



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 642**

51 Int. Cl.:
C07J 17/00 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05744278 .2**
96 Fecha de presentación : **20.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1756140**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54 Título: **Separación selectiva o extracción de glucósidos esteroideos mediante extracción de fluido supercrítico utilizando dióxido de carbono.**

30 Prioridad: **25.05.2004 GB 0411703**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.09.2011

73 Titular/es: **UNILEVER N.V.**
Weena 455
3013 AL Rotterdam, NL

72 Inventor/es: **Gunning, Philip James;**
Rose, Paul Martin y
Marriot, Raymond,John

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 364 642 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Separación selectiva o extracción de glucósidos esteroideos mediante extracción de fluido supercrítico utilizando dióxido de carbono

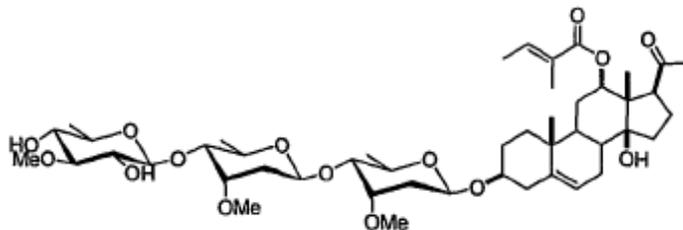
Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a la separación selectiva o la extracción de los glucósidos esteroideos a partir de materiales que contienen más de uno de estos compuestos y, opcionalmente, otros componentes. Más específicamente, dichos materiales pueden ser material de la planta en la que los glucósidos esteroideos se producen en la naturaleza.

Antecedentes de la invención

- 10 Los extractos que se pueden obtener de las plantas de la familia Asclepiadaceae, en particular el género *Hoodia* (anteriormente los géneros *Hoodia* y *Trichocaulon*), se ha demostrado que contienen los glucósidos esteroideos 1, que es un compuesto que suprime el apetito (solicitud PCT WO 98/46243).

- 15 Un proceso de extracción se esboza en la solicitud anterior, que implica el tratamiento del material vegetal con un disolvente para extraer una fracción que tiene actividad supresora del apetito, que separa la solución de extracción del resto del material vegetal, que elimina el disolvente de la solución de extracción y que recupera el extracto. Los disolventes mencionados específicamente para realizar la extracción de uno o más de entre cloruro de metileno (diclorometano), agua, metanol, hexano, acetato de etilo o mezclas de los mismos.



1

- 20 El proceso de extracción del disolvente de la técnica anterior tiende, sin embargo, a dar como resultado una mezcla de compuestos extraídos, no todos los cuales tienen características deseables. Por lo general, algunos pueden tener un sabor desagradable.

La necesidad de un procedimiento de fraccionamiento o de separación posterior para eliminar compuestos indeseables extraídos conduce al aumento de los costes de fabricación y a procedimientos complicados, lo que es preferible evitar.

- 25 La solicitud de patente de EE.UU. nº US-A-2003/0152648, cuya descripción se incorpora al presente por referencia, describe la extracción de los glucósidos de pregnano, en particular estavarósidos, de la planta de *Orbea variegata*, un miembro de la familia Asclepiadaceae. El proceso de extracción implica la extracción inicial del disolvente del material vegetal seco y molido, utilizando un disolvente adecuado. Se afirma generalmente que los "disolventes adecuados incluyen agua, ácidos diluidos, disolventes orgánicos, disolventes líquidos críticos, supercríticos o casi críticos, por ejemplo, dióxido de carbono, óxido nitroso, propano, etano, etileno y fluorohidrocarburos, y mezclas de cualquiera de estos". El disolvente preferido se dice que es un disolvente a base de alcohol, siendo el etanol el más preferido. La extracción con etanol es la única técnica mostrada en algún ejemplo de trabajo. La técnica de extracción con disolvente se dice que puede utilizarse para extraer estavarósidos procedentes del material vegetal, y no hay ninguna enseñanza o sugerencia de usarlo para separar selectivamente glucósidos esteroideos deseables de los glucósidos esteroideos indeseables.

