(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 176 122**

(21) Número de solicitud: 200100914

(51) Int. Cl.[7]: A61K 35/78
A61K 7/42
A23L 3/3472
A61P 39/06

(12) PATENTE DE INVENCION B1

(22) Fecha de presentación: **19.04.2001**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.11.2002**

Fecha de concesión: **16.12.2003**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **01.02.2004**

(45) Fecha de publicación del folleto de patente: **01.02.2004**

(73) Titular/es: **Universidad de La Laguna**
**Cl. Molinos de Agua, s/n**
**38207 La Laguna, Tenerife, ES**
**Universidad de las Palmas de Gran Canaria**

(72) Inventor/es: **Gutiérrez Luis, Javier y**
**Ruiz de Galarreta, Carlos Manuel**

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Extracto obtenido de tallos y hojas de plantas de la especie *Salvia canariensis*, procedimiento de obtención y su uso.**

(57) Resumen:
Extracto obtenido de tallos y hojas de plantas de la especie *Salvia canariensis*, procedimiento de obtención y su uso.
La presente invención se refiere a la utilización de una planta endémica de las Islas Canarias, la *Salvia canariensis* para la obtención de un extracto con un poderoso efecto antioxidante, en especial frente a las radiaciones. El procedimiento comprende las siguientes etapas fundamentales: Extracción de las partes aéreas de la planta con acetona; concentración del extracto obtenido y oxidación de este concentrado; eliminación de la acetona por destilación; disolución del *extracto verde* en acetato de etilo; extracción con sosa de los catecoles; regeneración de los catecoles desde sus sales por acidulación de la fase acuosa alcalina; extracción de los catecoles libres con acetato de etilo y evaporación del solvente; disolución de este extracto en una mezcla de n-hexano, diclorometano, metanol y eliminación de la clorofila por percolado de dicha disolución a través de tamiz molecular (*Sephadex LH-20*).

ES 2 176 122 B1

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

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 – 28036 Madrid

## DESCRIPCION

Extracto obtenido de tallos y hojas de plantas de la especie *Salvia canariensis*, procedimiento de obtención y su uso.

### Campo de la técnica

- Extracto obtenido de plantas de la especie *Salvia canariensis*.
- Obtención del extracto mediante tratamiento del percolado con acetona de las partes aéreas de la planta.
- Utilización del extracto como antioxidante.
- Preparación de formulaciones cosméticas y farmacéuticas a partir del extracto.
- Utilización del extracto como protector de la piel contra radiaciones, al evitar el efecto del *estrés oxidativo*.

### Introducción

A principios de este siglo se observó por primera vez que el oxígeno molecular (02) y las radiaciones ionizantes o lumínicas actuaban sobre algunos colorantes inocuos (por ejemplo el rojo bengala) transformándolos en potentes tóxicos celulares. La investigación de este fenómeno, que se denominó reactividad fotolumínica, permitió a Mulliken demostrar la formación de un estado excitado del oxígeno (oxígeno singlete: $^1O^{\bullet}{}_2$) durante el proceso de peroxidación y fotoexcitación molecular. El desarrollo de estas investigaciones fue de importancia capital para introducir el término especies reactivas de oxígeno (ERO)/radicales libres de oxígeno (RLO) en el campo de la biología, y demostrar que estas especies radicalarias eran responsables de los efectos tóxicos del oxígeno conocidos, de forma empírica, desde el S XVIII.

Hoy se sabe que los ERO/RLO son especies químicas que se generan de forma continuada como productos colaterales de la utilización celular del $O_2$. Tal y como quedó establecido cuando se aclaró en términos moleculares el mecanismo implicado en la generación de ATP a partir de los sustratos metabólicos (cadena respiratoria y fosforilación oxidativa); este proceso se caracteriza por la participación de 4 electrones y la formación secuencial de radicales superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el compuesto no radicalario $H_2O_2$ y su producto de reducción $HO^{\bullet}$ (radical hidroxilo):

$$O_2 \xrightarrow{e^-} O_2^{\bullet-} \xrightarrow{e^-+2H^+} H_2O_2 \xrightarrow{e^-+2H^+} H_2O + HO^{\bullet} \xrightarrow{e^-+H^+} H_2O$$

De esta forma, aunque el $O_2$ en su estado diatómico normal (triplete) es un birradical que solo posee una reactividad química moderada frente a las moléculas biológicas, su inercia química se altera durante su reducción mitocondrial a agua ($H_2O$), generando especies que se caracterizan bien por tener un electrón desapareado que aumenta su reactividad ($O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$), o por su capacidad para generarlo con facilidad en el caso del agua oxigenada:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO^{\bullet} \qquad \text{(Reacción de Fenton)}$$
$$H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \longrightarrow OH^- + O_2 + HO^{\bullet} \qquad \text{(Reacción de Haber-Weiss)}$$

La existencia de un electrón desapareado le confiere a estas especies, y particularmente al radical extraordinariamente tóxico $HO^{\bullet}$ una alta capacidad para reaccionar con moléculas biológicas. Esta característica, unida al bajo peso molecular y solubilidad que permite a estas especies difundir a través de las membranas y compartimentos intracelulares hace que la ERO/RLO sean por sí mismos agentes sumamente activos en los sistemas biológicos, propiedad que queda, además, exacerbada por la capacidad de estas especies para reaccionar con otros radicales libres ($NO^{\bullet}$: óxido nítrico) para formar peroxinitritos ($ONOO^-$) altamente nocivos:

$$O_2^{\bullet-} + NO^{\bullet} \longrightarrow ONOO^-$$
$$ONOO^- \longrightarrow NO_2^{\bullet} + HO^{\bullet}$$

Aparte de su acción directa, los $ONOO^-$ también pueden descomponerse en condiciones fisiológicas y generar el agente radicalario nitrosante $NO_2^{\bullet}$ y, de nuevo, el radical tóxico de oxígeno $HO^{\bullet}$.

Puesto que aproximadamente el 5 % del $O_2$ que respiramos se convierte en ERO/RLO nocivos para la célula, se conoce como paradoja del oxígeno el absoluto requerimiento del $O_2$ para la supervivencia de los organismos eucariotas superiores que se presenta, de forma simultánea, a la probada capacidad del gas para generar especies tóxicas durante su reducción incompleta en la mitocondria.

Por tanto, e independientemente del nicho ecológico que ocupen, los organismos aerobios han tenido que desarrollar estrategias biológicas para desactivar los efectos deletéreos de las ERO/RLO y que incluyen, entre las más importantes y mejor caracterizadas en los mamíferos, los siguientes sistemas enzimáticos:

| | |
|---|---|
| $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ | (Superóxido dismutasa: SOD) |
| $H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$ | (Catalasa: CAT) |
| $H_2O_2 + 2GSH \longrightarrow 2H_2O + GSSG$ | (Glutatión peroxidasa: Gpx) |
| $GSSG + 2NADPH + H^+ \longrightarrow 2NADP^+ + 2GSH$ | (Glutatión reductasa: Grd) |

Con frecuencia, tal y como se indicará, estos mecanismos básicos de defensa no son suficientes para eliminar todas las especies radicalarias generadas de forma endógena (respiración celular y otros procesos fisiológicos) o las de origen exógeno (radiaciones, polución ambiental, fármacos y tóxicos) que desde el entorno inciden sobre el organismo.

Sin embargo, y apoyando el concepto de paradoja del oxígeno, la formación de radicales libres (ERO/RLO) además del componente negativo de agresión a la célula sana que ya se han descrito, también ejercen efectos beneficiosos para el organismo, entre los que a título de ejemplo citaremos:

* El $O_2^{\bullet-}$ forma parte de la defensa fagocitaria de macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos (estallido respiratorio de los fagocitos):

$$O_2 + NADPH + H^+ \longrightarrow 2NADP^+ + O_2^{\bullet-} \qquad \text{(NADPH-oxidasa)}$$

  En individuos con errores congénitos que afectan a las diferentes subunidades del enzima NADPH-oxidasa de membrana (enfermedad granulomatosa crónica) sus células de defensa, aunque son capaces de fagocitar bacterias, no pueden destruir algunas especies patógenas comunes (*S. aureus*), hecho responsable de las infecciones crónicas y frecuentemente graves que sufren estos pacientes.

* Otro mecanismo usado por los fagocitos utiliza el enzima mieloperoxidasa (MPO) para generar ácidos hipohalosos a partir del agua oxigenada y el haluro ($X^-$) correspondiente

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$
$$H_2O_2 + X^- \longrightarrow OH^- + OHX \qquad \text{Sistema de Klebanoft}$$

  Estas especies ácidas (OHX) son potentes agentes oxidantes y eficaces germicidas; de hecho un antiséptico clásico (la solución de Dakin) está compuesta por ácido hipocloroso (ClHO), que al reaccionar con aminas biológicas circulantes (por ejemplo la taurina) forman cloraminas (RNH-Cl) de un extraordinario poder germicida.

$$R\text{-}NH_2 + OHCl \longrightarrow RNH\text{-}Cl + H_2O$$

* Los radicales libres que se forman por fotolisis del agua en respuesta a las radiaciones ionizantes (radioterapia), o agentes farmacológicos (quimioterapia) juegan también un papel importante en el control de distintos tipos de tumores.

