



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 165 299**

②① Número de solicitud: 200000173

⑤① Int. Cl.⁷: A61K 31/7048

A61K 35/78

A61P 9/14

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **27.01.2000**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2002**

Fecha de concesión: **22.04.2003**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.05.2003**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
16.05.2003

⑦③ Titular/es: **UNIVERSIDAD DE MURCIA**
Avda. Teniente Flomesta, n° 5
Edificio Convalecencia, 3° planta
30003 Murcia, ES

⑦② Inventor/es: **Río Conesa, José Antonio del;**
Ortuño Tomás, Ana María;
Marín Martín, Francisco Ramón y
Fuster Soler, María Dolores

⑦④ Agente: **Ungría López, Javier**

⑤④ Título: **Nuevo procedimiento para la obtención de diosmina a partir de materia prima vegetal.**

⑤⑦ Resumen:

Nuevo procedimiento para la obtención de diosmina a partir de materia prima vegetal.

Comprende: secar y moler la materia prima vegetal, someterla a un primer proceso de extracción con éter de petróleo obteniéndose un residuo de extracción que se somete a un segundo proceso de extracción con metanol, de cuyo extracto se recupera la diosmina que si se desea se puede someter a cristalización para su purificación.

Aplicación en la industria farmacéutica.

ES 2 165 299 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Nuevo procedimiento para la obtención de diosmina a partir de materia prima vegetal.

Campo técnico de la invención

La diosmina es una flavona glucósico con importantes aplicaciones en la industria farmacéutica, por su uso en preparados farmacéuticos como el Daflon 500 mg.

Dentro de este ámbito técnico, la presente invención proporciona un procedimiento para el aislamiento de este flavonoide a partir de plantas de *Hyssopus officinalis* y de diferentes especies del género *Citrus*, tales como *Citrus medica* (Dedos de Buda), *Citrus limon* (Meyer) y *Citrus aurantifolia* (Mejicana).

Estado de la técnica anterior a la invención

Los flavonoides son compuestos fenólicos procedentes del metabolismo secundario de las plantas de gran interés industrial. Dentro de este grupo, se incluyen las flavonas y entre ellas, la diosmina presenta importantes aplicaciones farmacológicas por su efecto sobre la mejora de la resistencia vascular [(1) Tsouderos, Y. (1991) Venous tone: Are the phlebotonic properties predictive of a therapeutic benefit? A comprehensive view of our experience with Daflon 500 mg. Z. Kardiol, 80:95101]; desórdenes inflamatorios; [(2) Jean, T., Bodinier, M.C. (1994). Mediators involved in inflammation: effects of Daflon 500 mg on their release. Angiology, 45:554-559]; como agente antihemorróidico [(3) Godeberg, P. (1994). Daflon 500 mg in the treatment of hemorrhoidal disease: a demonstrated efficacy in comparison with placebo. Angiology 45:574-578; y (4) Meyer, O.C. (1994). Safety and security of Daflon 500 mg in venous insufficiency and in hemorrhoidal disease. Angiology, 45:579-584]; como antioxidante [(5) Villa, P., Cova, D. De Francesco, L., Gwaitani, A., Palladini, G., Perego, R (1992). Protective effect of diosmetin on in vitro cell membrane damage and oxidative stress in cultured rat hepatocytes. Toxicology, 73:179189]; con efecto antiperoxidación de lípidos [(6) Dumon, M.F., Freneix Clerc, M., Carbonneau, M.A., Thomas, M.J., Perromat, A., Clerc, M. (1994). Demonstration of the antilipid peroxidation effect of 3',5,7-trihydroxy-4'-methoxy flavone rutinoside: in vitro study. Annal. Biol. Clin. París 52:265-270]; como protector frente a radicales libres (2); e inhibidor de la síntesis de tromboxanos y prostaglandinas [(7) Labryd, C. (1994). Pharmacologic properties of Daflon 500 mg. Angiology, 45:524-530].