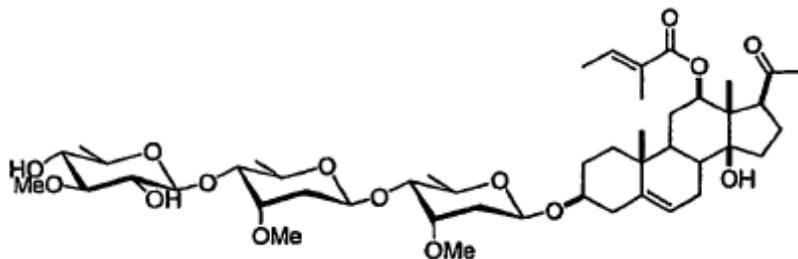
- 35 Moore y Taylor (*J. Nat. Prod.* de 1996, 59, 690-693), cuya descripción se incorpora a la presente por referencia, describen la extracción de los glucósidos cardíacos, digoxina y acetildigoxina, de *Digitalis lanata* utilizando dióxido de carbono modificado con metanol cerca de supercrítico. Los autores indican que para efectuar la extracción eficiente de la extracción el disolvente de extracción fue metanol y dióxido de carbono, donde el metanol se encontraba en el intervalo de 10 a 25%, con las condiciones óptimas que emplean CO₂ modificado con metanol al 20%.

Se ha descubierto ahora, sorprendentemente, que, utilizando una técnica concreta de extracción descrita a continuación, específicamente la utilización de dióxido de carbono líquido o supercrítico, se puede conseguir una extracción selectiva relativamente eficaz de los glucósidos esteroideos deseables de material vegetal de Asclepiadaceae, lo que implica la separación selectiva de glucósidos esteroideos deseables de los glucósidos

esteroideos indeseables, reduciendo o eliminando la necesidad de tratamiento posterior para eliminar los componentes indeseables.

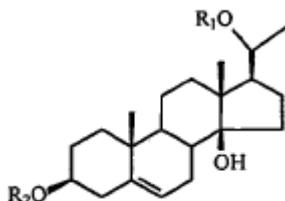
Breve descripción de la invención

La presente invención proporciona un método para separar selectivamente un glucósido esteroideo de fórmula 1



(1)

5 de uno o más glucósidos esteroideos seleccionados de entre los compuestos 3 a 13 definidos a continuación o entre otros compuestos presentes en el material vegetal de la familia Asclepiadaceae que contiene el mismo, comprendiendo el método poner en contacto el material vegetal o material derivado del mismo (en lo sucesivo denominado "el material", con dióxido de carbono líquido o supercrítico en condiciones en las que el glucósido esteroideo de fórmula 1 se disuelve en el dióxido de carbono líquido o supercrítico con preferencia a uno o más de los compuestos 3 a 13 u otros compuestos, y posteriormente recuperar el glucósido esteroideo de fórmula 1 de la solución de dióxido de carbono extraída sustancialmente exenta de cualquier componente del material con sabor desagradable y sustancialmente exenta de uno o más compuestos de 3 a 13:



Compuesto	R ₁	R ₂
3	glu-glu-glu-	tig-the-ole-
4	glu-glu-	tig-mdc-cym-
5	glu-glu-glu-	tig-cym-cym
6	glu-glu-glu-	tig-ole-cym-cym-cym
7	glu-glu-glu-	tig-ole-cym-
8	glu-glu-glu-	ang-mdc-cym-
9	glu-glu-glu-	tig-the-cym-
10	glu-glu-glu-	tig-
11	glu-glu-glu-	tig-cym-
12	glu-glu-glu-	tig-the-ole-cym-
13	glu-glu-glu-	tig-the-cym-cym-

ole = oleandrosa, cym = cimarrosa, glu = glucosa, mda = 3-O-metil-6-desoxialosa, tig = tigloil, ang = angeloil, the = tevetosa.

15 En la descripción siguiente de la invención, el glucósido esteroideo de fórmula 1 se denominará "glucósido esteroideo deseable" y los glucósidos esteroideos que se separan de éste se denominarán "glucósidos esteroideos indeseables".

20 El uso de dióxido de carbono líquido o supercrítico como disolvente de extracción es conocido y están disponibles los aparatos para la realización de la técnica. Para un estudio general de la tecnología, se puede consultar a Kaiser *et al.*, *Pharmazie* 56, 907-926 (2001) y Lang *et al.*, *Talanta* 52, 771-782 (2001).

5 Las condiciones de la extracción que pueden variarse para el control de la selectividad son principalmente la temperatura y la presión del aparato sellado de extracción. Sin embargo, el estado de la técnica en general ha restringido el uso de la técnica a la extracción de compuestos activos procedentes de la pared celular inactiva y otros materiales y el uso de dióxido de carbono líquido o supercrítico como medio para separar selectivamente glucósidos esteroideos deseables de glucósidos esteroideos indeseables relativamente químicamente similares en el material vegetal de la familia Asclepiadaceae no se conocía o sugería con anterioridad.

