Tampoco se ha proseguido la utilización del cloroformo por-  
que implica tratamientos secundarios onerosos para eliminar  
10       dicha sustancia.

15       El cloruro de metileno, que no presenta todos los  
inconvenientes, es utilizable en el procedimiento de la in-  
vención; sin embargo, como conduce a rendimientos inferio-  
res se prefiere utilizar más bien agua a ebullición y en  
presencia de  $\text{NH}_3$  (4 a 10 g de  $\text{NH}_3$  por litro de agua) o pen-  
tano, hexano, heptano, ciclohexano, ciclopentano, éter de  
petróleo o sus mezclas, siendo el hexano el mejor disolven-  
te desde el punto de vista industrial.

20       El tratamiento con un disolvente puede realizarse se-  
gún cuatro variantes, relativas las tres primeras a la uti-  
lización de agua a ebullición y en presencia de  $\text{NH}_3$  y la  
cuarta a la utilización de otro disolvente de la invención,  
a saber:

25       Variante A: tratamiento a reflujo y después filtración para  
recoger la solución acuosa resultante;

1 Variante B: arrastre de vapor y después condensación para recoger el condensado resultante;

Variante C: tratamiento a reflujo, filtración, arrastre de vapor de la solución acuosa resultante y después condensación y

5 Variante D: tratamiento con un disolvente orgánico y después concentración de la solución resultante.

10 Según la Variante A, el tratamiento con agua en presencia de  $\text{NH}_3$  se realiza a reflujo durante 2 horas aproximadamente y después es ventajoso dejar macerar el medio de reacción durante 24 horas aproximadamente a la temperatura ambiente (15-25°C).

15 Según la Variante B, el tratamiento se interrumpe cuando el condensado recogido tiene un volumen como máximo igual a 2500 ml; en la práctica, dicho tratamiento se interrumpe cuando se recoge un condensado de 500 a 2500 ml. La Variante C, que combina las Variantes A y B, da resultados equivalentes a los de la Variante B desde el punto de vista de la actividad terapéutica. En lo que sigue, el extracto obtenido según la Variante A es denominado extracto total acuoso de Teucrium marum.

20 Según la Variante D, la extracción se realiza mediante un sóxhlet; después de filtrar para separar la materia insoluble, se concentra el filtrado a sequedad a presión reducida.

25

1 La purificación del extracto obtenido por tratamiento  
con agua a ebullición y en presencia de  $\text{NH}_3$  o perfectamente  
con un disolvente orgánico como el definido más arriba, pue-  
de ser efectuada según un método conocido. La purificación  
5 preconizada en la invención comprende la fijación de dicho  
extracto sobre un soporte y después la elución mediante uno  
o varios agentes eluyentes.

Más exactamente, el método de purificación del extrac-  
to acuoso obtenido según la Variante A se caracteriza porque:

- 10 a) se somete la solución acuosa a absorción sobre resina,  
despreciándose la fracción no absorbida sobre la resina  
después de pasar sobre ésta;
- b) a continuación se lava la resina con agua destilada has-  
ta que el agua de lavado, que se desprecia, sea incolora;
- 15 c) la resina así lavada y sobre la que está fijado el pro-  
ducto a recoger, se somete a una elución con un alcohol  
o una mezcla de agua y alcohol hasta que el eluato, que  
se desprecia, sea incoloro;
- 20 d) la resina así tratada, sobre la que está fijado el pro-  
ducto a recoger, se somete a elución con un alcohol o una  
mezcla de agua y alcohol, en presencia de un agente alcal-  
lino, hasta que el eluato resultante sea incoloro;
- e) el eluato obtenido en la etapa d) se somete a evaporación  
a vacío y después, si es necesario,
- 25 f) el residuo de evaporación obtenido en la etapa e) se some-

1           te a un tratamiento con éter y la fase etérea se reco-  
ge y se concentra a vacío,

g) el concentrado así obtenido se somete a absorción sobre  
sílice;

5           h) la sílice así tratada se somete a elución con una mez-  
cla de hexano-éter (90:10 en volumen) y

i) el eluato así obtenido se concentra a sequedad a vacío  
para llegar a un producto seco (que se presenta en forma  
de un polvo).

10           La absorción de la etapa a) se realiza mediante una re-  
sina macromolecular, por ejemplo un poliestireno reticulado  
comercializado con el nombre de Amberlite XAD2.

15           Los alcoholes de las etapas c) y d) son alcoholes infe-  
riores tales como metanol, etanol y propanol; las mezclas  
de agua y alcohol contienen por lo menos un 90 % en volu-  
men de uno de los alcoholes inferiores mencionados. El elu-  
yente preferido en las etapas c) y d) está constituido por  
etanol o la mezcla de agua etanol 4:96 en volumen.

20           El agente alcalino de la etapa d) puede seleccionarse  
principalmente entre NaOH, KOH y NH<sub>3</sub>. Se observará en el  
Ejemplo 2 dado más adelante que el agente alcalino preferi-  
do es el NH<sub>3</sub> utilizado a una concentración de 30 g/l de  
eluyente.