Por algunos de estos efectos beneficiosos, las defensas enzimáticas (*SOD, CAT, Gpx/Grd*) frente a los radicales libres que se generan durante el metabolismo celular no son totalmente efectivas, hecho que permite a los organismos superiores utilizar este recurso molecular para su defensa.

La concentración intracelular de radicales libres puede aumentar bajo condiciones puramente químicas (reacción de Fenton ya descrita y con otros metales de transición como el $Cu^{2+}$), o en respuesta la fotolisis del agua debida a radiaciones (UV, rayos X, radiación $\gamma$). Además, la concentración intracelular de ERO/RLO aumenta en respuesta a diferentes agentes contaminantes (paraquat y otros organofosforados), carcinógenos químicos (tabaco, benzopironas, aloxano), fármacos (paracetamol), agentes antineoplásicos

(daunomicina, etopósido y bleomicina entre otros), productos bacterianos (LPS: lipopolisacárido bacteriano) y citocinas generadas en respuesta a procesos infecciosos, o durante los fenómenos de isquemia/reperfusión.

Por tanto, la acción de los ERO/RLO en los organismos superiores depende de un balance exquisito, pero extremadamente inestable, entre su generación fisiológica (basal o estimulada) y la capacidad de la especie para eliminarlos y/o contrarrestar sus efectos deletéreos sobre los procesos vitales. Aunque las células pueden tolerar e incluso utilizar en su provecho, un cierto tono oxidativo, también reaccionan ante estas especies radicalarias aumentando la síntesis de las defensas enzimáticas ya descritas (SOD, CAl, Gpx/Grd). Sin embargo, la perdida del equilibrio entre el nivel de prooxidación y el tono antioxidante en un órgano o tejido puede producir daño celular y, secundariamente, condicionar la aparición de diferentes estados de enfermedad. Se define el estrés oxidativo como la situación de daño celular que resulta cuando la generación y/o la incidencia exógena de RLO supera la capacidad de los diferentes mecanismos fisiológicos del organismo para prevenir o interceptar su acumulación.

Están bien probados los efectos de las ERO/RLO (y otras especies radicalarias) sobre diferentes componentes macromoleculares de la célula, que incluyen:

i) *Alteración química directa de las bases del DNA.* La reacción del $HO^{\bullet}$ con las cuatro bases (A,T,C,G) del DNA nuclear y de la mitocondria, donde se genera la mayor concentración de ERO/RLO, da lugar a múltiples derivados modificados de las bases, siendo esta reacción responsable del conocido efecto mutagénico de los radicales libres. Mutaciones puntuales pueden dar lugar a proteínas no funcionales, o a especies resistentes a la degradación intracelular que se acumulan de forma anómala en la célula. La capacidad de los ERO/RLO para inducir tumores, puede explicarse por la aparición de mutaciones que inactivan genes supresores de tumores como p53 y/o producen alteraciones en protooncogenes celulares (Ki-*ras* y Ha-*ras*) implicados en la proliferación celular incontrolada. Al mismo tiempo que la exposición continuada a ERO/RLO favorece la adquisición de un fenotipo celular maligno, las especies radicalarias pueden inducir ruptura del DNA y la puesta en marcha del mecanismo de muerte celular programada (apoptosis).

ii) *Modificación oxidativa de aminoácidos y del esqueleto carbonado de las proteínas.* Potencialmente todos los aminoácidos de las proteínas son susceptibles al ataque oxidativo por RLO (especialmente por $HO^{\bullet}$). La modificación oxidativa puede dar lugar a la formación de enlaces disulfuro entre cisteínas oxidadas de cadenas polipeptídicas independientes (RS-SR), la formación de radicales alcoxilo ($RO^{\bullet}$) intermedios que dan lugar a la ruptura aleatoria del esqueleto carbonado, o la alteración de otros restos de aminoácidos que llevan a la pérdida de la actividad funcional de las proteínas. Particularmente importante es la capacidad de los ERO/RLO para modificar restos de histidina y de lisina, que al reaccionar posteriormente con hidratos de carbono y ácidos grasos poliinsaturados dan lugar a una modificación estructural responsable de la pérdida de función y/o de la adquisición de nuevas propiedades físico-químicas que las hace resistentes a los mecanismos fisiológicos de degradación por las proteasas intracelulares.

iii) *Peroxidación de lípidos de las membranas biológicas.* De forma análoga a la descrita para los aminoácidos, los ERO/RLO pueden inducir la peroxidación de ácidos grasos insaturados de las membranas biológicas dando lugar a una perdida de funcionalidad que, en condiciones extremas, da lugar a la muerte celular por necrosis. La peroxidación de los ácidos grasos de la membrana genera además nuevas especies radicalarias tóxicas capaces de inducir efectos similares a los descritos para los RIO/ERO en los apartados anteriores.

iv) *Activación de vías de señalización intracelular.* Los radicales libres inducen vías de señalización compartidas con factores de crecimiento y otros ligandos reguladores, que finalmente llevan a la expresión de genes específicos de respuesta celular. La inducción de estos genes de respuesta puede tener efectos proliferativos o inducir la muerte celular programada, Aunque los organismos unicelulares responden al estrés oxidativo activando factores de transcripción específicos (OxyR y SoxR en *E. coli*; HAP-1 en *S. cerevesiae*) implicados en procesos de defensa frente a ERO/RLO, en las células de mamífero no se ha demostrado la existencia de factores de transcripción que se activen de forma selectivalexclusiva por radicales libres.

No obstante, la exposición a radiaciones ionizantes o el tratamiento con fármacos antineoplásicos (daunomicina, citosin-arabinósido), $H_2O_2$, TNF$\alpha$ y LPS (lipopolisacárido bacteriano) aumentan la generación intracelular de ERO/RLO, que activan el factor de transcripción NF$\kappa$B. En la célula en reposo, este factor se encuentra en su forma inactiva citosólica unida a la proteína inhibidora IF$\kappa$B. En respuesta a la estimulación con los agentes descritos aumenta la fosforilación, separación y degradación de IF$\kappa$B que permite a las subunidades NF$\kappa$B translocarse al núcleo y

formar dímeros activos que se unen a secuencias palindómicas especificas para iniciar la respuesta genómica al estimulo.

En determinadas circunstancias, las radiaciones y el estrés oxidativo inducen a la proteína activadora-1 (AP-1), que en su forma activa está formada por homodímeros fosforilados JUN/JUN y heterodímeros FOS/JUN. La unión de JUN al DNA aumenta cuando la Cys 252 de la proteína está en su forma reducida fenómeno similar al observado para el factor IRE-BP que controla la expresión del gen de transferrina.

Curiosamente, los mismos estímulos que inducen NF$\kappa$B activan la hidrólisis de esfingomielina (SM) y la generación de ceramida, que actúa como un segundo mensajero intracelular capaz de inducir múltiples respuestas biológicas. Uno de los efectos bien conocidos en respuesta a aumentos intracelulares de ceramida es la activación de la cadena de MAPK (quinasas activadas por mitógenos) pero, a diferencia de lo que ocurre en respuesta a factores de crecimiento que se unen a receptores con actividad tirosin-quinasa (TK), lo hace de forma independiente de GTP-*ras*. Además, los agentes inductores de estrés oxidativo e hidrólisis de SM activan una nueva cascada de MAPK denominadas SAPK (quinasas activadas por estrés)/JNK (quinasas del extremo N-terminal de Jun), que a diferencia de otras cascadas de MAPK, rara vez se activan por factores de crecimiento y ésteres del forbol.

La respuesta celular al estrés oxidativo (radiaciones y agentes antineoplásicos), aumenta los niveles intracelulares de la proteína p53 supresora de tumores, que induce una cascada de eventos que llevan al freno del crecimiento celular y, eventualmente a la muerte celular programada (MCP). La respuesta p53 durante el estrés celular implica, en los organismos superiores, tres etapas fundamentales: i) estabilización de la proteína p53; ii) su traslocación nuclear, y iii) la activación /supresión de genes dependientes de p53, que requiere la interacción con otras proteínas (CBP/P300; p33$^{INGl}$) y/o su modificación postransduccional (fosforilación/glicosilación). Uno de los genes que induce p53 es el de p21$^{WA1}$ que actúa como un inhibidor de quinasas de ciclinas implicadas en el progreso del ciclo celular.

El estudio de cómo la acción combinada de uno o más de los efectos anteriores ocasiona lesión celular, es hoy un área de investigación de enorme importancia.