Después de una extracción inicial del material, se pueden realizar más ciclos de mayor extracción en el resto del material, si se desea, usando dióxido de carbono fresco, con el fin de maximizar el rendimiento de los compuestos extraídos.

10 Se puede realizar una extracción inicial utilizando dióxido de carbono líquido, y realizar una posterior extracción en el resto del material utilizando dióxido de carbono supercrítico. Alternativamente, tanto una extracción inicial como una posterior puede utilizar dióxido de carbono líquido. Aún más, tanto una extracción inicial como una posterior pueden utilizar dióxido de carbono supercrítico. Las condiciones de estas extracciones sucesivas pueden elegirse para eliminar preferentemente componentes particulares del material.

15 El método de la invención puede realizarse, si se desea, utilizando un flujo de dióxido de carbono con recuperación aguas abajo de los glucósidos esteroideos deseables.

20 El método de la presente invención puede utilizarse con otros procedimientos de extracción para eliminar otros componentes, p. ej., no esteroideos, de la materia que va a tratarse. Así, por ejemplo, una extracción inicial usando dióxido de carbono líquido se puede realizar en condiciones seleccionadas para eliminar preferentemente compuestos lipófilos indeseables, tales como los ácidos grasos del material. Una extracción posterior llevada a cabo en el resto del material de acuerdo con la presente invención puede dar como resultado un rendimiento mejorado de los glucósidos esteroideos deseables.

25 Un extracto producido por el método de la invención puede, si se desea, ser sometido a una o más extracciones posteriores, p. ej., una o más extracciones posteriores de disolvente utilizando uno o más disolventes orgánicos para eliminar los compuestos residuales no deseados, por ejemplo, los glucósidos no esteroideos. La elección del disolvente(s) orgánico(s) estará dentro de la capacidad de una persona experta en esta materia, teniendo en cuenta los materiales que se tratan. Dichas extracciones de disolvente o más posteriores se puede realizar de forma adecuada con disolventes orgánicos seleccionados de acetona, acetato de etilo, heptano (p. ej., n-heptano), etanol, hexano (p. ej., n-hexano) y cualquier mezcla o combinación de los mismos, y en cualquier temperatura conveniente.

30 El material sobre el que puede realizarse el método de la presente invención puede ser material vegetal o material derivado del mismo. La expresión "material vegetal" en este contexto incluye todas las formas de material vegetal, incluyendo material vegetal recién cortado, material vegetal seco o conservado, que opcionalmente pueden ser triturados, por ejemplo, en polvo o machacado. La expresión "material derivado del mismo" en este contexto incluye extractos y decocciones obtenidos a partir de material vegetal. Dicho extracto puede obtenerse, por ejemplo, por un método de extracción no selectivo, tal como el método de extracción con disolvente de la técnica anterior.

40 El glucósido esteroideo de fórmula 1 tiene bioactividad deseable, por ejemplo con bioactividad para suprimir el apetito (concretamente mediante acciones en los centros del cerebro que controlan sensaciones de hambre y saciedad), para tratar el exceso de peso corporal (concretamente el peso corporal medio anterior para la edad y altura del individuo), para tratar la obesidad, para reducir la ingesta calórica total de un individuo (concretamente, la ingesta calórica total durante un período prolongado de por lo menos aproximadamente dos semanas en un estilo de vida o medio en el que los productos alimenticios y las bebidas calóricas están disponibles sustancialmente a discreción), o cualquier combinación de los mismos.

45 Más concretamente, la planta puede ser una planta del género *Hoodia*. La planta del género *Hoodia* puede convenientemente seleccionarse de entre *Hoodia gordonii*, *Hoodia currorii* subsp. *Currorii* y *Hoodia currorii* subsp. *lugardii*. La planta del género *Hoodia* es preferiblemente *Hoodia gordonii*.

Los glucósidos esteroideos indeseables u otros compuestos, de los que los glucósidos esteroideos deseables deben separarse según el método de la invención, pueden, por ejemplo, comprender un componente de sabor desagradable.