25           La evaporación a vacío prevista en la etapa e) se rea-  
liza a 60°C. Esta evaporación se efectúa hasta la obtención

1 de un producto seco si no se quiere proseguir la purifica-  
ción. Por el contrario, si se desea proseguir la purifica-  
ción según las etapas f) a i), se puede efectuar indife-  
rentemente el tratamiento con éter de la etapa f) sobre di-  
5 cho producto seco o sobre un residuo de evaporación concen-  
trado a vacío.

En la etapa f), el éter utilizado puede ser el éter  
dimetílico o el éter dietílico. Se preconiza ventajosamente  
la utilización de éter dietílico desperoxidado.

10 Son posibles dos métodos de purificación de los ex-  
tractos obtenidos según las Variantes B y C, siendo el mé-  
todo preferido el segundo porque es más práctico.

El primer método de purificación del extracto obteni-  
do según una cualquiera de las Variantes B y C se caracte-  
15 riza por realizar sucesivamente las siguientes operaciones:

a<sub>1</sub>) se somete el condensado a absorción sobre resina tampo-  
nada a pH 9 aproximadamente, recogiendo la fracción  
no absorbida sobre la resina después de pasar por és-  
ta, que es útil en terapéutica;

20 b<sub>1</sub>) la resina así tratada se somete a elución mediante un  
agente alcalino, principalmente NaOH 1N o KOH 1N y se  
recoge un primer eluato útil en terapéutica y

c<sub>1</sub>) la resina se somete a elución mediante un alcohol infe-  
rior, principalmente etanol y se recoge un segundo elua-  
25 to útil en terapéutica.

1           La resina utilizada en la etapa a<sub>1</sub>) es preferiblemen-  
te una resina sólida, por ejemplo un poliestireno reticula-  
do comercializado con el nombre de Amberlite IRC-50. Esta  
resina es tamponada a pH 9 aproximadamente antes del paso  
5 del condensado; por ejemplo, puede ser tamponada principal-  
mente con un agente tampón como el borato sódico 0,02M, a  
pH 9,1.

10           El segundo método de purificación del extracto obteni-  
do según una cualquiera de las Variantes B y C se caracteri-  
za por someter el condensado (que ha sido obtenido por arras-  
tre de vapor) a una rectificación a 98°C (bajo 1 atmósfera);  
la fracción rectificada se recoge y a continuación se trata  
según las modalidades de las etapas f) a i) descritas ante-  
riormente. El producto final obtenido según este método es  
15 idéntico al obtenido en la etapa i) de la purificación del  
extracto de la Variante A.

20           El método de purificación del extracto obtenido según  
la Variante D se caracteriza porque sucesivamente se redi-  
suelve el producto seco (que se ha obtenido por evaporación  
a vacío del disolvente de tratamiento) en hexano, se filtra  
para separar la materia insoluble, se somete el filtrado así  
obtenido a absorción sobre sílice, se eluye mediante una mez-  
cla de hexano-éter (90:10 en volumen) y se evapora a seque-  
dad a vacío el eluato así obtenido.

25           En este último método de absorción sobre sílice, la elu-

1 ción y la evaporación a sequedad del eluato se realizan según las modalidades de las etapas g) a i). Igualmente el producto final es idéntico al obtenido en la etapa i) de la purificación del extracto de la Variante A.

5 El procedimiento de extracción y de purificación de esta invención ha sido resumido en el diagrama I dado más adelante.

10 Otras ventajas y características de la invención serán comprendidas mejor mediante la lectura de los ejemplos de preparación en modo alguno limitativos sino dados a título ilustrativo.

#### EJEMPLO 1

##### Preparación del extracto total acuoso

15 La planta entera de Teucrium marum, secada en estufa a 37°C y molida, se somete a extracción mediante agua desliada en las condiciones siguientes:

20 A 300 g de planta se agregan 3 litros de agua destilada y después se lleva a ebullición; antes de que comience la ebullición, se agregan 10 ml de  $\text{NH}_4\text{OH}$  al 20 % de  $\text{NH}_3$ . A continuación se realiza la ebullición a reflujo durante 2 horas. Después se deja macerar a la temperatura ambiente durante 20 horas. A continuación se filtra el extracto sobre filtro plegado con el fin de recuperar la solución acuosa.

25 La solución acuosa así obtenida constituye el extracto total acuoso de Teucrium marum que ha sido codificado

1 como "C-63" en los ensayos farmacológicos dados más adelante.

EJEMPLO 2

Purificación del extracto total acuoso

5 La solución acuosa obtenida en el Ejemplo 1 se somete a cromatografía de absorción sobre resina. La resina utilizada es un polímero insoluble, aquí un poliestireno reticulado (Amberlite XAD-2); esta resina rellena una columna de 5 cm de diámetro interno y 60 cm de altura, siendo el  
10 peso húmedo de resina utilizada 1200 g y pasando la solución acuosa sobre la resina a la velocidad de 10 ml/minuto.

Se elimina la fracción (A-I) que no ha sido absorbida después de pasar por la resina. Después se lava la resina con agua destilada hasta que el agua de lavado recogida en  
15 la parte inferior de la columna es incolora. Este agua de lavado se desprecia.