Aunque fueron los trabajos pioneros en el campo de la gerontología los que permitieron descubrir una relación clara entre especies radicalarias de oxígeno y envejecimiento celular, pronto quedó establecido que el papel de los ERO/RLO en los procesos vitales exceden el marco del inevitable proceso del envejecimiento. Hoy se sabe que los radicales libres participan en el desarrollo de múltiples enfermedades humanas, independientemente del proceso patogénico (la isquemia, la degeneración, la inflamación y la transformación neoplásica).

Además de los mecanismos de defensa enzimáticos ya descritos (catalasa, superóxido dismutasa, glutation peroxidasa) a lo largo de la evolución biológica, los organismos han desarrollado la capacidad, dependiendo de la especie, de sintetizar moléculas que actúan como agentes "antioxidantes": ubiquinona, glutatión, ceruloplasmina, transferrina y ácido úrico en el caso de los mamíferos; y compuestos tales como: ácido ascórbico (Vit C), $\alpha$-tocoferol (Vit E), $\beta$-caroteno (Vit A) y diversas flavonas en el caso de los vegetales.

Muchas de estas sustancias forman parte de la dieta de los organismos superiores, y en forma de vitaminas y nutrientes, juegan su papel fundamental contribuyendo a mantener el balance oxidativo en el hombre y otras especies. En este sentido, los efectos beneficiosos para la salud de las dietas ricas en frutas y verduras, se asocian a su contenido en compuestos antioxidantes, y los contenidos en resveratrol de la uva, se asocia al efecto protector del vino sobre el sistema cardiovascular (la llamada "paradoja francesa").

La gran variedad de situaciones patológicas asociadas a la hiperproducción de radicales libres, consecuencia de la incapacidad de las defensas endógenas para antagonizar de forma eficaz y continuada los efectos de los ERO/RLO, ha motivado la búsqueda de agentes antioxidantes (naturales o sintéticos) que actúen bien de forma directa previniendo, sanando y/o retardando la aparición de enfermedades mediadas por RLO, o indirectamente evitando, en forma de conservantes, la oxidación de los alimentos y la formación partir de sus componentes de productos potencialmente tóxicos.

Se han descrito antioxidantes de síntesis que son derivados fenólicos (BHA: butilhidroxianisol; BHT: butilhidroxitolueno), quelantes que secuestran metales (pirrolidinditiocarbamato: PDTC), precursores del glutatión (N-acetilcisteína: NAC) y productos naturales (Vitaminas E y C, $\beta$-carotenos) con propiedades protectoras frente a los radicales libres, y por tanto potencialmente útiles en el tratamiento de

procesos patológicos mediados por ERO/RLO. No obstante, estos agentes adolecen de varios defectos entre los que cabe destacar su baja actividad biológica en unos casos (NAC), su biotransformación rápida e inestabilidad química o excesiva especificidad (Vitaminas E y $\beta$-carotenos), su conversión en productos potencialmente tóxicos (BHA, BHT), sus efectos generales inespecíficos (PDTC) y sus propiedades paradójicas como oxidantes (Vitamina C).

La NAC, que actúa como precursor del glutatión y no presenta toxicidad aparente, se emplea en intoxicaciones por paracetamol. Aunque es un antioxidante extremadamente débil y solo es activo a altas concentraciones, es importante resaltar que un estudio reciente parece apoyar la capacidad de este compuesto para inhibir la multiplicación del HIV y aumentar la supervivencia de enfermos de SIDA, hecho que abre nuevas perspectivas a la terapia con antioxidantes.

Los compuestos sintéticos tipo BHA, probablemente el antioxidante alimentarlo más utilizado, tiene efectos aparentemente contradictorios: por un lado protege de las radiaciones y de la acción de ciertos agentes mutagénicos, pero al mismo tiempo existen pruebas concluyentes que demuestran su capacidad para inducir tumores de estómago, riñón y esófago en animales de experimentación (ratón, rata, cobaya y primates) alimentados con dietas suplementadas con este antioxidante.

El tocoferol (Vitamina E) reacciona con ERO/RLO para formar el radical tocoferilo que es capaz de romper la cadena de formación de radicales libres. Por este mecanismo actúa y previene la oxidación de las LDL plasmáticas y su captación por el receptor *scavenger* (rastrillo) de los macrófagos *in vivo*, proceso que juega un papel importante en la formación de placas de ateroma. En cambio, la efectividad de la Vitamina E en otros procesos mediados por ERO/RLO es más controvertido,

El $\beta$-caroteno (provitamina A) juega un papel importante como *secuestrador* no estequiométrico de oxígeno singlete y cada molécula de provitamina es capaz de inactivar cientos de especies de $^1O_2$.

La Vitamina C, que debe sus propiedades antioxidantes a su capacidad reductora en medio acuoso, puede ella misma ser generadora de radicales libres en determinadas circunstancias fisiológicas.

*Los antioxidantes naturales*: Algunos de los antioxidantes naturales enumerados (Vitaminas A, E y C) son ingeridos con la dieta y además de ser accesibles como suplementos vitamínicos, tienen un amplio uso como aditivos alimentarios.

Las plantas, particularmente las de zonas termófilas sometidas a alta incidencia de radiación solar, son especies que potencialmente deben generar compuestos con capacidad para reducir los niveles de RLO que garanticen su supervivencia. De hecho, hoy se admite que el suplemento vegetal de la dieta ejerce acciones beneficiosas para la salud, que son atribuibles no solo al aporte de vitaminas y minerales que proporciona este tipo de alimentos, sino también a la presencia en su composición de antioxidantes naturales no enzimáticos. Muchos de estos compuestos son particularmente abundantes en frutos (uva: miricetina, resveratrol), plantas aromáticas (té: catequina y epicatequina), o especias (perejil: apigenina; laurel: naringenina) propias de zonas calurosas y soleadas.

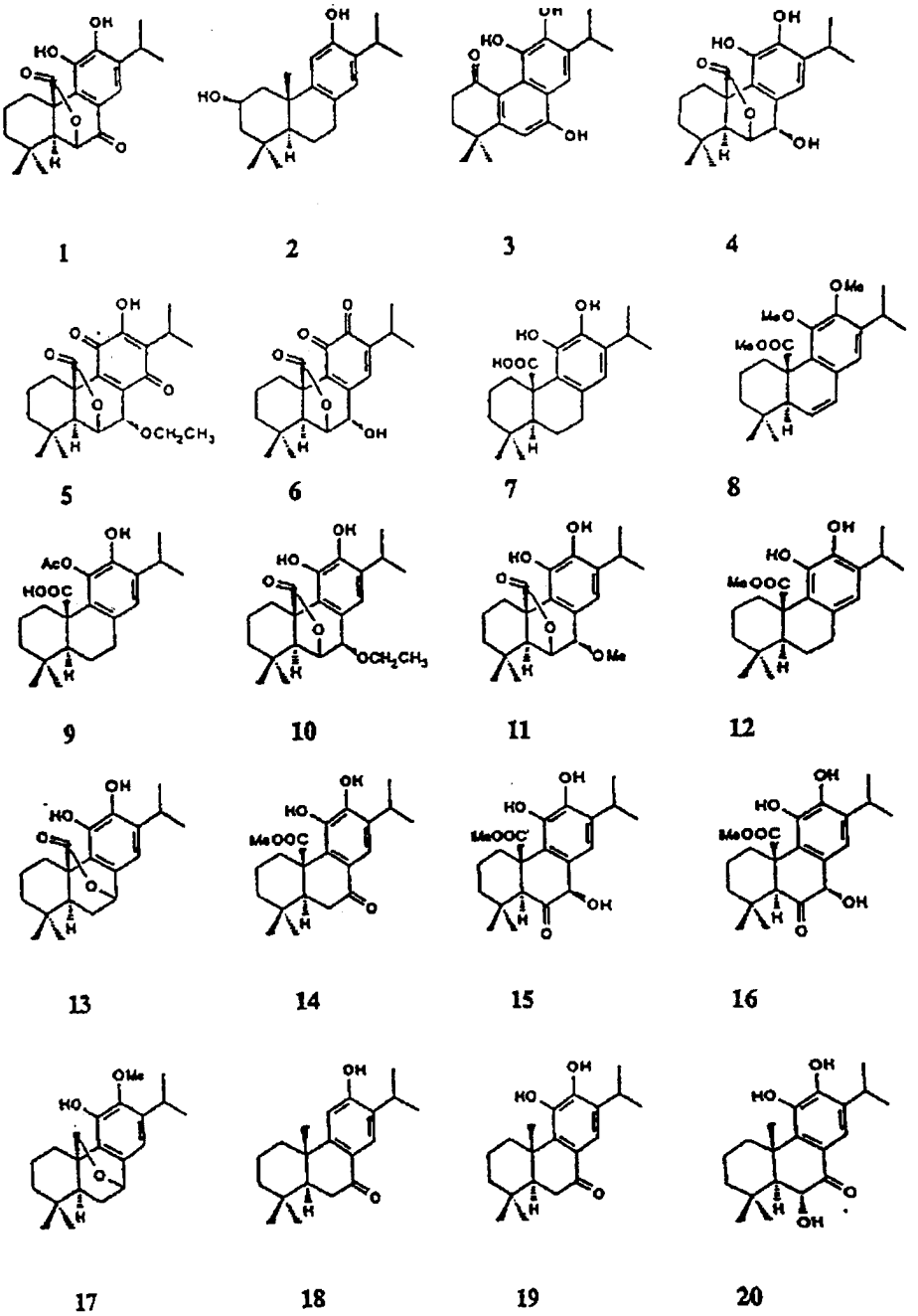
Desde el punto de vista estructural estos compuestos son flavonoles (miricetina, catequina y epicatequina), flavonas (apigenina) o flavanonas (naringenina), que ofrecen buenas perspectivas para su uso como antioxidantes comerciales al unir al componente de "producto natural" presente en los alimentos, la baja toxicidad demostrada para muchos de ellos.