50 Un proceso de extracción de múltiples etapas puede utilizar diferentes condiciones de temperatura y/o presión en diferentes etapas. Más concretamente, pueden utilizarse condiciones de presión diferentes. La presente invención por lo tanto incluye dentro de su alcance la utilización de una extracción a presión múltiple de plantas secas del género *Hoodia* en la que el material vegetal se extrae inicialmente con dióxido de carbono en condiciones líquidas para extraer el material lipófilo no deseado, tal como los ácidos grasos, y luego se extrae posteriormente con dióxido de carbono en condiciones supercríticas para producir un extracto que contiene niveles elevados del compuesto 1, aunque dejando glucósidos esteroideos no deseados u otros compuestos con la matriz vegetal.

55

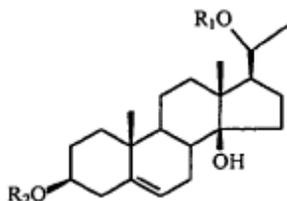
5 Si se desea, uno o más co-solventes acuosos u orgánicos se puede utilizar en el método de la invención, junto con el dióxido de carbono disolvente y en las mismas condiciones de temperatura y presión aplicadas al dióxido de carbono. Cualquiera de dichos co-solventes que está presente se utilizará generalmente en cantidades pequeñas en relación con el dióxido de carbono, por ejemplo, menos de un 10% en peso (p. ej., alrededor del 5% en peso) en relación con la cantidad de dióxido de carbono utilizado. El co-disolvente adecuado se puede seleccionar de agua, metanol, etanol, hexano (por ejemplo, n-hexano), heptano (por ejemplo, n-heptano) y cualquier mezcla o combinación de ellos.

La presente invención permite proporcionar glucósidos esteroideos, que han sido separados del material vegetal por medio del método de la invención.

10 **Descripción detallada de la invención**

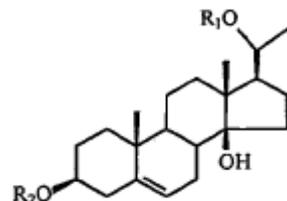
La taxonomía de las plantas de la familia Asclepiadaceae se ha revisado en los últimos años. Por ejemplo, en 1992 Bruyns reclasificó numerosas plantas del género *Hoodia*, que anteriormente estaban en el género *Trichocaulon* (Bruyns; *Bot. Jahrb. Syst.* 115 (2) 145-270 (1993)). Dicha reclasificación está relacionada con *Hoodia pilifera*, anteriormente *Trichocaulon piliferum*. El género *Trichocaulon* ya no existe.

15 La labor emprendida en la identificación de las moléculas presentes en las plantas del género *Hoodia* ha demostrado que un compuesto 1 está presente, además de una serie de glucósidos esteroideos cubierto por la estructura genérica 2.



2

Por ejemplo, se han aislado y caracterizado once compuestos (compuestos 3 a 13) de *Hoodia gordonii*.



Compuesto	R 1	R 2
3	glu-glu-glu-	tig-the-ole-
4	glu-glu-	tig-mda-cym-
5	glu-glu-glu-	tig-cym-cym
6	glu-glu-glu-	tig-ole-cym-cym-cym
7	glu-glu-glu-	tig-ole-cym-
8	glu-glu-glu-	ang-mda-cym-
9	glu-glu-glu-	tig-the-cym-
10	glu-glu-glu-	tig-
11	glu-glu-glu-	tig-cym-
12	glu-glu-glu-	tig-the-ole-cym-
13	glu-glu-glu-	tig-the-cym-cym-

ole = oleandrosa, cym = cimarroso, glu = glucosa, mda = 3-O-metil-6-desoxialosa, tig = tigloil, ang = angeloil, the = tevetosa.

La extracción con metanol del material de la planta *Hoodia gordonii* seca produce extractos que contienen el compuesto 1 y los compuestos 3 a 13. El uso de otros disolventes tales como diclorometano o acetato de etilo produce asimismo extractos que contiene todos los glucósidos esteroideos.

5 Sorprendentemente, se ha observado que la extracción con dióxido de carbono líquido o supercrítico (por ejemplo, a presiones de 300 a 500 bar y a una temperatura de aproximadamente 55 a aproximadamente 80°C) permite la extracción selectiva del compuesto 1, mientras que conserva los compuestos de 3 a 13 en la matriz vegetal. La presión y la temperatura se puede variar fuera de estos límites.

10 Algunos miembros del género *Hoodia* se sabe que contienen componentes amargos que empobrecen el sabor de la planta o los extractos de la misma. De hecho, los nombres autóctonos de *Hoodia gordonii* y *Hoodia currorii* subsp. *lugardii* es "bitterghaap" que puede traducirse como alimento amargo. El uso de *Hoodia gordonii* como agente de la supresión de apetito puede verse obstaculizado por esta amargura. Sorprendentemente, se ha comprobado que la extracción de plantas del género *Hoodia* utilizando extracción con dióxido de carbono proporciona un extracto rico en compuesto 1, pero carente de cualquier sabor desagradable.