En la actualidad son escasas las aportaciones acerca de la presencia y distribución de la flavona diosmina en las plantas [(8) Kanes, K., Tisserat, B.T., Berhow, M., Vandercook, C. (1993). Phenolic composition of various tissues of rutaceae species. Phytochemistry. 32:967-974; y (9) Marín, F.R., Ortuño, A., Benavente-García, O., Del Río, J.A. (1998). Distribution of flavone glycoside diosmin in *Hyssopus officinalis* plants; changes during growth. Planta Medica 64:181-182] por lo que se han desarrollado métodos para su obtención por vía química. Todos estos procedimientos requieren numerosas etapas para la síntesis y purificación final del compuesto, con el

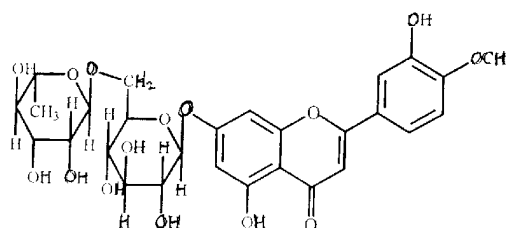
inconveniente adicional de los restos de disolventes orgánicos que pueden acompañar al producto activo finalmente obtenido.

Frente a los inconvenientes anteriormente expuestos, la presente invención se basa en el desarrollo de un nuevo procedimiento para la obtención de diosmina natural a partir de plantas altamente productivas en esta flavona, utilizando un nuevo método para su aislamiento de manera que el principio activo no resulta contaminado por disolventes orgánicos, y por tanto sin efectos secundarios para su uso farmacológico.

Descripción detallada de la invención

La presente invención, tal y como se indica en su enunciado, se refiere a un nuevo procedimiento para la obtención de la diosmina a partir de materia prima vegetal.

La diosmina es exactamente la 4',5,7 trihidroxi, 3'-metoxi flavona 7-rutinosido de fórmula



Los solicitantes han dirigido sus esfuerzos a encontrar aquellos materiales vegetales en los que se produce diosmina en altas concentraciones, encontrando que dichos materiales son los siguientes: *Hyssopus officinalis* (*Lamiaceae*), planta aromática que hasta el momento solo era considerada de interés industrial para la obtención de aceites esenciales, y frutos inmaduros de especies del género *Citrus* (*Rutaceae*), tales como *Citrus medica* (Dedos de buda), *Citrus limon* (Meyer) y *Citrus aurantifolia* (Mejicana).

El procedimiento de la presente invención se basa fundamentalmente en técnicas de extracción de la materia prima vegetal con disolventes orgánicos.

Para llevar a cabo el proceso de la invención se toma la parte de la planta que sea adecuada para los fines pretendidos, se seca en una estufa en corriente de aire y se muele. Seguidamente, la materia vegetal seca y molida se somete a una primera extracción con éter de petróleo para obtener un primer residuo que se somete a una segunda extracción con metanol de cuyo extracto se recupera la diosmina que posteriormente puede purificarse por cristalización, si se desea o es necesario.

En cuanto a la parte de la planta más adecuada para utilizarse en el proceso de la presente invención pueden mencionarse las hojas en el caso de *Hyssopus officinalis* (*Lamiaceae*) y los frutos inmaduros en el caso de las especies del género *Citrus* (*Rutaceae*), en particular, *Citrus medica* (Dedos de Buda), *Citrus limon* (Meyer) y *Citrus aurantifolia* (Mejicana).

El secado de la parte de la planta a utilizar suele llevarse a cabo en una estufa con corriente de aire forzado a una temperatura comprendida entre 55°C y 65°C, preferentemente a 60°C. La

duración del secado es variable dependiendo de la cantidad de materia a secar y del estado de humedad en que la misma se encuentre, pudiendo variar entre unas cuantas horas y varios días. Un período de tiempo de secado habitual puede ser de aproximadamente 1 día.

La materia seca se tritura en un molino hasta: un tamaño de partícula comprendida entre 500 y 1000 μm . Este producto así secado y molido constituye la materia prima vegetal que se somete a dicha primera extracción con éter de petróleo.

Dicha extracción se lleva a cabo a la temperatura de ebullición del éter de petróleo, empleando una proporción de 2-3 ml por cada gramo de materia prima seca. La duración de la ebullición suele estar comprendida entre 1/2 hora y 1,5 horas. Transcurrido este tiempo se deja enfriar el producto y se filtra con papel de filtro. Se recoge el sólido y se vuelve a extraer con la misma, proporción de éter de petróleo en las mismas condiciones, tras lo cual se procede de la misma forma. Se filtra la mezcla, se recoge el residuo de filtración y se seca.