*La Salvia canariensis como fuente de antioxidantes*: La familia botánica Labiatae, a la que pertenecen más de 500 especies del género Salvia caracterizadas hasta el momento, son plantas herbáceas o arbustivas, algunas con indudable interés económico por su contenido en aceites esenciales y/o su uso como condimento en la preparación de adobos preservantes de los alimentos (tomillo, romero, lavándula).

**Breve descripción de la invención**

Las diferentes especies de Salvia se encuentran ampliamente distribuidas en ecosistemas de clima cálido, incluidas las Islas Canarias. Del endemismo *S. canariensis* se han aislado y caracterizado diterpenos abietatriénicos y compuestos estructuralmente relacionados y comunes a otras especies de *Salvia* y en general en plantas de la familia de las labiadas que se presentan en el cuadro 1.

## Cuadro 1




Galdosol (1); Salviol (2); Arucatriol (3); Rosmanol (4); Canariquinona (5); Rosmaquinona (6); Acido carnósico (7); dimetil-metil-ester del ácido dehidrocarnósico (8); Acido 11-acetoxi-carnósico (9); 7-etoxirosmanol (10); 7-metoxirosmanol (11); Metil-ester del ácido carnósico (12); Carnosol (13); metil-ester del ácido 6-oxo-carnósico (14); Metil-ester del ácido 6-oxo-7$\beta$-hidroxicarnósico (15); Metil-ester del ácido 6-oxo-7$\alpha$-hidroxicarnósico (16); 12-metilester de deoxocarnosol (17); Sugiol (18); dimetilcriptojaponol (19); 6$\alpha$-hidroxi-dimetil -criptojaponol (20).

El estudio comparativo, realizado por los autores de la presente invención, con otras especies del archipiélago canario o el Nuevo Mundo (*S. mellifera, S. apiana, S. tiliaefolia, S. munzii*), demostró que el endemismo *S. canariensis* es una especie extraordinariamente rica en estos diterpenos y particularmente en ácido carnósico (compuesto 7) que actúa de *precursor biogenético* en la planta y puede usarse para

obtener estos compuestos por procesos sencillos de hemisíntesis. Algunos de estos compuestos aislados en pequeña cantidad de *Rosmarinus officinalis* (compuestos 4 y 13), son responsables del 90 % de la capacidad de los extractos brutos de la planta para prevenir el enranciamiento de grasas y aceites, hecho que ha permitido postular la utilidad potencial de estos diterpenos como aditivos antioxidantes alimentarios. En base a estas evidencias, los autores de la presente invención, han desarrollado un procedimiento de obtención de un extracto estable constituido fundamentalmente por carnosol.

La presente invención reivindica, entre otras cosas, un nuevo procedimiento de obtener a partir de las partes aéreas (preferentemente tallo y hojas) de las plantas de la especie *Salvia canariensis* dicho extracto. También se reivindica dicho extracto, obtenido por el procedimiento descrito, o sea el propio extracto de *S. canariensis*, caracterizado por presentar, entre otras, relevantes propiedades antioxidantes.

El procedimiento comprende las siguientes etapas:

a) Extracción de las partes aéreas de la planta seca con cetona, preferentemente sin aporte calorífico exterior.

b) Concentración, preferentemente por destilación a vacío, del extracto obtenido, para reducir su volumen, preferentemente a menos de un 10 %.

c) Oxidación del extracto concentrado, preferentemente con oxígeno y fuerte agitación, hasta reducir el contenido de ácido carnósico a menos de un 10 % de su contenido original.

d) Eliminación de la acetona por destilación, para obtener como residuo un *extracto verde*.

e) Disolución del extracto verde en acetato de etilo.

f) Extracción de los catecoles por varios lavados sucesivos con una solución acuosa alcalina (preferentemente NaOH 1N). La fase acuosa alcalina que contiene los catecoles en forma de sales se acidifica (preferentemente con ácido clorhídrico o sulfúrico diluidos), obteniéndose así una emulsión acuosa que se vuelve a extraer con acetato de etilo. Se elimina la solución acuosa y la fase no acuosa (acetato de etilo cargado) se seca (preferentemente con sulfato sódico anhidro molido).

g) Se elimina, por destilación a vacío a menos de 50°C, el acetato de etilo, quedando un residuo pastoso que se disuelve en una mezcla de n-hexano, diclorometano, metanol y se pasa por una columna cargada con un tamiz molecular (*Sephadex LH-20*). La columna se eluye con la misma mezcla n-hexano, diclorometano, metanol, eliminando la primera fracción que sale de la columna, que lleva la clorofila.

h) Se recogen las siguientes fracciones que se someten a una evaporación en vacío a menos de 50°C, quedando como residuo el extracto objeto de la presente invención.

Se ha comprobado las potentes propiedades antioxidantes del extracto así obtenido, que son capaces de prevenir los efectos deletéreos de diferentes inductores del estrés oxidativo (peróxidos lipídicos, luz UV, agua oxigenada) a concentraciones muy inferiores a las de los otros antioxidantes comerciales. Este extracto, además, se muestra mucho más activo, especialmente frente a las radiaciones (ver ejemplo 3) que el extracto rico en ácido carnósico que se hubiera obtenido eliminando los pasos b) y c).

**Estado de la técnica**

El ácido carnósico, considerado en la bibliografía como el principal componente del extracto que se obtiene de las labiadas, se descubrió por primera vez por Linde [*Helv. Chim Acta* 47, 1234 (1962)] en la *Salvia officinalis* y por Wenkert *et al.* [*J. Org. Chem.* 30, 2931 (1965)] en Rosmarinus officinalis. Posteriormente se ha identificado en otras especies de salvia, como por ejemplo en *S. canariensis* [Savona y Bruno, *J. Nat. Instigue.* 46, 594 (1983)], en la *S. willeana* [de la Torre et al., *Phytochemistry* 29, 668 (1990)] y la *S. columbaria* [Javier G. Luis et al., *Phytochemistry* 35, 1373 (1994)].

El poderoso efecto antioxidante del ácido carnósico, fue puesto en evidencia por primera vez por Brieskorn y Domling [Z. *Lebensm Unters Forsch.* 141, 10 (1969)]. Muchos otro diterpenos fenólicos similares en estructura al ácido carnósico se han aislado de las dos especies Salvia y Rosmarinus: ellos incluyen carnosol [Brieskorn *et al.*, *Chem. Ber.* 95, 3034 (1962); *J. Org. Chem.* 29, 2293 (1964)] y, más recientemente, rosmanol [Inatani *et al.*, *Agric. Biol. Chem.* 46, 1661 (1982)] o rosmaridifenol [Houlihan *et al.*, *J. Es. Engrase Chem. Soc.* 61, 1036 (1984)], que han sido patentados como nuevos principios antioxidantes de romero [patente US 4,450,097, Nakatani *et al.*, Lion S.A., Tokyo; patente US 4,638,095,

Chang *et al.*, Investigation S.A., N.Y.].

Los extractos en general (conocidos como oleoresinas) y los de las labiadas en particular, se obtienen percolando la planta con un disolvente aceptado para los alimentos, tal como un alcohol de bajo peso molecular (etanol e isopropanol), una alquilcetona de bajo peso molecular (acetona, metil etil cetona), éter de petróleo, hexano, etc., mientras que no es recomendable el uso de disolventes clorados como cloruro de metileno o dicloruro de etileno. La temperatura de extracción va desde temperatura ambiente (20 a 25°C) al punto de ebullición del disolvente. En general, la extracción no es selectiva; así un disolvente como etanol tiende a extraer más glicolípidos y azúcares que una cetona; un disolvente clorado a su vez es más poderosos y menos selectivo que el hexano. Por ello, en los diferentes procesos de extracción descritos se dan una serie de pasos conducentes a la purificación del extracto crudo. Así, por ejemplo, se puede quitar la clorofila por tratamiento con carbón activo y los azúcares por disolución con agua.