15 Un segundo aspecto de la invención consiste en la utilización de una extracción a presión múltiple de plantas secas del género *Hoodia* en la que el material vegetal se extrae inicialmente con dióxido de carbono en condiciones líquidas para extraer materiales lipófilos no deseados, tales como ácidos grasos, y posteriormente se extrae con dióxido de carbono en condiciones supercríticas para producir un extracto que contiene concentraciones elevadas del compuesto 1, a la vez que dejando glucósidos no deseados de esteroides, por ejemplo los compuestos 3 a 13 con la matriz vegetal.

20 Breve descripción de los dibujos

El dibujo adjunto muestra, meramente a modo de ilustración y sin limitación, un sistema de extracción de dióxido de carbono adecuado para su utilización en la ejecución de la presente invención.

Descripción detallada del dibujo

25 Una unidad de extracción adecuada (ver dibujo) consta de los recipientes extractor y separador, así como de diferentes intercambiadores de calor, bombas, válvulas de regulación y dispositivos. El recipiente extractor se llena con la materia prima que se va a tratar. La presión necesaria se consigue mediante un disolvente que circula desde un depósito. Para aumentar la presión, es necesaria una bomba, que también se encarga del transporte del disolvente una vez se ha logrado la presión de extracción requerida. La presión se mantiene con una válvula de alivio que se abre cuando se excede la presión requerida y transporta el disolvente enriquecido a la etapa del separador. Por lo general, esta etapa de separación está conectada con el depósito de almacenamiento del disolvente. La presión en la etapa de separación y en el depósito de almacenamiento por consiguiente será la misma (con la excepción de las pérdidas de flujo) y corresponderá a la presión de saturación (evaporación) del disolvente a la temperatura correspondiente.

Ejemplos

35 Los siguientes ejemplos ilustran, sin limitación, la extracción selectiva de los glucósidos esteroideos de las plantas de la familia Asclepiadaceae utilizando dióxido de carbono como disolvente.

Ejemplo 1

40 Se molió material vegetal seco de *Hoodia gordonii* hasta obtener un polvo fino (<1 mm). Se rellenaron 700 g de material molido en una sola columna de extracción y se extrajo con CO₂ a 300 bar y 55°C. La Tabla 1 indica la cantidad de extracto obtenido durante la extracción, así como los resultados de los análisis por HPLC de los extractos.

Tabla 1 Rendimiento y composición durante la extracción del material vegetal seco de *Hoodia gordonii* con dióxido de carbono a 300 bar y 55°C

Tiempo de extracción (horas)	Rendimiento (g)	Rendimiento total (g)	% de rendimiento total	Contenido del compuesto 1 (%)
0,5	18,53	18,53	2,65	0,6
1,0	7,70	26,23	3,75	1,3
2,0	6,88	33,11	4,73	1,1
3,0	5,28	38,39	5,48	1,4
4,0	1,21	39,60	5,66	3,0
5,0	2,26	41,86	5,98	2,3
6,0	0,53	42,39	6,06	No determinado

Ejemplo 2

- 5 Se molió material vegetal seco de *Hoodia gordonii* hasta obtener un polvo fino. Tamaño El análisis del tamaño de partículas de este material demostró que el 85% pasaba una malla de 600 micras. Se rellenaron 700 g de material molido en una sola columna extractora y se extrajeron sucesivamente con CO₂ a presión y temperatura crecientes. La Tabla 2 indica la cantidad de extracto obtenido en las cuatro condiciones experimentales, así como los resultados de los análisis HPLC y GC de los extractos.

TABLA 2 Rendimiento y composición en condiciones crecientes de presión y temperatura de dióxido de carbono

	Peso extraído (g)	% de nueve glucósidos esteroides identificados	% de compuesto 1	% de triglicéridos	% hidrocarburos
60 bar a 10°C.	5,000	10,9	1,2	39,3	1,4
100 bar 25°C y 35°C	13,510	43	0,7	17,2	1,3
200 bar a 35°C	1,600	36,5	8,8	11,0	14,8
300 bar a 55°C	13,290	19,2	4,6	17,9	7,9

Ejemplo 3

- 10 Se realizaron una serie de extracciones en condiciones de extracción normalizadas de material vegetal molido de *Hoodia gordonii* con dióxido de carbono a 100 bar a 25°C y 35°C. (CO₂L durante 7 horas, seguido de extracción a 300 bar a 55°C (CO₂S) durante 7 horas. Los dos extractos obtenidos se analizaron por HPLC para determinar que concentraciones de los glucósidos de esteroides. La Tabla 3 muestra la cantidad de material de aporte por lote y el porcentaje del compuesto 1 en los dos extractos obtenidos para cada uno de los experimentos de extracción.