A continuación se realiza la elución:

1) mediante la mezcla de etanol-agua (96:4) hasta que el eluato sea incoloro; se obtiene así una segunda fracción  
20 (denominada fracción A-II) que se desprecia y

2) mediante la mezcla volúmica etanol-agua (96:4) que contiene 30 g/ml de  $\text{NH}_3$  hasta que el eluato sea incoloro; se recoge así una tercera fracción (denominada fracción A-III) que se lleva a sequedad por evaporación a vacío reducido, mediante un evaporador rotatorio a 60°C.  
25

1 El rendimiento de producto final es del 6 % en peso con respecto al peso de planta seca de partida.

5 El producto obtenido por evaporación de la fracción A-III a vacío, según las modalidades del ejemplo anterior, ha sido denominado "C-6302" y sometido a ensayos analíticos y farmacológicos.

Caracteres analíticos

10 La cromatografía en capa fina de sílice utilizando como fase móvil la mezcla volúmica de cloroformo-etanol-dietilamina (95:4:1) de la fracción III, por una parte, y del producto C-6302 redissuelto en la mezcla etanol-agua (96:4), por otra parte, da las tres mismas manchas, a saber:

- una mancha n° 1,  $R_f = 0,71$ , revelada bajo lámpara U.V. a 254 nm,

15 - una mancha n° 2,  $R_f = 0,80$ , revelada en azul malva por pulverización de la siguiente mezcla:

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 ml
Vainillina	300 mg
Etanol	10 ml

20 y calefacción en estufa a 110°C y

- una mancha n° 3,  $R_f = 0,87$ , revelada en azul grisáceo por el reactivo anterior.

EJEMPLO 3

Arrastre de vapor

25 Se suspenden 150 g de planta entera de Teucrium marum,

1        secada en estufa a 37°C y molida, en 4 litros de agua desti-  
lada y se lleva a ebullición. Se procede a un arrastre de  
vapor. Los vapores se condensan por refrigeración y se reco-  
gen hasta un volumen de 2500 ml.

5        El extracto así obtenido ha sido designado en lo que  
sigue con el número de clave "C-63-E".

#### EJEMPLO 4

#### Purificación del extracto obtenido por arrastre de vapor

10       El producto obtenido en el Ejemplo 3 se somete a cromatografía de absorción. La resina utilizada es un polímero insoluble constituido por un poliestireno reticulado y comercializado con el nombre de Amberlite IRC-50. Una columna de 25 mm de diámetro se rellena con Amberlite IRC-50 hasta una altura de 30 cm y se provee en su salida de un dispositivo de registro conectado a una célula U.V. (con objeto de conocer la absorción del eluato de la columna, principalmente a una longitud de onda fija a 270 nm).

15       A continuación la resina se tampona con borato sódico 0,02M a pH 9,1 hasta que el eluato de la columna tenga un pH equivalente. Entonces el extracto C-63-E se absorbe en la resina a la velocidad de 3 ml/minuto.

20       Se recoge una primera fracción (denominada "B-I" y clasificada como "C-63-E1"), que no es absorbida después de pasar sobre la resina, conteniendo esta fracción un constituyente odorífero.

25

1 Una vez recogida esta primera fracción, se realiza una elución mediante 140 ml de NaOH 1N. Se recoge una segunda fracción (denominada "B-II" y clasificada: "C-63-E2").

5 A continuación se realiza una nueva elución mediante etanol anhidro y se recoge una tercera fracción de elución (denominada "B-III" y clasificada: "C-63-E3").

10 Nota: Aunque los ensayos dados a continuación hayan sido realizados con las fracciones B-I, B-II y B-III así obtenidas y eventualmente diluidas con agua, si es necesario es posible concentrarlas a presión reducida antes de utilizarlas.

#### Análisis espectroscópico

15 El análisis espectroscópico se realizó en un aparato Perkin-Elmer. El extracto "C-63-E" presenta en su espectro U.V. picos de absorción a 200 nm, 225 nm, 262 nm, 268 nm y 280 nm. Los extractos "C-63-E1" y "C-63-E2" presentan picos de absorción a 200 nm, 225 nm y 280 nm. El extracto "C-63-E3" presenta picos de absorción a 200 nm, 262 nm y 268 nm.

#### Análisis cromatográfico

20 La cromatografía en capa fina de sílice, utilizando como fase móvil la mezcla volúmica de cloroformo-metanol-agua (40:45:15), de los extractos "C-63-E" y "C-63-E3" da las dos mismas manchas, a saber:

- 25
- una primera mancha de  $R_f = 0,65$  y
  - una segunda mancha de  $R_f = 0,75$ ;

1 ambas manchas son reveladas:

- en naranja por el reactivo de Draggendorf y calefacción en estufa a 110°C;

5 - en malva por el reactivo de Marquis y calefacción en estufa a 110°C durante 10 minutos y

- en amarillo sobre fondo violeta por el reactivo de yodoplatinato.

#### EJEMPLO 5

10 Se procede como se ha indicado en el Ejemplo 3 con la diferencia de que sólo se recogen los 500 primeros mililitros de condensado. Se obtiene un extracto que es idéntico al extracto "C-63-E" desde el punto de vista espectroscópico y cromatográfico, que presenta la ventaja de ser más concentrado que el extracto "C-63-E" del Ejemplo 3 y que, como consecuencia, es más interesante en el sentido de que  
15 puede evitarse una operación de concentración.