Schwarz y Ternes (K. Schwarz Y W. Ternes [Z. *Lebensm Unters Forsch.* 195, 99 (1992)]), extraen el *R. officinalis* y la *S. officinalis* con alcohol, precipitan el ácido carnósico por acidulación y siguen su transformación por oxidación a carnosol y 7-metil -epirosmanol, comprobando que la producción máxima de carnosol tiene lugar a los 6 días y posteriormente este transforma en rosmanol y, 7-metil-epirosmanol.

Tena y Valcárcel [M. T. Tena y M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, 69, 521 (1997)], hacen la extracción con $CO_2$ supercrítico, encontrando que no se extrae la clorofila y que el ácido carnósico obtenido no se oxida a carnosol ni rosmanol, posiblemente por no extraerse tampoco la deshidrogenasa que cataliza esta oxidación.

Chang (patente US 3,950,266) describe un proceso de destilación para quitar el alcanfor, que es a menudo un componente indeseable, y mientras que los aromas del romero deseables permanecen en la oleorresina refinada si la destilación se termina en el momento apropiado.

Viani, en la patente US 4,012,531, describe la extracción del romero empleando agua a un pH entre 8,6 y 10,5, evitando el gasto de disolvente orgánico, pero el extracto contiene substancias no deseadas para muchas aplicaciones y sólo recupera entre el 60 al 70 % de los productos antioxidantes. Además la dispersión acuosa debe usarse inmediatamente, ya que al cabo de unos días pierde su poder antioxidante. Para superar este inconveniente precipita los productos activos por acidificación del extracto alcalino.

Nakatani (patente US 4,450,097) combina, en la preparación de la oleorresina, la técnica de extracción con disolventes (emplea hexano a temperatura ambiente) con la técnica de Viani de extracción acuosa, para preparar una fracción muy concentrada de antioxidantes, así como para preparar rosmanol.

Kimura (patente US 4,363,823) hace la extracción con alcohol. Berner (patente US 3,732,111) obtiene extractos de salvia con una grasa comestible y separa los volátiles con vapor; utiliza el extracto disuelto en la grasa como antioxidante. Bracco (patente US 4,352,746) describe un proceso para la carbonización del extracto que le permite que sea desodorizado y concentrado por destilación molecular. Kimura (patente US 4,380,506) describe una técnica de extracción con una mezcla de alcohol-agua en la presencia de hexano para obtener una fracción de antioxidante soluble en la fase oleosa y otra insoluble.

Richheimer *et al.* [patente US 9606250 (2/05/96) "Acido carnósico de alta pureza obtenido a partir de extractos de romero y salvia y su procedimiento de obtención" de Hauser Chemical Research, Inc.] pone la materia vegetal en contacto con un disolvente miscible en agua (acetona, etanol, metanol o isopropanol) y ajusta el pH del extracto entre 7 y 10 y añade agua en cantidad suficiente para provocar la precipitación de las impurezas; tras separar estas, acidifica la solución y precipita el ácido carnósico de elevada pureza.

Reinhard [patente DE 4303823 (10/02/93) "Extracto de flores de *Salvia officinalis*, procedimiento para su preparación y su uso" de Heilmittelbetrieb Isernhagen GMBH] realiza la extracción a menos de 40°C con $CO_2$ supercrítico obteniendo un extracto pastoso. A partir de él, mezclándolo con lactosa obtiene un polvo para formar cápsulas, con disolventes apropiados obtiene un elixir o un inyectable y, mezclándolo con vaselina, una pomada.

Entre las aplicaciones de los extractos de plantas de la familia de las labiadas, podemos mencionar las siguiente patentes.

* GB 8530493 (11/12/85) "Producto para la higiene oral" de Unilever PLC y Unilever NV.

* IT 2111587 (30/06/87) "Preparación vegetal para el tratamiento de afecciones de la piel" de IRIS

S.a.s. di Salvioli Michele e C.

* CN 88108860 (28/12/88) "Composición para el tratamiento del cráneo" de Park, Jerry Yong.

* EP 90119218 (6/10/90) "Procedimiento de obtención de ácido carnósico y su utilización por sus propiedades anticancerígenas y antivirales" Societé des produits NESTLE S.A.

* SU 8900115 (28/04/89) "Preparación farmacéutica para el tratamiento de la mastitis en animales y humanos" de Kooperativ "Vivaton".

* US 514311 (25/04/90) y US 685200 (15/04/91) "Composición antioxidante obtenida a partir de las labiadas" de Norac Technologies Inc.

* US 763158 (20/09/91) "Composición de oleoresinas antioxidantes y procedimiento de obtención" de Norac Technologies Inc.

* JP 10765992 (27/04/92) "Agente antiviral conteniendo una droga cruda" de Namba, Tsuneo y Shiraki, Kimiyasu.

* FR 9307983 (30/06/93) "Utilización de derivados del rosmanol para la fabricación de medicamentos antirradicales y/o antiperoxidantes y/o hematótropos" de Laboratoires Dolisos.

* DE 4418976 (31/05/94) "Agente fitoterapéutico utilizable en las lesiones de la piel y alteraciones patológicas de la piel y su procedimiento de fabricación" de Hendricks, Horst Walter y Hendricks, Sabine,

* IT MI941446 (12/07/94) "Composición conteniendo esculósidos y su utilización en el campo farmacéutico y cosmético" de INDENA S.p.A.

* IT MI95A000958 (12/05/95) "Composición farmacéutica para el tratamiento del alcoholismo" de Indena S. P. A., Morazzoni, Paolo y Bombardelli, Ezio.

* AU PN 4111 (10/07/95) "Composición a base de plantas para los trastornos hepáticos" de Cathay Herbal Laboratories PTY, LTD. y Yang, Yi, Fan.

* MK 950076 (25108/95) "Procedimiento de preparación composiciones farmacéuticas ecológicas en el campo veterinario" de MANDIC, Jasna.

* NL 9600210 (24/05/96) "Composición farmacéutica, basada en aceites etéricos obtenidos de plantas para uso en el campo de la medicina humana y veterinaria" de Ropapharm B.V. I.O. y Ninkov, Dusan.

* US 9515277 (13/11/95) "Solución antioxidante natural" de Eastman Chemical Company.

* US 5911994 (15/06/1999) "Extracto de *Salvia officinalis* para su uso en el tratamiento de la contractura de Dupuytrens" de Heilmittelbetrieb Iserbhagen.

* US 6043276 (14/03/2000) "Compuestos con actividad antiviral obtenidos de especies de Salvia" de Georgetown University School.

* WO 0028827 (26/05/2000) "Método para prevenir el desarrollo de sabor al exterior y conservar el sabor sazonando en carne y productos cárnicos irradiados" de Kalamazoo Holding Inc.

Solo conocemos dos publicaciones relacionadas con la *S. canariensis* que mencionan los terpenos (ácido carnósico y carnosol) en ella contenidos. La primera es de Savona y Bruno [Savona y Bruno, *J. Nat. Instigue.* 46, 594 (1983)] que indican haber identificado el ácido carnósico en esta especie. El segundo, de uno de los autores de la presente invención [J. Gutierrez Luis, A.G. González, L.S. Andrés y S. Medercos. "Diterpenos from in vitro-grown *Salvia canariensis* (Diterpenos obtenidos de *Salvia canariensis* cultivada in vitro)". *Phytochemistry*, 31(9), 3272-3273 (1992)], que indican que de esta planta, cultivada in vitro, han obtenido 16-acetoxicarnosol, ácido carnósico, ácido 11-acetoxi-carnósico y carnosol. Ninguno de estas dos publicaciones dan el método de aislamiento del extracto reivindicado en la presente invención ni las aplicaciones del extracto en sí, ya que se remiten a las conocidas aplicaciones del ácido carnósico y sus derivados.

**Descripción detallada de la presente invención**

La *S. canariensis* es una especie endémica de las islas Canarias. Aunque la especie espontánea está protegida, se ha podido realizar su cultivo en las islas. La especie cultivada se puede segar periódicamente, antes de la floración, recogiendo sus tallos y hojas para conseguir el extracto objeto de la presente invención. Tras la siega, y pasado un período de unos 3 meses puede procederse a una nueva recolección.

El extracto de *S. canariensis* reivindicado en la presente invención se obtiene por un procedimiento no descrito hasta ahora, cuya primera etapa consiste en la extracción con acetona, que, aunque está descrita en la bibliografía, creemos necesario justificar aquí.

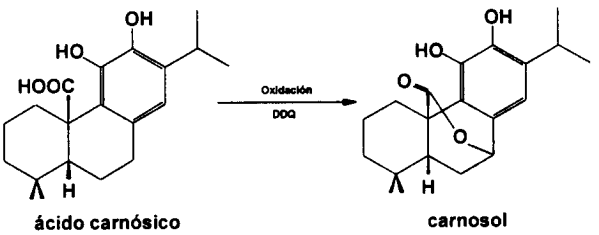
Como es bien sabido, la acetona [*2-propanona* ($CH_3$-CO -$CH_3$)], es un líquido volátil, muy inflamable, de olor característico, sabor picante, dulzón. $d^{25}{}_{25}$ 0,788. p.e. 56,5°C, p.f. -19°C, p. inf. -18°C, es miscible con agua, alcohol, dimetilformamida, cloroformo, éter, y la mayor parte de los aceites; debe manténgase lejos de fuego, así como de gafas de plástico, joyería, plumas y lápices, medias de rayón y otros vestidos de rayón. La LD50 en ratas es de 10,7 ml/kg oralmente; el prolongado o repetitivo uso tópico puede causar eritema, sequedad; la inhalación puede producir dolor de cabeza, fatiga, excitación, irritación bronquial, y, en cantidades grandes, narcotismo, aunque es raro un serio envenenamiento.