- 15 Los lotes de aporte de *Hoodia gordonii* seca contienen 0,06 a 0,2% del compuesto 1. La extracción con dióxido de carbono líquido (CO₂L) proporciona un extracto con un rendimiento de 0,71 a 1,94% que contiene 0,6 a 2,7% del compuesto 1. No se detectaron los compuestos 3 a 13 en el producto. La extracción sucesiva con dióxido de carbono supercrítico (CO₂S) proporciona un polvo amarillo-verdoso que no tiene sabor amargo con un rendimiento de 0,67 a 2,34% que contiene 2,2 a 5,7% del compuesto 1. De nuevo los compuestos 3 a 13 no se detectaron en el producto.

TABLA 3 Rendimiento y contenido del compuesto 1 obtenido en la extracción de material vegetal seco de *Hoodia gordonii* con dióxido de carbono líquido y supercrítico sucesivo

	Número de experimento	47/091	47/093	47/094	47/095	47/096	47/098	47/099
Material vegetal	Peso de entrada (g)	693	530,2	731,5	743,3	710,1	731,4	742,3
	% compuesto 1 en la entrada	0,20	0,20	0,20	0,14	0,14	0,20	0,20
CO ₂ L	Masa obtenida (g)	8,71	4,76	7,67	9,18	6,13	6,32	9,23
	% de rendimiento	1,26	0,90	1,05	1,24	0,86	0,86	1,24
	% compuesto 1 en CO ₂ L	2,7	2,0	1,4	1,0	1,9	1,4	1,3
CO ₂ S	Masa obtenida (g)	8,00	7,60	17,13	14,20	7,20	10,70	10,30
	% de rendimiento	1,15	1,43	2,34	1,91	1,01	1,46	1,39
	% compuesto 1 en CO ₂ S	5,4	5,0	5,2	4,6	4,5	5,7	5,6
	Experimento número	47/100	47/101	47/102	47/103	47/104	47/110	
Material vegetal	Peso de entrada (g)	736,3	755,3	733,1	790,4	785	730	
	% Compuesto 1 en la entrada	0,16	0,16	0,20	0,20	0,06	0,19	
CO ₂ L	Masa obtenida (g)	7,98	7,48	8,2	6,02	5,61	14,15	
	% de rendimiento	1,08	0,99	1,12	0,76	0,71	1,94	
	% compuesto 1 en CO ₂ L	0,8	1,4	1,1	1,7	0,6	0,7	
CO ₂ S	Masa obtenida (g)	11,00	10,60	14,14	11,48	5,27	9,80	
	% de rendimiento	1,49	1,40	1,93	1,45	0,67	1,34	
	% compuesto 1 en CO ₂ S	4,7	4,6	4,2	5,2	2,2	3,2	

Ejemplo 4

Se realizaron una serie de extracciones en condiciones de extracción normalizadas de material vegetal molido de *Hoodia gordonii* con dióxido de carbono a una presión de 100 bar. El material se molió utilizando un molinillo de café y se tamizó entre 106 y 600 μm . El material molido se secó a 70°C durante un mínimo de 16 horas para eliminar cualquier humedad. La serie de experimentos utilizó 650 a 810 g de material vegetal. La presión de extracción se mantuvo a 100 bar con un caudal de CO₂ de 5 kg/h durante un período de extracción de 7 horas. El producto fue retirado del separador por lavado con metanol. Los lavados con metanol se evaporaron a sequedad para obtener un valor preciso de la masa de extracción. La eficiencia de la extracción del compuesto 1 se obtuvo por análisis por HPLC de los lavados con metanol y se comparó con la cantidad del compuesto 1 en el material de entrada. La tabla 4 muestra la cantidad de material de entrada por lote y el porcentaje del compuesto 1 en los extractos obtenidos para cada uno de los experimentos de extracción en los que la temperatura se varió de 5 a 75°C. Los compuestos 3 a 13 no se detectaron en el producto.