El residuo seco así obtenido se somete a otro proceso de extracción con metanol. Esta extracción se lleva a cabo empleando una proporción de 1 a 3 ml de metanol por cada gramo de residuo, a la temperatura de reflujo del disolvente durante 1-3 horas. Seguidamente se deja enfriar la mezcla hasta una temperatura de 35-45°C y se filtra con papel de filtro, repitiéndose la extracción del residuo así obtenido con la misma cantidad de metanol durante el mismo tiempo.

Tras la filtración se obtiene una solución metanólica rica en diosmina que se concentra en un rotavapor a vacío hasta una proporción de 1/7 a 1/9, preferentemente 1/8 de la cantidad inicial.

A la solución concentrada procedente del rotavapor se añade una cantidad aproximadamente igual de agua destilada. La mezcla se mantiene a temperatura ambiente con agitación durante unas 10-14 horas, tiempo durante el cual cristaliza la diosmina, la cual se recoge mediante filtración a vacío.

La diosmina así obtenida puede purificarse mediante cristalización en metanol.

La principal ventaja del procedimiento de la presente invención frente a los procesos de síntesis química utilizados hasta el momento, radica en

el desarrollo de un proceso de obtención de diosmina natural de determinados órganos vegetales, en los que los procesos de biosíntesis de esta flavona resultan ser máximos, lo que y permite conseguir un mayor rendimiento en el proceso de obtención de diosmina, sin los inconvenientes de los procesos de quimiosíntesis, debido a la presencia de impurezas o residuos de los reactivos utilizados y/o de posibles reacciones secundarias.

Aparte de las ventajas económicas relativas al mayor rendimiento y pureza de la diosmina obtenida por el procedimiento de la presente invención, hay que destacar el efecto beneficioso para la salud humana del consumo de fármacos en los que el principio activo sea un compuesto natural.

Modos de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante el siguiente Ejemplo, el cual no pretende ser limitativo de su alcance.

Ejemplo

Se recolectan aproximadamente 200 gramos de hojas de Hisopo y se secan en estufa de aire forzado a 60°C durante 24 horas.

Una vez secas las hojas se muelen en molinillo y se extractan con 500 ml de éter de petróleo a reflujo durante 1 hora. Enfriar y filtrar con papel de filtro. Recoger el precipitado y volver a extraer con otros 500 ml de éter de petróleo, el mismo tiempo. Fitrar y secar el residuo.

Tomar 100 gramos del residuo y extraer con 200 ml de metanol a reflujo durante 2 horas. Enfriar hasta 40 grados y filtrar con papel de filtro. Repetir la extracción del residuo con otros 200 ml de metanol durante el mismo tiempo. Concentrar en rotavapor los 400 ml de metanol hasta 50 ml y adicionar 50 ml de agua destilada. Dejar en agitación los 100 ml durante 12 horas para que cristalice la diosmina. Filtrar a vacío el precipitado y lavar con 25 ml de metanol:agua (50:50). Se obtiene 5 gramos de diosmina impura.

La purificación del precipitado se realiza mediante cristalización en metanol, para ello se disuelven los 5 gramos de diosmina impura en 25 ml de metanol a 70°C. Una vez disueltos dejar cristalizar en frío durante 12 horas. Filtrar la diosmina cristalizada y secar en estufa a 100°C. Se obtienen 3 gramos de diosmina purificada del 100°.

REIVINDICACIONES

1. Nuevo procedimiento para la obtención de diosmina a partir de materia prima vegetal, **caracterizado** porque comprende esencialmente las siguientes operaciones:

- (a) seleccionar plantas altamente productivas de diosmina eligiendo las partes de las mismas especialmente ricas en diosmina;
- (b) secar y moler las partes seleccionadas de las plantas;
- (c) someter la materia vegetal seca y molida a un primer proceso de extracción con éter de petróleo, para obtener un residuo de extracción;
- (d) someter el residuo procedente de la etapa (c) a un segundo proceso de extracción con metanol de cuyo extracto se recupera la diosmina;
- (e) opcionalmente, someter la diosmina bruta procedente de la etapa (d) a cristalización para su purificación.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque las plantas altamente productivas de diosmina se seleccionan entre *Hyssopus officinalis*, *Lamiaceae*) y especies del género *Citrus* (*Rutaceae*).

3. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque las especies del género *Citrus* están seleccionadas entre *Citrus medica* (Dedos de Buda), *Citrus limón* (Meyer) y *Citrus aurantifolia* (Mejicana).

4. Procedimiento según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la parte de la planta elegida en el caso de *Hyssopus officinalis* son las hojas.

5. Procedimiento según las reivindicaciones 2 y 3, **caracterizado** porque la parte de la planta elegida en el caso de las especies del género *Citrus* son los frutos inmaduros.

6. Procedimiento según las reivindicaciones 1-5 anteriores, **caracterizado** porque el secado de las partes de las plantas escogidas se lleva a cabo en una estufa con corriente de aire forzado a una temperatura comprendida entre 55°C y 65°C, durante varias horas hasta varios días.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, donde dicho secado se lleva a cabo a 60°C durante 24 horas.

8. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la parte de la planta seca, se muele en un molinillo hasta un tamaño de partícula de 500-1000 μ m.

9. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el proceso de extracción de la etapa (c) comprende una primera extracción con éter de petróleo a una temperatura correspondiente al punto de ebullición del mismo, empleando una proporción de 2-3 ml por cada gramo de materia prima seca durante un período de tiempo de 0,5 a 1,5 horas.

10. Procedimiento según la reivindicación 9, **caracterizado** porque la mezcla de extracción se deja enfriar y se filtra recogiendo el sólido.

11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque el sólido obtenido se vuelve a extraer con éter de petróleo en las mismas condiciones descritas en la reivindicación 9, se filtra y se recoge el residuo de filtración para utilizarlo en la etapa (d) siguiente.

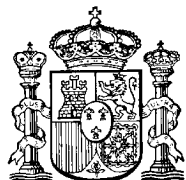
12. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el residuo de filtración obtenido en la etapa 11 se somete a un segundo proceso de extracción con metanol.

13. Procedimiento según la reivindicación 12, donde dicha extracción con metanol se lleva a cabo empleando una proporción de 1 a 3 ml de metanol por cada gramo de residuo a la temperatura de reflujo del metanol, durante 1-3 horas.

14. Procedimiento según la reivindicación 13, donde la mezcla de extracción se filtra y se repite el proceso de extracción con el residuo empleando la misma cantidad de metanol durante el mismo tiempo, tras lo cual se filtra la mezcla obteniendo una solución metanólica rica en diosmina.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, **caracterizado** porque la solución rica en diosmina se concentra a vacío hasta un volumen final de 1/7 a 1/9 de la cantidad inicial y se le añade agua en la misma cantidad que la solución concentrada, manteniéndose la mezcla con agitación a temperatura ambiente durante 10-14 horas con lo que precipita la diosmina bruta.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, **caracterizado** porque la diosmina bruta así obtenida se purifica mediante cristalización en metanol.



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: A61K 31/7048, 35/78, A61P 9/14

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HOROWITZ, R.M. "Flavonoids of Citrus. I Isolation of Diosmin from Lemons (Citrus limon)". J. Org. Chem., 1956, Vol. 21, páginas 1184-1185. Página 1184, columna 2: Experimental; página 1185, columna 2: Extraction of orange peel.	1,2,3
Y		1,2,4
Y	ARTHUR, H.R. et al. "An examination of the Rutaceae of Hong Kong. Part I. Flavonoid Glycosides from Zanthoxylum Species and the occurrence of optically active Hesperetin". J. Chem. Soc., 1956. Páginas 632-635. Página 635: Zanthoxylum nitidum [with C.N.Ma.] - (a) Isolation of diosmin from root bark.	1
Y	MARIN, F.R. et al. "Distribution of Flavone Glycoside Diosmin in Hyssopus officinalis Plants: Changes during growth". Planta Medica, Marzo 1998. Vol. 64, n° 2, páginas 181-2. Página 182, columna 1.	2,4
A	VANDERCOOK, C.E. et al. "Flavonoid changes in developing lemons growth in vivo and in vitro". Phytochemistry, 1989. Vol. 28, N° 3, páginas 799-803.	5

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe

11.02.2002

Examinador

Asha Sukhwani

Página

1/1