Los ejemplos que siguen tratan de la obtención del extracto de Teucrium marum preferido desde el punto de vista terapéutico. El Ejemplo 6 describe el mejor modo de preparación de dicho extracto.  
20

#### EJEMPLO 6

a) Preparación según el método D

25 Se extrae en el soxhlet 400 g de planta molida y secada con 4 litros de hexano. Se desprecia la materia insoluble y la solución hexánica se evapora a sequedad a presión

1 reducida para obtener un extracto seco.

b) Purificación

5 El extracto seco se recogé en hexano. La cantidad de hexano a utilizar para este fin es de 1 volumen por cada 10 volúmenes de disolvente del tratamiento precedente, es decir, en el caso presente, 400 ml de hexano. Se filtra para separar la materia insoluble y el filtrado se vierte en una columna de absorción rellena de sílice. Se procede a una elución con la mezcla de éter dietílico-hexano 90:10 en volumen. A continuación se concentra el eluato a presión reducida y, por evaporación a sequedad, se obtiene un extracto final pulverulento (2,3 g) designado en lo que sigue con el número de clave "C-63-JA" cuyas características analíticas son las siguientes:

15 Cromatografía en capa fina

El C-63-JA da una mancha revelada en azul malva, de Rf 0,45, en las condiciones operatorias siguientes:

20 Soporte : sílice  
Fase móvil : cloroformo  
Revelado : ácido sulfúrico-vainillina (1 g de vainillina por 100 ml de ácido sulfúrico concentrado de densidad 1,84)

Cromatografía gas-líquido

25 En las condiciones operatorias siguientes:



1 activa del Teucrium marum, se combinan y se extraen con  
éter dietílico desperoxidado (a razón de 3 volúmenes de  
éter por volumen de destilado). Se recoge la fase etérea y  
se concentra a vacío a una temperatura inferior o igual a  
5 30°C (evaporando a sequedad, se obtiene el extracto clasi-  
ficado C-63-F1). Como se ha indicado en el Ejemplo 6, el  
concentrado resultante se absorbe en una columna de sílice  
y se eluye para obtener por evaporación a sequedad a vacío  
del eluato una sustancia pulverulenta terapéuticamente acti-  
10 va, que después de analizada, resulta ser idéntica al extracto  
C-63-JA.

#### EJEMPLO 8

##### Purificación del extracto total acuoso

15 Se recoge en éter el extracto C-6302 obtenido en el  
Ejemplo 2. El éter utilizado es el éter dietílico previamen-  
te desperoxidado. Se obtiene una fase etérea que se concentra  
a vacío a una temperatura inferior o igual a 30°C. El con-  
centrado resultante se vierte en una columna de sílice, a  
continuaón se eluye y el eluato se evapora a sequedad ba-  
20 jo presión reducida para obtener una sustancia pulverulenta  
terapéuticamente activa que, una vez analizada, resulta ser  
idéntica al extracto C-63-JA.

25 Procediendo como se ha indicado en el Ejemplo 8 pero  
utilizando la fracción A-III obtenida en el Ejemplo 2, y  
conservando solamente la fase etérea, se obtiene el extracto

1 C-63-JA.

Ensayos farmacológicos

Toxicidad

5 La toxicidad se ha determinado en ratones machos de 20 g repartidos en lotes de 20 animales, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal y por vía oral. Los resultados correspondientes están consignados en la Tabla I. En esta tabla, las dosis utilizadas se expresan en peso de planta de partida necesario para obtener los diferentes extractos, teniendo en cuenta los rendimientos de extracción.

10

TABLA I

<u>Extractos</u>	<u>Toxicidad expresada en g de planta</u>		
	<u>Vía intraperitoneal</u>	<u>Vía intravenosa</u>	<u>Vía oral</u>
15 C-63	20 g/k: mortalidad nula	20 g/kg: mortalidad nula	-
C-63-E	12 g/kg: mortalidad nula	12 g/kg: mortalidad 40 % 6 g/kg: mortalidad 30 % 3 g/kg: mortalidad 30 %	12 g/kg: mortalidad nula
20 C-63-F1	-	DL-50 = 2 g/kg	-
C-63-JA	-	DL-50 = 1,2 g/kg	-

Acción antiespasmódica "in vitro"

Los resultados de los extractos "C-63", "C-6302" y "C-63-JA" relativos a la acción antiespasmódica, que se han

25

1 realizado en el fleo aislado de cobaya (en lo que se refie-  
re a un posible efecto antihistamínico), en el duodeno aisla-  
do de rata (en lo que se refiere a los efectos anticoliné-  
rgicos y anti-BaCl<sub>2</sub>) y sobre útero aislado de rata (en lo  
5 que se refiere al efecto antiserotonina), están resumidos  
a continuación.

Los protocolos operatorios fueron los siguientes:

a) los fleos aislados de cobaya se obtienen por la  
técnica de Magnus: los cobayas se sacrifican por ruptura  
10 de la nuca y después se desangran. Se extirpa un extremo  
de fleo de 1 a 2 cm aproximadamente, se enjuaga y se trans-  
fiere a una cubeta de órganos que contiene Tyrode atropini-  
zado mantenido a la temperatura de 34°C. La aireación de la  
cubeta se realiza mediante un compresor de aire.

