

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 772 049**

51 Int. Cl.:

A61K 8/97	(2007.01)
A61Q 17/02	(2006.01)
A01N 61/00	(2006.01)
A61K 36/75	(2006.01)
A01N 65/36	(2009.01)
A01N 65/00	(2009.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.05.2010 PCT/IB2010/001129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.11.2010 WO10131109**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2010 E 10774608 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 2429488**

54 Título: **Procedimiento de producción de un extracto derivado de las hojas de Swinglea glutinosa**

30 Prioridad:

15.05.2009 US 466801

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.07.2020

73 Titular/es:

**GOWAN CROP PROTECTION LIMITED (100.0%)
Highlands House Basingstoke Road, Spencers
Wood Reading
Berkshire, RG7 1NT, GB**

72 Inventor/es:

**TORO RESTREPO, JAIME;
ZAPATA PORRAS, SANDRA PATRICIA y
JIMÉNEZ MARTÍNEZ, JAMES ALBERTO**

74 Agente/Representante:

MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia

ES 2 772 049 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

5 Procedimiento de producción de un extracto derivado de las hojas de *Swinglea glutinosa*

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 ÁMBITO DE LA INVENCIÓN

15 La presente invención describe cómo obtener un extracto de hojas de *Swinglea glutinosa* y los usos no médicos del extracto de hojas de *Swinglea glutinosa*.

DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

20 ha descrito que los compuestos derivados de *Swinglea glutinosa* tienen múltiples usos beneficiosos.

Weniger B. et al. da a conocer posibles usos de alcaloides acridona de *Swinglea glutinosa* en contra *Plasmodium falciparum*, un protozoo que es la causa principal de la enfermedad de la malaria (véase Weniger B. et al., Alcaloides de acridona birreactiva de *Swinglea glutinosa*, J. Nat. Prod., 2001, 64 (9): 25 1221-3). Se da a conocer un alcaloide de acridona prenilado, 1,3,5-trihidroxi-2,8-bis (3-metilbut-2-enil)-10-metil-9-acridona, que se aisló del descortezado del pedúnculo de *Swinglea glutinosa* junto con tres alcaloides de acridona conocidos. Los alcaloides aislados se evaluaron in vitro frente a cloroquina sensible y resistente a cepas de *Plasmodium falciparum* y a la citotoxicidad utilizando células HeLa.

30 Braga P.A.C. y otros ilustran la actividad citotóxica de derivados de *Swinglea glutinosa* en contra de líneas de células cancerígenas (véase Braga P.A.C. y otros., Actividad Citotóxica in Vitro en varias líneas de Células Cancerígenas de Alcaloides Acridoneos y derivados de N-Feniletil-Benzamido de *Swinglea glutinosa*, Investigación de Productos Naturales, 2007, 21 (1):47-55).

35 Bueno-Sánchez J. G. et al. describen el potencial de los aceites esenciales de *Swinglea glutinosa* en contra Tuberculosis micobacteriana, el agente causante de tuberculosis (véase Bueno-Sánchez J. G. et al., Evaluación de la actividad antimicobacteriana de varias plantas aromáticas y medicinales que crecen en Colombia, Memorias del VI Encuentro Nacional de Investigación en Enfermedades Infecciosas, Asociación Colombiana de Infectología, 2008, página 96.).

40 Álvarez et. al, en "Control del moho en las rosas utilizando un extracto de plantas y fertilizantes foliares", Phytopathology, vol, 91, no. 6 Suplemento, junio de 2001 (2001-06), páginas S101-S102, & Reunión Conjunta de la Sociedad Americana de Fitopatología, la Sociedad Micológica de América, y la; Salt Lake City, Utah, Estados Unidos de América; 25-29 de agosto de 2001, ISSN: 0031-949XH, se refiere al uso de ciertos productos para controlar el moho en las rosas.

45 Nat. Pinchar. Res. 2007 enero; 21 (1): 47-55.; Braga PA1, Dos Santos DA, Da Silva MF, Vieira PC, Fernandes JB, Houghton PJ, Fang R., "Actividad de citotoxicidad in vitro en varias líneas celulares de alcaloides de acridona y derivados de N-feniletil-benzamida de *Swinglea glutinosa* (Bl.) Merr. "revela un conjunto de compuestos aislados, que fueron examinados por su actividad contra tres líneas celulares de 50 cáncer: carcinoma de pulmón humano (COR-L23), adenocarcinoma de mama humano (MCF7), melanoma humano (C32) y línea celular de pulmón fetal humano normal, MRC - 5. Las acridonas probadas exhibieron citotoxicidad débil pero las amidas mostraron actividad citotóxica moderada no selectiva.

55 En el Journal of Ethnopharmacology Volumen: 78, Número: 2-3, Páginas: 193-200, Publicado: DEC 2001; de: Weniger, B; Robledo, S; Arango, GJ; et al.; "Actividades antiprotozoarias de plantas colombianas" da a conocer las alternativas terapéuticas para la quimioterapia antiprotozoaria. Se realizó una selección de 44 plantas desde el oeste de Colombia y se examinaron los extractos polares y apolares de estas especies para medir su actividad antimalárica usando ensayos in vitro con dos clones de *Plasmodium falciparum*. La 60 actividad leishmanicida y tripanocida se determinó in vitro utilizando formas promastigotas y amastigotas de varias cepas de *Leishmania sp.*, y epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Entre las plantas seleccionadas, se encontró que la *Swinglea glutinosa* muestra una buena o muy buena actividad antiprotozoaria in vitro en células U-937 y se determinó la relación de citotoxicidad a actividad antiprotozoaria para los extractos 65 activos.