Como ya se ha expuesto, la extracción con acetona puede sustituirse por extracción con alcohol y por la moderna técnica de extracción con $CO_2$ *supercrítico*. En la presente invención se ha escogido la acetona permite su fácil eliminación del extracto obtenido como pone de manifiesto el diagrama X-Y del sistema acetona-agua:

| Concentración en la *fase líquida* (X) % en moles | Concentración en la *fase gas* (Y) % en moles | |
|---|---|---|
| | 101 kPa (760 mm) | 1,3 kPa (10 mm Hg) |
| 0,5 | 11,3 | 35,7 |
| 1,0 | 21,7 | 40,6 |
| 2,0 | 38,5 | 83,6 |
| 4,4 | 58,7 | |
| 11,7 | 75,6 | |
| 26,3 | 81,0 | |

que muestra como por destilación a vacío puede eliminarse prácticamente toda la acetona.

Al objeto de acelerar la reacción de oxidación del ácido carnósico a carnosol




ácido carnósico carnosol

es conveniente una concentración de la solución del extracto en acetona, por destilación de una parte de dicho disolvente, para reducir su volumen a aproximadamente un 10 %.

La solución concentrada en acetona se somete ahora a una oxidación con oxígeno, preferentemente por agitación enérgica en vasija cerrada con oxígeno utilizando los procedimientos habituales para ello [por ejemplo: S. Nagata, *Mixing, Principies and applications*, John Wilwy & Sons, N,Y., 1975, p. 335 y sig.]. La reacción se da por terminada cuando se ha transformado más del 90 % de ácido carnósico.

En este momento, se procede a la eliminación del resto de la acetona de la solución para obtener como residuo un *extracto verde*, el cual se disuelve en acetato de etilo. Este extracto, cuyo color es debido a la

presencia de clorofila se somete a una operación de purificación al objeto de eliminar principalmente este componente.

La operación consiste en disolver, en primer lugar, el *extracto verde* en acetato de etilo. De esta solución se extraen los *catecoles* por varios lavados (preferentemente 4) con una solución alcalina (preferentemente NaOH 1N).

Los lavados alcalinos reunidos, se acidifican (preferentemente con con ácido clorhídrico o sulfúrico diluidos). Como consecuencia de esta operación se obtiene una fase orgánica que contiene de nuevo los productos activos, y una solución acuosa que se deshecha. La fase orgánica (acetato de etilo cargado) se seca (preferentemente con sulfato sódico anhidro molido).

Tras la eliminación por destilación a vacío, a menos de 50°C, del acetato de etilo, queda un residuo pastoso, que se disuelve en una mezcla de n-hexano, diclorometano, metanol y se pasa por una columna cargada con un tamiz molecular (*Sephadex LH-20*). La columna se eluye con la misma mezcla de n-hexano, diclorometano, metanol, eliminando la primera fracción que sale de la columna, que lleva la clorofila. Se recogen las siguientes fracciones que se someten a una evaporación en vacío a menos de 50°C, quedando como residuo el extracto objeto de la presente invención.

*Descripción del extracto*

Sólido cristalino incoloro de punto de fusión 212-213°C.

$[\alpha]_D$ = -73.5° (c, 0.95 en $HCCl_3$).

EM m/z(%): 330 $[M]^+$ (22), 286 (100). 271 (9), 243 (7) y 215 (30)

IR (KBr) $cm^{-1}$: 3505, 3495, 1755, 1620, 1520, 1485, 1440, 1290

UV (EtOH) $\lambda$max: 228, 289

RMN$^1$H: 0.86 (3H, s, Me-19), 0.90 (3H, s, Me-18); 1.22 (6H, d, J=7.0 Hz, H-16 y H-17); 1.31 (1H, dd, $J_1$ = 3.5 Hz, $J_2$ = 14.0 Hz, H-3$\alpha$), 1.65 (2H, señales solapadas, H-2$\alpha$ y H-3$\beta$), 1.73 (1H, c, H-5), 1.90 (1H, td, H-6$\beta$), 1.99 (1H, dt, H-2$\beta$), 2.20 (1H, m, H-6$\alpha$), 2.33, 2.39, 2.46 (1H, td, $J_1$ = 4.3 Hz, $J_2$ = 14.0 Hz, H-1$\alpha$), 2.90 (1H, d ancho, H-1$\beta$), 3.08 (1H, hept, J=7.0 Hz, H-15), 5.26 (1H, s ancho, Ar-OH), 5.37 (1H, dd, $J_1$ = 1.4 Hz, $J_2$=4.0 Hz, H-7), 5.73 (1H, s ancho, Ar-OH), 6.64 (1H, s, H-14).

RMN $^{13}$C: 18.8 (t, C-2), 19.7 (q, C-18), 22.5 (q, C16 y C-17), 27.3 (d, C-15), 29. 1 (t, C-1), 29.7 (t, C-6), 31.7 (q, C-19), 34.5 (s, C-4), 41.0 (t, C-3), 45.4 (d, C-5), 48.4 (s, C-10), 77.9 (d, C-7), 112.3 (d, C-14), 121.6 (s, C-9), 132.1 (s, C-13), 132.8 (s, C-8), 141.0 (s, C-12), 141.8 (s, C-11), 175.8 (s, C-20).

*Aplicaciones del extracto*

El extracto obtenido de la *S. canariensis* ha demostrado un efecto antioxidante excepcionalmente alto, muy superior a los antioxidantes de síntesis (BHA) y otros antioxidantes conocidos: NAC, vitamina E, PDTC o el enzima SOD, e incluso al ácido carnósico.

Estas propiedades del extracto obtenido de la *S. canariensis*, le concede aplicaciones en el campo de la alimentación, de la cosmética y de la medicina. Sus aplicaciones en el campo de la alimentación y de la cosmética incluyen:

a) Adición a alimentos para evitar su enranciamiento.

b) Adición a formulaciones de cosméticos para aumentar su propia vida (pérdida de fragancia, destrucción de vitaminas e ingredientes activos, disminución de color sobre todo de carotenoides y desarrollo de ranciedad).

c) Preparación de formulaciones para la protección de la piel.

Las aplicaciones del extracto en el campo de la medicina han quedado bien establecida en las siguientes situaciones:

* *Aparición de Cataratas*: Por afectar al un sector numeroso de la población (en torno a un 5 % de los mayores de 65 años en EEUU y un porcentaje superior en los países del en vías de desarrollo que

condena a muchos afectados a la ceguera permanente), la aparición de cataratas es un problema de salud pública de primer orden. La base patogénica de la formación de cataratas asociadas a la edad, se debe a una opacidad del cristalino directamente relacionada con la modificación de la solubilidad y estado de agregación de las proteínas que lo forman (98 % de su peso seco). La participación de los ERO/RLO en la aparición de cataratas se basa en las siguientes evidencias: i) la asociación epidemiológica entre incidencia de la enfermedad y exposición diferentes tipos de oxidantes (humo del tabaco, radiación UV); ii) la demostración de cambios oxidativos en las proteínas del cristalino (hasta un 70 % de oxidación) que al reaccionar con hidratos de carbono aumentan su opacidad; y iii) la disminución local de sustancias antioxidantes (glutatión y vitamina C) en los pacientes que sufren la enfermedad.

* *Enfermedades neurodegenerativas*: El aumento de la esperanza de vida en los países desarrollados ha venido acompañada de un incremento considerable en el número de personas afectadas por la enfermedad de Parkinson, que se caracteriza por la degeneración y pérdida funcional de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra. Los datos que han permitido postular la participación de los ERO/RLO en la patogénia de la enfermedad de Parkinsom se pueden resumir en:

  i) el aumento en la concentración de peróxidos lipídicos en la sustancia negra en relación con la de enfermos control; ii) los bajos niveles de glutatión reducido y glutatión peroxidasa detectados en la sustancia negra de estos pacientes comparado con enfermos control; iii) el aumento de la concentración de hierro libre en la sustancia negra, que sugiere un aumento en la formación de radicales hidroxilo (reacción de Fenton) posiblemente implicados en la pérdida de funcionalidad neuronal. De forma análoga, existen datos indirectos que apoyan la participación de los ERO/RLO en la génesis de otros trastornos neurológicos. A título de ejemplo, se ha demostrado en el hipocampo de enfermos de Alzheimer, o durante las fases avanzadas de individuos afectados del síndrome de Down, un aumento en la expresión de SOD1, que vendría acompañada de aumentos en la formación de peróxido de hidrógeno. Si considerarnos que los niveles de catalasa en el SNC son bajos, y que los niveles de glutation peroxidasa en estos pacientes son normales, es lógico pensar que el aumento de $H_2O_2$ resultante no puede ser eliminado de forma eficaz, dando así lugar a la formación del radical tóxico hidroxilo ($HO^{\bullet}$).