15 Las concentraciones submáximas de agente agonista son  
determinadas anteriormente sobre el órgano.

El agente agonista se deja en contacto durante 20 se-  
gundos y los aportes de agonista se repiten cada dos minutos.

20 El agente antagonista se deja en contacto durante 2  
minutos con el órgano y el agente agonista se agrega al mis-  
mo medio y se deja de nuevo 20 segundos.

Los ensayos se repiten a continuación cada 2 minutos  
hasta retorno a la normalidad.

25 Siempre se realiza otro ensayo de control empleando  
solamente el disolvente del producto ensayado.

1            b) En el caso de los duodenos, el agente agonista se  
deja 30 segundos y los intervalos de tiempo entre cada inter-  
vención son de 5 minutos.

5            c) El efecto antiserotonina se determina en el útero  
aislado de rata hembra virgen de unos 200 g. Se sensibiliza  
el animal con dietilestilbestrol a la dosis de 1 mg/kg me-  
diante inyección subcutánea, a continuación se extirpa el  
útero y se introduce el líquido de JALON más carbógeno. La  
dosis de serotonina en la cubeta varía entre 0,5 y 2  $\mu$ g/ml.  
10 El tiempo de contacto es el de los ensayos sobre duodenos  
(el mismo aparato y el mismo procedimiento).

Los resultados están consignados en la Tabla II, don-  
de la dosis de extractos están expresadas en peso (mg) de  
planta de partida.

15

20

25

TABLA II

Agonista	Dosis aportada	Antagonista	Dosis aportada	Inhibición, %
Histamina	0,2 µg/0,5 ml	C-63	50 mg/1 ml	10
Histamina	0,2 µg/0,5 ml	C-63	100 mg/1 ml	15
Histamina	0,2 µg/0,5 ml	C-63	200 mg/1 ml	40
Histamina	0,4 µg/0,5 ml	C-6302	16 µg/1 ml	10
		<u>Extracto seco</u>	160 µg/1 ml	37
		disuelto en la mezcla de etanol-agua 10:90 en volumen	1600 µg/1 ml	56
Histamina	0,4 µg/0,5 ml	C-63-JA	1000 µg/1 ml	50
BaCl <sub>2</sub>	0,5 mg/0,5 ml	C-63-JA	20000 µg/1 ml	50
Acetilcolina	0,5 µg/0,5 ml	C-63-JA	5000 µg/1 ml	50
Serotonina	1 µg/1 ml	C-63-JA	1800 µg/1 ml	50
Histamina	0,4 µg/0,5 ml	C-63-E no diluido	60 mg/1 ml	68,5

TABLA II

<u>Agonista</u>	<u>Dosis aportada</u>	<u>Antagonista</u>
Histamina	0,2 µg/0,5 ml	C-63
Histamina	0,2 µg/0,5 ml	C-63
Histamina	0,2 µg/0,5 ml	C-63
Histamina	0,4 µg/0,5 ml	C-6302
		<u>Extracto seco</u>
		disuelto en la mezcla de etanol-agua 10:90 en volumen
Histamina	0,4 µg/0,5 ml	C-63-JA
BaCl <sub>2</sub>	0,5 mg/0,5 ml	C-63-JA
Acetilcolina	0,5 µg/0,5 ml	C-63-JA
Serotonina	1 µg/1 ml	C-63-JA
Histamina	0,4 µg/0,5 ml	C-63-E no diluido

TABLA II

<u>aportada</u>	<u>Antagonista</u>	<u>Dosis aportada</u>	<u>Inhibición, %</u>
,5 ml	C-63	50 mg/1 ml	10
,5 ml	C-63	100 mg/1 ml	15
,5 ml	C-63	200 mg/1 ml	40
,5 ml	C-6302	16 µg/1 ml	10
	<u>Extracto seco</u>	160 µg/1 ml	37
	disuelto en la mezcla de etanol-agua (10:90 en volumen)	1600 µg/1 ml	56
,5 ml	C-63-JA	1000 µg/1 ml	50
,5 ml	C-63-JA	20000 µg/1 ml	50
,5 ml	C-63-JA	5000 µg/1 ml	50
1 ml	C-63-JA	1800 µg/1 ml	50
,5 ml	C-63-E no diluído	60 mg/1 ml	68,5

TABLA II (continuación)

<u>Agonista</u>	<u>Dosis aportada</u>	<u>Antagonista</u>	<u>Dosis aportada</u>	<u>Inhibición, %</u>
Histamina	0,4 µg/0,5 ml	C-63-E, dilución 1/2	30 mg/1 ml	25,9
Histamina	0,4 µg/0,5 ml	C-63-E dilución 1/4	15 mg/1 ml	4,7
Acetilcolina	1 µg/0,1 ml	C-63-E no diluido	60 mg/1 ml	17,8
BaCl <sub>2</sub>	0,5 mg/0,5 ml	C-63-E no diluido	60 mg/1 ml	23,8

TABLA II (continuación)

<u>Agonista</u>	<u>Dosis aportada</u>	<u>Antagonista</u>
Histamina	0,4 µg/0,5 ml	C-63-E, dilución
Histamina	0,4 µg/0,5 ml	C-63-E dilución
Acetilcolina	1 µg/0,1 ml	C-63-E no diluido
BaCl <sub>2</sub>	0,5 mg/0,5 ml	C-63-E no diluido

