



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 224 881**

② Número de solicitud: 200302032

⑤ Int. Cl.
A61K 36/886 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **26.08.2003**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2005**

Fecha de la concesión: **26.06.2006**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **16.07.2006**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.07.2006

⑰ Titular/es: **Universidad de Alcalá
Plaza San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares, Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Esteban Carrasco, Alberto;
Martín Marquínez, Mercedes;
Sabater García, Bartolomé y
Zapata Martínez, José Miguel**

⑳ Agente: **No consta**

㉑ Título: **Procedimiento mejorado para el fraccionamiento de principios activos de hojas de Aloe.**

㉓ Resumen:

Procedimiento mejorado para el fraccionamiento de principios activos de hojas de Aloe.

Se detalla y reivindica la utilización de disolventes orgánicos miscibles con el agua para recuperar fenoles y obtener otros principios activos libres de fenoles a partir de hojas de Aloe. También se detalla y reivindica el uso de resinas de interacción hidrofóbica para separar proteínas y polisacáridos en preparados de materias primas vegetales de uso farmacológico, cosmético y nutricional como el Aloe.

ES 2 224 881 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento mejorado para el fraccionamiento de principios activos de hojas de Aloe.

Sector de la técnica

Cosmética, farmacia, sector alimentario (vegetales).

Estado de la técnica

Eliminación oxidativa de componentes, fraccionamientos químicos, separación mecánica de tejidos.

Explicación

El Aloe es una planta de la familia de las Aloéaceas, con hojas duras y carnosas, dispuestas en rosetones o alternadamente, con forma de lanza y una espina en el vértice y varias en los bordes. Existen más de 350 especies, pero solo unas pocas contienen principios con propiedades curativas. La variedad más utilizada es el *Aloe vera* L. (también denominada por Miller como *Aloe barbadensis* M.) por sus cualidades curativas de amplio espectro (Caspasso y col., 1998), muchos de cuyos principios activos han sido identificados (Byeon y col., 1998; Yagi y col., 1999) y se han utilizado contra enfermedades como la diabetes y el cáncer, heridas debidas a quemaduras o cortes, e incluso como paliativo de los efectos de la radiación UV.

Existen numerosos productos comerciales derivados del Aloe que provienen, tal y como la medicina popular les ha denominado, del: exudado de la hoja, epidermis y pulpa o gel. El exudado tiene propiedades digestivas y laxantes y es rico (entre un 70 y un 90% de solutos y sólidos en suspensión) en aloeresinas, aloesinas, aloínas, emodina y antraquinonas (Van Wyk y col., 1995). La epidermis es la capa celular externa de la hoja y, entre sus compuestos se han identificado lectinas que inhiben el crecimiento de fibrosarcoma en ratón (Imaniski y col., 1981). La pulpa o gel es una sustancia mucilaginoso incolora que proviene del parénquima no clorofílico y, en forma de jugo, es la preparación más utilizada como bebida y como aditivo en productos alimenticios, cosméticos y de higiene industrial.

Con fines terapéuticos resulta del mayor interés obtener principios activos puros de Aloe. Además, tanto en usos terapéuticos como en alimentación, uno de los problemas más importantes de las preparaciones derivadas de Aloe consiste en los efectos indeseables de algunos de sus componentes. Así, la presencia de aloínas y compuestos relacionados es un serio problema que limita un uso más extendido de jugos de Aloe como aditivo alimenticio. Una buena separación mecánica de epidermis y parénquima no clorofílico reduce la contaminación por aloínas en el jugo obtenido de este último, pero tal separación resulta difícil de llevar a la práctica de una forma económicamente rentable.