* *Ateroesclerosis.* Las consecuencias derivadas de la ateroesclerosis (cardiopatía isquémica, arteriopatía de las extremidades inferiores y enfermedades cerebrovasculares) son la causa más frecuente de muerte en los países industrializados. Se acepta de forma generalizada que los radicales libres juegan un papel importante en la oxidación de las lipoproteínas plasmáticas de baja densidad (LDL: low density lipoproteins) implicadas en las fases iniciales de la lesión vascular: formación de estrías grasas que se caracterizan por la acumulación de macrófagos cargados de colesterol, células musculares lisas y tejido fibrótico. Las LUL oxidadas inducen efectos citotóxicos directos sobre el endotelio vascular y, además, son captadas por el receptor *scavenger* de los macrófagos que se activan y generan nuevos ERO/RIO que mantienen el proceso oxidativo y se convierten en células espumosas ricas en colesterol que juegan un importante papel en la formación de la lesión ateromatósa.

* *Oncogénesis.* Las neoplasias, consideradas en su conjunto, son otro de los grandes problemas sanitarios de los países desarrollados. En la base de toda transformación celular neoplásica existe una alteración genética (en ocasiones hereditaria) inducida por agentes físicos (radiaciones), químicos (agentes carcinogénicos) y biológicos (virus). Se ha demostrado que los ERO/RLO están con frecuencia implicados en una o más de las etapas características (iniciación, promoción y progresión) de la transfornación neoplásica. Las radiaciones ionizantes y la luz UV pueden inducir alteraciones directas en el DNA, o actuar de forma indirecta vía generación ERO/RLO por fotolisis del agua intracelular. En otro orden de cosas, las ERO/RLO también aumentan la susceptibilidad a los cancerígenos químicos. A titulo de ejemplo, los agentes promotores de tumores (ésteres del forbol: TPA) actúan en parte incrementando los niveles intracelulares de ERO/RLO, siendo esta propiedad parcialmente responsable de su acción cocarcinogénica. De forma análoga, el humo del tabaco contiene numerosos radicales libres responsables de los efectos cancerígenos, epidemiológicamente demostrados, que acompañan al tabaquismo.

* *Síndrome de isquemia-reperfusión.* Existen situaciones clínicas (infarto agudo de miocardio, accidente cerebrovascular isquémico, isquemia intestinal) caracterizadas por un fenómeno patogénico común: la isquemia o brusca disminución del aporte de oxígeno al tejido responsable del daño tisular. Aunque teóricamente, y asumiendo un período de isquemia limitado en el tiempo, la reperfusión y reoxigenación debería permitir la recuperación del tejido, en muchas ocasiones la reoxigenación viene acompañada de la formación local de ERO/RLO implicados en la inducción de un daño tisular adicional. En los últimos años se ha aclarado el origen y mecanismo de acción de los ERO/RLO responsables del daño tisular por reoxigenación. En primer lugar, en ausencia de oxígeno aumenta

la degradación de ATP, primero a AMP y luego a hipoxantina, que en presencia de $NAD^+$ es convertida por la xantina deshidrogenasa (XDH) en ácido úrico. Sin embargo, durante la isquemia se produce la degradación proteolítica de la XDH para convertirse en xantina oxidasa (XO) que durante la reperfusión no utiliza $NAD^+$ y transfiere electrones al oxígeno molecular que se transforma en radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Este mecanismo viene apoyado por resultados que demuestran que los antioxidantes y los inhibidores de la XO (alopurinol), disminuyen el daño tisular en modelos experimentales de isquemia-reperfusión.

* *Fibrosis pulmonar*: Es un síndrome, cuya prevalencia está en continuo aumento, que deriva de la agresión a las estructuras alveolo-intersticiales por causas, en principio tan diferentes, como las agresiones de tipo físico (radiaciones, humo de tabaco y de otras combustiones, aerosoles), farmacológico (bleomicina y otros agentes antineoplásicos), químico (paraquat) e inmunológico (sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática). La base patogénica de la fibrosis pulmonar es la acumulación en el intersticio pulmonar de fibroblástos y de sus productos de secreción (colágeno y otros componentes de la matriz extracelular). En diferentes situaciones clínicas y animales de experimentación, se ha demostrado un aumento de los ERO/RLO asociados a la enfermedad, demostrándose además en diferentes modelos experimentales de fibrosis pulmonar que la administración de antioxidantes reduce la lesión pulmonar.

* *Infección e inflamación crónica*: Un elemento clave en la respuesta inflamatoria a la infección y a otros agentes etiológicos es el reclutamiento y activación de las células fagocíticas profesionales (leucocitos polimorfonucleares y células del sistema mononuclear fagocítico), que emplean ERO/RLO como mecanismo importante de destrucción antigénica. No es sorprendente, por tanto, que se haya demostrado la participación de estas especies radicalarias en diferentes situaciones de inflamación crónica producidas por agentes infecciosos (por ejemplo tuberculosis) o de otra etiología (lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide).

* *Efectos antivíricos*: Las ERO/RLO también están implicadas en infecciones virales en las que la participación de los fagocitos profesionales es menor, y algunos virus (VIH) inactivan enzimas de la defensa antioxidante (SOD)) y aumentan la generación de especies radicalarias (óxido nítrico). El estrés oxidativo induce la translocación de NF$\kappa$B favoreciendo la replicación viral, y existen sólidas evidencias (experimentales y clínicas) que demuestran que los antioxidantes pueden disminuir la viremia y jugar un papel beneficioso en el tratamiento de enfermedades víricas.

Ejemplos

A continuación se muestran una serie de ejemplos demostrativos de la presente invención:

Ejemplo n° 1

*Obtención del extracto*

El material vegetal seco a tratar, se tritura finamente, y se macera a temperatura ambiente, durante tres días, en acetona destilada. El residuo sólido se somete a esta misma operación dos veces más; hay que aclarar que el resultado de cada maceración no se guarda por separado, sino que se van reuniendo todas en el mismo matraz. La mezcla se filtra y el filtrado se concentra a presión reducida a una temperatura de 40°C. La solución concentrada se somete a una corriente de oxígeno molecular, haciendo burbujear el gas a la disolución anterior mediante un difusor de material poroso. En este proceso logramos enriquecer la muestra en carnosol.

El extracto obtenido se disuelve en acetato de etilo (para 112,65 gr de extracto se emplearon 250 ml de disolvente) y se extrae 5 veces con porciones de 250 ml de disolución acuosa de de NaOH. Posteriormente, las fracciones alcalinas anteriores se reúnen y se acidulan con disolución acuosa de HCl 1N y se extraen tres veces con porciones de 100 ml de acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre sulfato sódico anhidro, se filtran y el disolvente se elimina a presión reducida a 40°C.

El residuo de la operación anterior, se disuelve en una mezcla de n-hexano, diclorometano, metanol y se cromatografía a través de una columna de Sephadex LH-20, usando como eluyente la misma mezcla de n-hexano: diclorometano: metanol en las proporciones: 2:1:1. Las fracciones obtenidas de esta cromatografía se someten a análisis por capa fina para determinar en cuáles de ellas está presente el carnosol y así reunirlas, eliminarles el disolvente y someterlas a cristalización en una mezcla de Acetona-Diclorometano (1:5).

Ejemplo n° 2

*Preparación de cultivos de células*

Se usan líneas celulares hematopoyéticas humanas [HL-60, Jurkat y U937], fibroblastos humanos normales (AG1522) y de ratón (NIH3T3), ya que ambos tipos de células pueden responder de forma diferente al estrés oxidativo: las primeras entrando en apoptosis y las segundas estabilizándose en la fase Gi del ciclo celular [S.E. Kastan, Q. Zhan, F. Carrier, T. Jacks, A.T Fornace "A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD4S is defective in ataxia telangiectaxia". *Cell* 71: 587-597 (1992); E.M. Lee, A. Bernstein, "p53 mutations increase resistance to ionising radiations". *Proc. Nail Acad. Sci. (USA)* 86: 5742 5746 (1993)]. Las células PC12 derivan de un feocomocitoma de rata y se usarán como modelo bien establecido de célula nerviosa. Estas células se cultivan por métodos convencionales en medio suplementado con 10 % suero bovino fetal.