TABLA 4 Eficacia de extracción del compuesto 1 obtenido en la extracción de material vegetal seco de *Hoodia gordonii* a varias temperaturas con dióxido de carbono líquido o supercrítico a una presión fija de 100 bar

Peso de la carga (g)	Temperatura (°C)	Masa de extracto (g)	Compuesto 1 en extracto (%)	Eficiencia de extracción para el compuesto 1 (%)
807,6	5	9,69	2,75	18,33
717,4	15	6,60	2,71	13,85
707,4	25	8,77	1,53	10,54
712,5	35	8,69	0,46	3,12
725,7	40	11,97	0,15	1,65
723,7	45	3,62	0	0,00
657,6	55	0,59	0,14	0,07

Ejemplo 5

Se realizaron una serie de extracciones en material vegetal molido de *Hoodia gordonii* con dióxido de carbono a una presión de 300 bar. El material se molió utilizando un molino de martillos que pasa a través de un tamiz de 2 mm de malla. La presión de extracción se mantuvo a 300 bar con una relación de alimentación de CO₂ de 100 kg de CO₂/kg de entrada durante un período de extracción de aproximadamente 7 horas. La eficacia de la extracción del compuesto 1 se obtuvo por análisis por HPLC del material vegetal empleado y se comparó con la cantidad del compuesto 1 en el material de entrada. La tabla 5 muestra la cantidad de material de entrada por lote y la eficacia de la extracción del compuesto 1 para cada uno de los experimentos de extracción en los que la temperatura se varió de 0 a 90°C. Los compuestos 3-13 no se detectaron en el producto.

TABLA 5 Eficacia de extracción de un compuesto 1 obtenido en la extracción de material vegetal seco de *Hoodia gordonii* a varias temperaturas con dióxido de carbono líquido o supercrítico a una presión fijada de 300 bar

Peso de la carga (g)	Temperatura (°C)	Eficacia de la extracción para el compuesto 1 (%)
87,54	0	27
88,55	20	31
87,52	40	48
85,92	60	53
85,02	80	59
84,75	90	60

Ejemplo 6

Se realizaron una serie de extracciones en material vegetal molido de *Hoodia gordonii* con dióxido de carbono supercrítico explorando los efectos de las altas temperaturas y presiones, el tamaño de las partículas de entrada, y la presencia de co-solventes. El material que pasa a través de un tamiz de malla 0,7, 1 o 2 mm se molió utilizando un molino de martillos. La presión de extracción se mantuvo fijada en 300 o 500 bar con una relación de alimentación de CO₂ de 100 kg de CO₂/kg de entrada durante un período de extracción de aproximadamente 7 horas. La eficiencia de extracción del compuesto 1 se obtuvo por análisis por HPLC del material vegetal empleado y se comparó con la cantidad del compuesto 1 en el material de entrada. La Tabla 6 muestra la cantidad de material

de entrada por lote y la eficiencia de la extracción del compuesto 1 para cada uno de los experimentos de extracción. Compuestos de 3 a 13 no se detectaron en el producto.

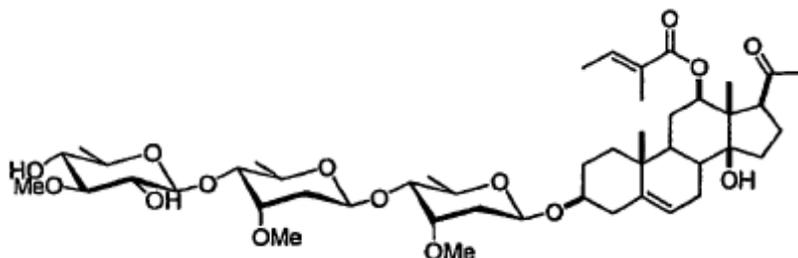
TABLA 6 Eficiencia de extracción del compuesto 1 obtenido en la extracción de material vegetal secado de *Hoodia gordonii* a varias temperaturas, presiones, tamaño de partícula de entrada con dióxido de carbono supercrítico en presencia o ausencia de co-solventes

Peso de la carga (g)	Tamaño del tamiz de pre-tratamiento (mm)	Temperatura (°C)	Presión (bar)	Presencia de co-solvente	Eficiencia de extracción del compuesto 1 (%)
85,02	2	80	300	Ninguno	59
84,92	1	80	300	Ninguno	63
84,41	0,7	80	300	Ninguno	70
42,08	2	80	300	Ninguno	62
85,76	1	80	300	5% EtOH	80
84,29	1	80	500	Ninguno	81
83,23	0,7	80	500	Ninguno	83
82,88	0,7	80	500	5% EtOH	88
83,86	0,7	80	500	Ninguno	78
84,08	0,7	80	500	5% EtOH	84
77,14	0,7	80	500	Ninguno	84
61,76	0,7	80	500	5% EtOH	84
59,34	0,7	100	500	Ninguno	84
78,33	0,7	80	500	5% EtOH	86
65,45	0,7	80	500	5% ETON	80

- 5 Lo anterior describe ampliamente sin limitación la presente invención. Las variaciones y modificaciones que serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia están destinadas a ser incluidas en el alcance de esta solicitud y de la patente(s) posterior(es).