Esta patente describe un método rápido, económico y eficaz para separar y recuperar las sustancias fenólicas (como aloínas), que en determinadas aplicaciones pueden ser perjudiciales o tóxicas, obteniendo un residuo sólido que contiene, entre otros, proteínas y polisacáridos de interés nutricional y terapéutico libres de compuestos indeseables. La separación de las sustancias fenólicas se realiza extrayéndolas con disolventes orgánicos miscibles con el agua (como acetona). El polvo sólido se podría utilizar sin problemas como aditivo nutricional. Adicionalmente, la patente describe el fraccionamiento de dicho residuo sólido

en los principios activos proteínas y polisacáridos con el uso de resinas de interacción hidrofóbica (como puede ser Phenyl Sepharosa® 6 Fast Flow). En los procesos propuestos de fraccionamiento no se utilizan detergentes, bactericidas, ni fungicidas y en el proceso de estabilización no se utiliza ningún conservante ni otra sustancia que pueda resultar tóxica para el consumo humano.

Modo de realización

Parénquima no clorofílico separado mecánicamente de hojas lavadas, se homogeneiza con acetona (aproximadamente 1 litro de acetona por 2 kg de tejido) con un triturador a -20°C, se filtra al vacío y se lava con acetona a -20°C hasta decolorar la preparación. El filtrado de acetona arrastra los compuestos fenólicos (producto 1) que se pueden aislar recuperando la acetona, por ejemplo por evaporación. El precipitado se seca quedando como polvo fino, polvo acetónico (producto 2), esencialmente compuesto por polisacáridos y proteínas y con menos de 4 microgramos de fenoles por kg de producto. Aproximadamente se obtiene 0,1 g de polvo acetónico partiendo de 1 kg de parénquima. Este polvo se conserva perfectamente, especialmente en frío y se puede resuspender en disoluciones acuosas para diversas preparaciones comerciales y, como se detalla a continuación, para separar proteínas y polisacáridos.

Resuspendido el polvo acetónico en tampón 50 mM Tris-Cl (pH 7.5), 1.5 M KCl, 0.1 M CaCl₂ (8 g de polvo por litro de tampón) se centrifuga desechando el precipitado. El sobrenadante se lleva a 1,7 M sulfato amónico y se centrifuga. Al nuevo sobrenadante se le añade Phenyl Sepharose® 6 Fast Flow equilibrada con 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) y 1.7 M de sulfato amónico (100 ml de resina por 1 litro de tampón). La resina se lava 6-7 veces con el mismo tampón con el que se equilibra. De este modo, los polisacáridos (producto 3) son arrastrados en el tampón y las proteínas quedan retenidas en la resina. Después de lavar, se despegan las proteínas (producto 4) con tampón 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) de donde se pueden separar por precipitaciones convencionales.

Resumiendo, por los procesamientos descritos se obtienen:

Producto 1

Compuestos fenólicos (principalmente aloína) que, aunque tóxicos a altas concentraciones, tienen a bajas concentraciones actividades antioxidantes, laxantes, antiinflamatorias y antivirales.

Producto 2

Polisacáridos y proteínas con actividades antiinflamatorias, antioxidantes, analgésicas, cicatrizantes, antivirales y activadoras del sistema inmunitario.

Producto 3

Polisacáridos. Activador del sistema inmunitario (immunoprotector e inmunoregulador), por ejemplo reduciendo el cáncer de piel.

Producto 4

Proteínas con valor nutricional y actividades antioxidantes.

Bibliografía citada

Byeon SW, Pelley RP, Ullrich SE, Waller TA., Bucana CD, Strickland FM. (1998) *Aloe barbadensis* extracts reduce the production of Interleukin-10 after exposure to Ultraviolet radiation. *J. Invest. Dermatol.* 110: 811-817.

Capasso F., Borrelli F., Capasso R., Di Carlo G., Izzo A.A., Pinto L., Mascolo N., Castaldo S.,

Longo R. (1998) Aloe and its therapeutic use. *Phytother. Res.* 12 S124-S127.