TABLA II (continuación)

<u>aportada</u>	<u>Antagonista</u>	<u>Dosis aportada</u>	<u>Inhibición. %</u>
1/0,5 ml	C-63-E, dilución 1/2	30 mg/1 ml	25,9
1/0,5 ml	C-63-E dilución 1/4	15 mg/1 ml	4,7
1/0,1 ml	C-63-E no diluído	60 mg/1 ml	17,8
1/0,5 ml	C-63-E no diluído	60 mg/1 ml	23,8

1 Acción antiespasmódica in vivo

El método y el aparato son los preconizados por Konzett y Rossler. El animal experimental es un cobaya anes-  
tesiado, mantenido con respiración artificial mediante una  
5 cánula traqueal. La bomba es regulada de manera que suminis-  
tre un volumen de aire conocido, superior al que admitió el  
animal, midiéndose el exceso de aire que se escapa por una  
canalización lateral. La broncoconstricción reduce la can-  
tidad de aire admitido y, por consiguiente, se traduce en  
10 un aumento del volumen de aire en exceso. En un primer tiem-  
po se determina la cantidad mínima de histamina que provoca  
un broncoespasmo mensurable. Después, en un segundo tiem-  
po, se inyectan los productos a estudiar por vía venosa,  
un minuto antes que la histamina.

15 Se calcula el porcentaje de inhibición del bronco-  
espasmo teniendo en cuenta la amplitud de broncoespasmo  
de los testigos que reciben agua y la del broncoespasmo de  
los animales tratados con los extractos "C-63" y "C-63-E",  
según la relación:

20

$$\% \text{ de inhi} \quad \text{Amplitud broncoespasmo testigos} - \text{amplitud}$$
$$\text{bición} = 100 \times \frac{\text{broncoespasmo animales tratados}}{\text{Amplitud broncoespasmo testigos}}$$

25 Los resultados (que representan cada uno de ellos una  
media de 10 medidas) están consignados en la Tabla III, en  
la que las dosis de extractos están expresadas en peso (mg).

1 de planta de partida.

TABLA III

<u>Extracto</u>	<u>Dosis en mg/kg administrada por vía intravenosa</u>	<u>% de inhibición del broncoespasmo a la histamina</u>
5 C-63	1250	48 %
C-63	2500	69 %
C-63	5000	100 %
C-63-E	600	55,3 %

Actividad analéptica respiratoria

10 Se registra en el cobaya macho de 400-600 g, una vez anestesiado, la respiración espontánea mediante una sonda traqueal conectada a un captador electrónico.

En un primer tiempo, la respiración es deprimida mediante una inyección intravenosa de 10 mg/kg de morfina.

15 En un segundo tiempo, 20 minutos después de la morfina, se inyecta por vía intravenosa el producto a estudiar.

20 Se registra el ritmo respiratorio antes de la inyección de la morfina, antes y un minuto después de la inyección del producto a estudiar. Los resultados están consignados en la Tabla IV donde se utiliza la teofilina como producto de referencia y en la que las dosis de extractos están expresadas en peso de planta de partida.

25

TABLA IV

<u>Producto</u>	<u>Dosis</u>	<u>Ritmo respiratorio antes de la morfina</u>	<u>Ritmo respiratorio 20 minutos después de la morfina</u>	<u>Ritmo respiratorio 1 minuto después de la administración del producto</u>
C-63-10	5 g/kg i.v.	90 pulsaciones/min.	47 pulsaciones/min.	83 pulsaciones/min.
C-63-11	2,5 g/kg i.v.	90 pulsaciones/min.	47 pulsaciones/min.	65 pulsaciones/min.
C-63-12	0,3 g/kg i.v.	43 pulsaciones/min.	29 pulsaciones/min.	43 pulsaciones/min.
C-63-JA	16 mg/kg i.v.	58 pulsaciones/min.	29 pulsaciones/min.	55 pulsaciones/min.
Teofilina	20 mg/kg i.v.	58 pulsaciones/min.	29 pulsaciones/min.	47 pulsaciones/min.

TABLA IV

<u>Producto</u>	<u>Dosis</u>	<u>Ritmo respiratorio antes de la morfina</u>	<u>Ritmo respi minutos despu</u>
C-63-10	5 g/kg i.v.	90 pulsaciones/min.	47 pulsaci
C-63-11	2,5 g/kg i.v.	90 pulsaciones/min.	47 pulsaci
C-63-E1-	0,3 g/kg i.v.	43 pulsaciones/min.	29 pulsaci
C-63-JA-	16 mg/kg i.v.	58 pulsaciones/min.	29 pulsaci
Teofilina	20 mg/kg i.v.	58 pulsaciones/min.	29 pulsaci

TABLA IV

<u>Ritmo respiratorio antes de la morfina</u>	<u>Ritmo respiratorio 20 minutos después de la morfina</u>	<u>Ritmo respiratorio 1 minuto después de la administración del producto</u>
90 pulsaciones/min.	47 pulsaciones/min.	83 pulsaciones/min.
90 pulsaciones/min.	47 pulsaciones/min.	65 pulsaciones/min.
43 pulsaciones/min.	29 pulsaciones/min.	43 pulsaciones/min.
58 pulsaciones/min.	29 pulsaciones/min.	55 pulsaciones/min.
58 pulsaciones/min.	29 pulsaciones/min.	47 pulsaciones/min.