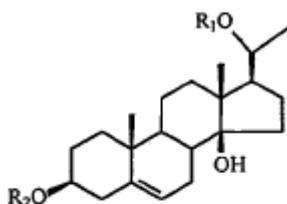
REIVINDICACIONES

1. Un método para separar selectivamente un glucósido esteroideo de fórmula 1



(1)

- 5 de uno o más glucósidos esteroideos seleccionados de entre los compuestos 3 a 13 definidos a continuación o entre otros compuestos presentes en el material vegetal de la familia Asclepiadaceae que contiene el mismo, comprendiendo el método poner en contacto el material vegetal o material derivado del mismo (en lo sucesivo denominado "el material", con dióxido de carbono líquido o supercrítico en condiciones en las que el glucósido esteroideo de fórmula 1 se disuelve en el dióxido de carbono líquido o supercrítico con preferencia a uno o más de los compuestos 3 a 13 u otros compuestos, y posteriormente recuperar el glucósido esteroideo de fórmula 1 de la solución de dióxido de carbono extraída sustancialmente exenta de cualquier componente del material con sabor
- 10 desagradable y sustancialmente exenta de uno o más compuestos de 3 a 13:



Compuesto	R ₁	R ₂
3	glu-glu-glu-	tig-the-ole-
4	glu-glu-	tig-mda-cym-
5	glu-glu-glu-	tig-cym-cym
6	glu-glu-glu-	tig-ole-cym-cym-cym
7	glu-glu-glu-	tig-ole-cym-
8	glu-glu-glu-	ang-mda-cym-
9	glu-glu-glu-	tig-the-cym-
10	glu-glu-glu-	tig-
11	glu-glu-glu-	tig-cym-
12	glu-glu-glu-	tig-the-ole-cym-
13	glu-glu-glu-	tig-the-cym-cym-

ole = oleandrosa, cym = cimmarosa, glu = glucosa, mda = 3-O-metil-6-desoxialosa, tig = tigloil, ang = angeloil, the = tevetosa.

- 15 2. Un método según la reivindicación 1, en el que la mayoría de ácidos grasos y otro material lipídico se extraen en una primera extracción utilizando dióxido de carbono líquido a una primera presión, seguido de la extracción del glucósido esteroideo de fórmula 1 utilizando dióxido de carbono supercrítico a una segunda presión mientras que se dejan los glucósidos esteroideos seleccionados de entre los compuestos 3 a 13 u otros compuestos con la matriz vegetal.
- 20 3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en el que se utiliza dióxido de carbono junto con una cantidad relativamente pequeña de uno o más co-solventes acuosos u orgánicos, en el que el co-solvente se utiliza en una cantidad inferior a aproximadamente el 10% en peso del dióxido de carbono.
4. Un método según la reivindicación 3, en el que el co-disolvente se selecciona de agua, metanol, etanol, hexano, heptano y cualquier mezcla o combinación de ellos.

5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el vegetal es una planta del género *Hoodia*.
6. Un método según la reivindicación 5, en el que la planta se selecciona de entre *Hoodia gordonii*, *Hoodia currorii* subsp. *currorii* y *Hoodia currorii* subsp. *lugardii*.
- 5 7. Un método según la reivindicación 6, en el que la planta es *Hoodia gordonii*.
8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el extracto producido inicialmente se somete a una o más extracciones posteriores utilizando uno o más disolventes orgánicos para eliminar los compuestos residuales no deseados.
- 10 9. Un método según la reivindicación 8, en el que uno o más disolventes orgánicos se selecciona de acetona, acetato de etilo, heptano, etanol, hexano y cualquier mezcla o combinación de los mismos.
- 10 10. Un método según la reivindicación 8, en el que uno o más disolventes orgánicos se selecciona de acetona, heptano y cualquier mezcla o combinación de los mismos.