Imanishi K, Ishiguro T, Saito H, Suzuki I. (1981) Pharmacological studies on a plant lectin, Aloctin A. I. Growth inhibition of mouse methylcholanthrene-induced fibrosarcoma (Meth A) in ascites form by Aloctin A. *Experientia. Nov* 15;37(11): 1186-1187.

Van Wyk BE, Van Rheede Van Oudtshoorn MC, Smith GF. (1995) Geographical variation in the major compounds of Aloe ferox leaf exudate. *Planta Med.* 61(3):250-253.

Yagi A, Nakamori J, Yarnada T, Iwase H, Tanaka T, Kaneo Y, Qiu J, Orndorff S. (1999) *In vivo* Metabolism of Aloemannan. *Planta Medica* 65: 417-420

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento mejorado para el fraccionamiento de principios activos de hojas de Aloe, **caracterizado** por la obtención de proteínas y polisacáridos de Aloe libres de fenoles con el uso de disolventes orgánicos miscibles con el agua (como acetona) que se aplican homogeneizando con el parénquima no clorofílico separado mecánicamente del resto de la hoja y quedando proteínas y polisacáridos en la fracción insoluble.

2. Procedimiento mejorado para el fraccionamiento

de principios activos de hojas de Aloe, según la reivindicación 1, **caracterizado** por la extracción y recuperación de fenoles de Aloe con disolventes orgánicos miscibles con el agua (como acetona), en los que quedan disueltos y separados de proteínas y polisacáridos.

3. Procedimiento mejorado para el fraccionamiento de principios activos de hojas de Aloe, según la reivindicación 1, **caracterizado** por el uso de resinas de interacción hidrofóbica para separar proteínas y polisacáridos de Aloe.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 224 881

② N° de solicitud: 200302032

③ Fecha de presentación de la solicitud: **26.08.2003**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A61K 35/78

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ESTEBAN, A. et al. "Peroxidase activity in Aloe barbadensis commercial gel: Probable role in skin protection". <i>Planta Médica</i> , 2000, Vol. 66, nº 8, páginas 724-727. Ver página 724, columna 2: Enzymas Sources; página 725, columna 1, líneas 1-5.	1
Y	GRINDLAY, D. et al. "The Aloe vera phenomenon: A review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel". <i>Journal of Ethnopharmacology</i> , 1986, Vol. 16, nº 2-3, páginas 117-151. Ver páginas 136-138,142.	1-3
Y	HAQ, Q.N. et al. "Studies on Glucogalactomannan from the leaves of Aloe vera, Tourn. (Ex. Linn.)". <i>Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research</i> , 1981, Vol. 16, nº 1-4, páginas 68-72. Ver página 69, Isolation of Polysaccharide; página 71, Results and Discussions.	1
Y	SHIMPO, K. et al. "Aloe arborescens extract inhibits TPA-induced ear oedema, putrescina increase and tumour promotion in mouse skin". <i>Phytotherapy Research</i> , 2002, Vol. 16, nº 5, páginas 491-493. Ver página 491, columna 2, Extraction from Aloe arborescens; página 493, columna 1.	2
Y	WO 03055918 A1 (2QR RESEARCH BV) 10.07.2003, páginas 1,3,20-22.	3
A	BARRANTES, E. et al. "Inhibition of collagenase and metalloproteinases by aloins and aloe gel". <i>Life Sciences</i> , Enero 2003, Vol. 72, nº 7, páginas 843-850. Ver página 845, Aloe gel; página 846, Results and Discussions.	1,2

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 nº:

Fecha de realización del informe 21.07.2004	Examinador Asha Sukhwani	Página 1/2
---	------------------------------------	----------------------



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 224 881

② Nº de solicitud: 200302032

③ Fecha de presentación de la solicitud: 26.08.2003

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A61K 35/78

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 6290964 B1 (SHUPE et al.) 18.09.2001, columnas 4,7; reivindicación 1.	1,3

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 nº:

Fecha de realización del informe

21.07.2004

Examinador

Asha Sukhwani

Página

2/2