1 Actividad antianafiláctica "in vitro"

Unos cobayas reciben 2 ml de ovalbúmina a 100 mg/ml cada uno: 1 ml por vía intraperitoneal y 1 ml por vía subcutánea. La sensibilidad de los animales es aumentada mediante una inyección de 10 mg en 2 ml, 4 días después de la primera administración. Tres semanas después de la última administración, se extirpa el íleo y se coloca en un baño de Tyrode como se ha indicado anteriormente para el estudio del efecto antiespasmódico. Se pone en contacto durante 2 minutos el extracto C-63-F1 a una dosis de 80 mg de planta. Entonces se añaden 0,2 ml de ovalbúmina a la concentración de 1 mg/ml. Se mide la reducción causada por el C-63-F1 sobre la amplitud de las contracciones provocadas por la ovalbúmina. Se comprueba que el C-63-F1 a la dosis de 80 mg (expresada con respecto a la planta) reduce en un 96 % las contracciones debidas a la ovalbúmina.

De forma general, los productos activos en terapéutica extraídos del Teucrium marum son los C-63, C-63-E, C-63-E1, C-63-E2, C-63-E3, C-63-F1, C-6302 y C-63-JA. El extracto C-63-JA es el más interesante en terapéutica como agente antiespasmódico y analéptico respiratorio, para el tratamiento de los espasmos y de las alergias respiratorias. Los C-6302 y C-63-F1 son igualmente interesantes pero en un grado menor que el C-63-JA.

En pruebas clínicas, en el hombre, el C-63-JA ha dado

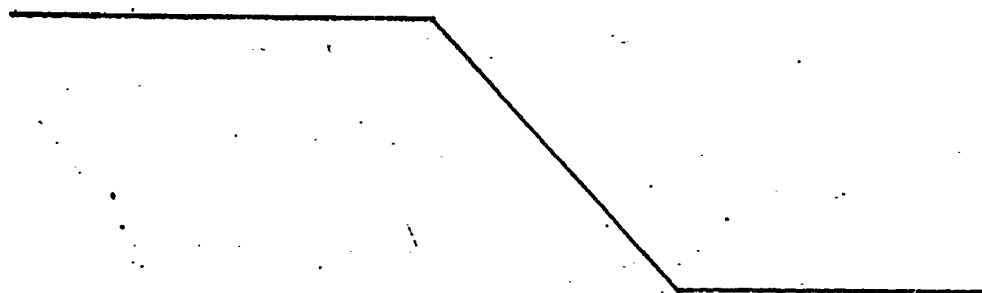
1        buenos resultados en el tratamiento de las alergias respira-  
torias, por administración nasal en forma de aerosol de una  
dosis de 1 mg/kg/día (es decir, alrededor de 200 mg de plan-  
ta/kg/día) durante 3 a 7 días.

5                En esta invención se preconiza una composición tera-  
péutica útil principalmente en el tratamiento de los espas-  
mos y de las alergias respiratorias, caracterizada por conte-  
ner, en asociación con un excipiente fisiológicamente acepta-  
ble, por lo menos un extracto según la invención a una dosis  
10        farmacéuticamente aceptable, tanto en medicina humana como  
veterinaria.

              La administración de las composiciones de la invención  
puede realizarse por vía oral en forma de grageas, cápsulas,  
píldoras, jarabes y ampollas bebibles, por vía local, princi-  
15        palmente en forma de pomada o por inhalación y nebulización  
y por vía rectal, en forma de supositorios o cápsulas recta-  
les. La administración puede realizarse igualmente por vía  
inyectable, principalmente por vía intramuscular, en forma  
de ampollas inyectables.

20

25



1

En resúmen, la Patente de Invención que se solici  
ta deberá recaer sobre las siguientes:

5

REIVINDICACIONES

10

1. Un procedimiento de preparación de un extracto de Teucrium marum útil en terapéutica, según el cual se some- te la planta entera o una parte de ésta a un tratamiento con un disolvente, cuyo procedimiento se caracteriza porque el tratamiento se realiza con un disolvente seleccionado entre el grupo formado por agua a ebullición en presencia de  $\text{NH}_3$ , pentano, hexano, heptano, ciclohexano, ciclopentano, éter de petróleo, cloruro de metileno y sus mezclas y porque, si es necesario, el extracto resultante se somete a purificación.

15

2. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracte- rizado porque dicho tratamiento se realiza con 1 litro de disolvente para una cantidad de 30 a 150 g de planta molida y seca y preferiblemente de 100 g de planta molida y seca.

20

3. Un procedimiento según la Reivindicación 2, ca- racterizado porque la planta molida y seca se trata con agua a ebullición en presencia de  $\text{NH}_3$ , a razón de 4 a 10 g de  $\text{NH}_3$  por litro de agua.

25

4. Un procedimiento según la Reivindicación 2, caracte- rizado porque el disolvente es el hexano.

5. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracte-

1 terizado por tratar de 30 a 150 g de planta (preferentemente  
100 g) con 1 litro de agua en presencia de 4 a 10 g de  $\text{NH}_3$   
a reflujo, durante 2 horas como mínimo y después recoger la  
solución acuosa resultante por filtración.