Ejemplo n° 3

*Efecto comparativo del extracto de S. canariensis con otros antioxidantes, en la protección de células U937*

El tratamiento de células U937 humanas con 200 $\mu$M de Cumeno-hidroperóxido (4 horas) redujo hasta niveles indetectables la viabilidad celular. El tratamiento con ácido carnósico no tuvo ningún efecto protector, mientras que el extracto obtenido según el ejemplo 1, previenen este efecto con una ED50 estimativa de 3,8 $\mu$g/mL.

Ejemplo n° 4

*Efecto comparativo del extracto de S. canariensis con otros antioxidantes, en la protección de células HL-60*

Un efecto parecido puede observarse en células HL-60 tratadas con dosis crecientes de ter-butil-hidroperóxido (6-200 $\mu$M) y dos concentraciones idénticas (6 $\mu$g/mL) del extracto obtenido según el ejemplo 1.

Ejemplo n° 5

*Efecto comparativo del extracto de S. canariensis con otros antioxidantes, en la protección de células humanas U937 y HL-60*

En las dos líneas celulares humanas (U937 y HL-60) el tratamiento con el extracto del ejemplo 1 (15 $\mu$g/mL) previene la fragmentación de DNA en escalera, típico de la muerte celular programada (apoptosis), inducida por la radiación UV (un autocrosslink en un equipo Stratagene); efecto que no se consigue con el potente antioxidante sintético BHA (150 $\mu$M) ni con otros antioxidantes conocidos: NAC (20 mM); Vit E (200 $\mu$M); PDTC (150 $\mu$M); ni el enzima SOD (10 U/ml).

Ejemplo n° 6

*Efecto comparativo del extracto de S. canariensis con otros antioxidantes, en la protección de células humanas U937 y HL-60*

En los dos tipos celulares tratadas con $H_2O_2$ (100 $\mu$M) el extracto obtenido según el ejemplo 1, previene de forma dosis -dependiente la fragmentación apoptótica de DNA, efecto que solo se consigue con otros antioxidantes ensayados a dosis muy superiores.

## REIVINDICACIONES

1. Extracto obtenido de tallos y hojas de plantas de la especie *Salvia canariensis*, un endemismo de las Islas Canarias, **caracterizado** porque se obtiene mediante un proceso que incluye como pasos esenciales la extracción con acetona y oxidación de la solución, siendo el extracto un sólido cristalino incoloro de punto de fusión 212-213°C que contiene fundamentalmente di y triterpenos abietatriénicos y compuestos estructuralmente relacionados, destacando entre ellos el *carnosol*.

2. Procedimiento de obtención de un extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 1, **caracterizado** porque tiene lugar según las siguientes etapas correlativas:

i) Extracción de las partes aéreas de la planta con acetona.

ii) Concentración del extracto obtenido.

iii) Oxidación del extracto concentrado para transformar el contenido de ácido carnósico en carnosol.

iv) Separación de la acetona del extracto concentrado, después de la oxidación, para obtener como residuo un *extracto verde*.

v) Disolución del extracto verde en acetato de etilo.

vi) Extracción de los catecoles, con una solución alcalina.

vii) La fase acuosa alcalina, que contiene los catecoles, se acidifica, obtiéndose así una emulsión acuosa que se vuelve a extraer con acetato de etilo. Se elimina la fase acuosa, mientras que la fase orgánica (formada por acetato de etilo cargado con los principios activos) se seca.

viii) Se elimina el acetato de etilo, quedando un residuo pastoso, que se disuelve en una mezcla de n-hexano, diclorometano, metanol y se pasa por una columna cargada con un tamiz molecular para, en la elución obtener primero una solución con clorofila.

ix) Se recogen la o las siguientes fracciones que, juntas en su caso, se someten a una evaporación, quedando como residuo el extracto objeto de la presente invención.

3. Procedimiento de obtención del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la extracción con acetona se hace sin aporte exterior de calor y/o empleando la planta previamente tratada para separar el agua (secado) y/o los aceites esenciales (arrastre con vapor).

4. Procedimiento de obtención del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la concentración del extracto se hace por destilación a vacío, hasta reducir significativamente su volumen.

5. Procedimiento de obtención del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la oxidación del extracto se hace con oxígeno, y la posterior separación de la acetona se hace por destilación a presión reducida.

6. Procedimiento de obtención del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la extracción de los catecoles se hace con NaOH 1N, la acidificación del extracto se hace con ácido clorhídrico o sulfúrico diluidos y el secado con sulfato sódico anhidro molido.

7. Procedimiento de obtención del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 2, **caracterizado** porque la eliminación del acetato de etilo en la etapa viii) se realiza por destilación a vacío a menos de 50°C.

8. Procedimiento de obtención del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 2, **caracterizada** porque el producto empleado como tamiz molecular en la etapa viii) es el producto comercial denominado *Sephadex LH-20* y el eluyente empleado es una mezcla de n-hexano, diclorometano, metanol.

9. Procedimiento de obtención del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 2, **caracterizada** porque la evaporación de la etapa viii) se hace a vacío a menos de 50°C.

10. Utilización del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* en la preparación de un producto protector frente a las radiaciones y de acción antioxidante en el campo de la alimentación, de la cosmética y de la medicina.

11. Utilización del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 10 para formar parte de un preparado para prevenir el enranciamiento de los alimentos.

12. Utilización del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 10 para formar parte de una formulación cosmética para aumentar su duración (pérdida de fragancia, destrucción de vitaminas e ingredientes activos, disminución de color sobre todo de carotenoides y desarrollo de rancidad).

13. Utilización del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 10 para formar parte de un medicamento para prevenir la protección y antienvejecimiento de la piel.

14. Utilización del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 10 para formar parte de un medicamento para la protección de la piel contra la radiación solar.

15. Utilización del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 10 para formar parte de un medicamento para prevenir la aparición de cataratas.

16. Utilización del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 10 para formar parte de un medicamento para prevenir la aparición de enfermedades neurodegenerativas, tales como Alzheimer y Parkinson.

17. Utilización del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 10 para formar parte de un medicamento para prevenir la aparición de ateroesclerósis.

18. Utilización del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 10 para formar parte de un medicamento para prevenir la oncogénesis debida a las radiaciones ionizantes y la luz UV, que pueden inducir alteraciones directas en el DNA, o actuar de forma indirecta vía generación ERO/RLO por fotolisis del agua intracelular.

19. Utilización del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 10 para formar parte de un medicamento relacionado con el síndrome de isquemia-reperfusión.

20. Utilización del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 10 para formar parte de un medicamento relacionado con la fibrosis pulmonar.

21. Utilización del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 10 para formar parte de un medicamento relacionado con infecciones e inflamaciones crónicas.

22. Utilización del extracto de plantas de la especie *Salvia canariensis* según la reivindicación 10 para formar parte de un medicamento con efectos antivíricos.

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 176 122

(21) N.° solicitud: 200100914

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **19.04.2001**

(32) Fecha de prioridad:

# INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl.**[7]**:** A61K 35/78, 7/42, A23L 3/3472, A61P 39/06

## DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|---|---|---|
| Y | SAVONA, G. et al. "Terpenoids of cultivated Salvia canariensis". Journal of Natural Products (Lloydia), 1983. Vol. 46, n° 4, páginas 593-594. | 1 |
| Y | TROJAKOVA, L. et al. "Antioxidant activity of Rosemary and Sage extracts in Rapeseed oil". Journal of Food Lipids, 2001. Vol. 8, n° 1, páginas 1-13. | 1,10,11 |
| Y | LUIS, J.G. et al. "Diterpenes from in vitro-grown Salvia canariensis". Phytochemistry, 1992. Vol. 31, n° 9, páginas 3272-3273. | 1,10,11 |
| A | MISKUSOVA, M. et al. "Application of plant extracts as Antioxidants in fats, oils and emulsions". Czech Journal of Food Sciences, 2000. Vol. 18 (Spec. Issue), páginas 148-149. | 10,11 |
| A | BANDONIENE, D. et al. "Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil". Food Research International, 2000. Vol. 33, n° 9, páginas 785-791. | 1,10,11 |
| A | ES 2002557 A6 (KALAMAZOO HOLDINGS, INC.) 16.08.1988, columnas 1,4,11. | 1,10,11 |
| A | DAPKEVICIUS, A. et al. "Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania". Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998. Vol. 77, n° 1, páginas 140-146. | 1,10,11 |

**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 | Examinador | Página |
|---|---|---|
| 21.10.2002 | Asha Sukhwani | 1/2 |

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 176 122

(21) N.° solicitud: 200100914

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **19.04.2001**

(32) Fecha de prioridad:

# INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl.**[7]**:** A61K 35/78, 7/42, A23L 3/3472, A61P 39/06

## DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|---|---|---|
| A | NGUYEN, H.T.T. et al. "Antioxidant activities of Rosemary and Sage extracts in Rapeseed and Sunflower oils". Czech Journal of Food Sciences, 1999. Vol. 17, n° 4, páginas 121-126. | 1,10,11 |

**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 | Examinador | Página |
|---|---|---|
| 21.10.2002 | Asha Sukhwani | 2/2 |