5 6. Un procedimiento según la Reivindicación 1, ca-  
racterizado por tratar de 30 a 150 g de planta (preferente-  
mente 100 g) con 1 litro de agua en presencia de 4 a 10 g de  
 $\text{NH}_3$  a reflujo, durante 2 horas como mínimo y después recoger  
la solución acuosa resultante y porque, sucesivamente,

10 a) se somete la solución acuosa a absorción sobre resina y se  
desprecia la fracción no absorbida;

b) se lava la resina con agua destilada hasta que el agua de  
lavado, que se desprecia, es incolora;

15 c) se eluye la resina así lavada, sobre la que está fijada la  
sustancia a recoger, mediante un disolvente seleccionado  
entre el grupo formado por los alcoholes  $\text{C}_1\text{-C}_3$  y sus mez-  
clas con agua conteniendo como mínimo 90 % en volumen de  
alcohol inferior, hasta que el eluato, que se desprecia,  
sea incoloro;

20 d) se eluye la resina así tratada, sobre la que está fijada  
la sustancia a recoger, mediante un disolvente selecciona-  
do entre el grupo formado por los alcoholes inferiores  
 $\text{C}_1\text{-C}_3$  y sus mezclas con agua que contienen como mínimo  
90 % en volumen de alcohol inferior, en presencia de un  
25 agente alcalino, preferiblemente  $\text{NH}_3$  a razón de 30 g de

100

1 . NH<sub>3</sub> por litro de eluyente, hasta que el eluato que se re-  
coge sea incoloro;

e) se evapora a vacío el eluato obtenido en la etapa d).

5 7. Un procedimiento según la Reivindicación 6, caracte-  
rizado porque el residuo de evaporación de la etapa e) se  
somete a una purificación que comprende sucesivamente:

f) tratamiento con éter, preferiblemente éter dietílico, para  
recoger la fase etérea que se concentra a vacío a una tem-  
peratura inferior o igual a 30°C;

10 g) absorción del concentrado así obtenido sobre sílice;

h) elución de la sílice así tratada con una mezcla de hexano-  
éter (90:10 en volumen) y


i) evaporación a sequedad a vacío del eluato resultante.

15 8. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracte-  
rizado por tratar la planta por arrastre de vapor, a razón  
de 30 a 150 g (preferentemente 100 g) de planta por litro de  
agua, en presencia de 4 a 10 g de NH<sub>3</sub> por litro de agua.

20 9. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracte-  
rizado por tratar la planta por arrastre de vapor, a razón  
de 30 a 150 g (preferentemente 100 g) de planta por litro de  
agua, en presencia de 4 a 10 g de NH<sub>3</sub> por litro de agua y  
porque el condensado resultante se somete a una purificación  
que comprende sucesivamente:

25 - rectificación a 98°C bajo una atmósfera para recoger el  
destilado;

109

- 1 - extracción con éter, principalmente éter dietílico, despreciándose la materia insoluble y recogiendo la fase etérea que se concentra a vacío a una temperatura inferior o igual a 30°C;
- 5 - absorción sobre sílice de la fase etérea así concentrada;
- elución de la sílice así tratada, mediante la mezcla de hexano-éter (90:10 en volumen) y
- evaporación del eluato así obtenido a sequedad bajo vacío.
- 10 10. Un procedimiento según la Reivindicación 1, caracterizado por tratar la planta mediante un disolvente seleccionado entre el grupo formado por pentano, hexano, heptano, ciclopropano, ciclohexano, éter de petróleo y sus mezclas, a razón de 30 a 150 g (preferentemente 100 g) de planta por litro de disolvente, filtrar y recoger el filtrado que se evapora a sequedad a vacío y porque el residuo de evaporación resultante se somete a una purificación que comprende sucesivamente:
- 15 - tratamiento de dicho residuo de evaporación con hexano, a razón de 1 volumen de hexano por 10 volúmenes de disolvente inicial, despreciándose la materia insoluble y recogiendo se la fase hexánica;
- 20 - absorción de la fase hexánica sobre sílice;
- elución de la sílice así tratada, mediante una mezcla de hexano-éter (90:10 en volumen) y
- 25 - evaporación a sequedad a presión reducida del filtrado re-
- 

1       sultante.

5       11. Un procedimiento según la Reivindicación 10,  
caracterizado porque el disolvente para el tratamiento de  
la planta es el hexano y porque el éter de la mezcla de  
hexano-éter es el éter dietílico.

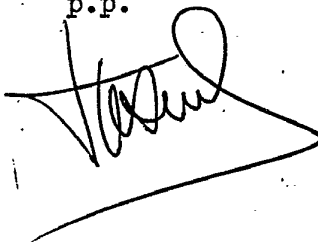
12. Se reivindica por último como objeto sobre el  
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita  
por: UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN EXTRACTO DE  
TEUCRIUM MARUM.

10       Todo conforme queda descrito y reivindicado en la  
presente memoria descriptiva, que consta de treinta y tres  
páginas mecanografiadas.

Madrid, 14 Octubre 1.977

BERNARDO UNGRIA

P.P.



15

20

25