En el Journal of Agricultural and Food Chemistry, volumen: 57, número: 22, páginas: 10632-10635, publicado: 25 de noviembre de 2009; Purcaro, Raffaella; Schrader, Kevin K.; Burandt, Charles; et al.;

"Constituyentes algicidas de *Swinglea glutinosa*" se refieren al aislamiento y elucidación de la estructura de una nueva cumarina, dos cumarinas conocidas y nueve alcaloides de acridona de extractos de raíz de *S. glutinosa* y la evaluación de estos compuestos para la actividad algicida contra *Oscillatoria perornata*, una cianobacteria (un alga verde-azulada), común en los estanques de producción de bagre en Estados Unidos.

5

SUMARIO DE LA INVENCION

10 La invención de la presente solicitud consiste en un procedimiento estandarizado para obtener un extracto y el extracto de las hojas de *Swinglea glutinosa*, en donde el procedimiento produce una cantidad de extracto que es aproximadamente el 60% del peso de las hojas de la *Swinglea glutinosa*.

15 Más específicamente, la presente solicitud de invención se refiere a un extracto aislado de las hojas de *Swinglea glutinosa*, en donde el extracto se obtiene mediante un procedimiento que comprende:

20 A. Exponer hojas verde oscuro brillante de *Swinglea glutinosa* hojas en un ambiente seco, en donde las hojas están protegidas de la luz solar directa, en donde las hojas están expuestas a un flujo de aire.

B. Dejar las hojas en el entorno descrito en el punto A hasta que las hojas se vuelvan de un color verde opaco y las hojas sean quebradizas.

25 C. Romper las hojas en pequeños fragmentos.

D. Poner los fragmentos de hojas de *Swinglea glutinosa* en contacto con un solvente al menos una vez.

30 E. Repetir la etapa D hasta que el solvente se enriquece con las sustancias derivadas de los fragmentos de las hojas.

F. Retirar el disolvente para liberar el extracto.

35 En un aspecto, el extracto, obtenido mediante el procedimiento descrito en la presente solicitud de invención, se usa para matar hongos.

En otro aspecto, el extracto, descrito por el procedimiento de la presente solicitud de invención, se usa para matar insectos y ácaros.

40

En otro aspecto más, el extracto, desvelado por el procedimiento de la presente solicitud de invención, se usa para repeler insectos y ácaros.

45 La presente solicitud de invención describe un procedimiento para la producción de un extracto derivado de la planta de *Swinglea glutinosa*, en donde el procedimiento comprende:

50 A. Exponer hojas verde oscuro brillante de *Swinglea glutinosa* en un ambiente seco, en donde las hojas están protegidas de la luz solar directa, en donde las hojas están expuestas a un flujo de aire.

B. Dejar las hojas en el entorno descrito en el punto A hasta que las hojas se vuelvan de un color verde opaco y las hojas sean quebradizas.

55 C. Romper las hojas en pequeños fragmentos.

D. Poner los fragmentos de hojas de *Swinglea glutinosa* en contacto con un solvente al menos una vez.

60 E. Repetir la etapa D hasta que el solvente se enriquece con las sustancias derivadas de los fragmentos de las hojas.

F. Retirar el disolvente para liberar el extracto.

65 Los objetivos y ventajas de la presente solicitud de invención se harán más evidentes en la descripción detallada de la invención y las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 5 La presente invención describe un extracto aislado de las hojas de *Swinglea glutinosa*, en donde el extracto se obtiene mediante un procedimiento que comprende:
- 10 A. Exponer hojas verde oscuro brillante de *Swinglea glutinosa* en un ambiente seco, en donde las hojas están protegidas de la luz solar directa, en donde las hojas están expuestas a un flujo de aire.
- B. Dejar las hojas en el entorno descrito en el punto A hasta que las hojas se vuelvan de un color verde opaco y las hojas sean quebradizas.
- 15 C. Romper las hojas en pequeños fragmentos.
- D. Poner los fragmentos de hojas de *Swinglea glutinosa* en contacto con un solvente al menos una vez.
- 20 E. Repetir la etapa D hasta que el solvente se enriquece con las sustancias derivadas de los fragmentos de las hojas.
- F. Retirar el disolvente para liberar el extracto.
- 25 Según el procedimiento divulgado por la presente invención, las hojas están protegidas de cualquier manera posible de la exposición directa a la luz solar.
- De acuerdo con el procedimiento descrito por la presente invención, se descartan las hojas que se vuelven amarillentas en lugar de verde opaco. El período que tardan las hojas en convertirse en hojas quebradizas y en pasar de hojas verdes brillantes a hojas verdes opacas, depende de la exposición óptima al flujo de aire (aireación). Preferiblemente, la aireación ocurre a 25 °C, aunque los cambios de temperatura pueden cambiar el período de aireación, por ejemplo, pequeños aumentos de temperatura pueden acortar el período de aireación.
- 30 De acuerdo con el procedimiento divulgado por la presente invención, las hojas no deben romperse en fragmentos de hojas que tengan menos de 0,05 mm, ya que los fragmentos más pequeños tenderán a convertirse en una masa única, lo que se convertirá en una limitación para la extracción óptima con un disolvente.
- 40 Los fragmentos de hoja se exponen al contacto con el solvente recirculando el solvente a través del lecho donde están los fragmentos de hoja. Sin embargo, los fragmentos de la hoja podrían ser los que se mueven a través de un recipiente con solvente. En el primer caso, se requiere que después de cada vez que el solvente esté en contacto con los fragmentos de la hoja, se evapore [el solvente] en un espacio separado, manteniendo el extracto obtenido, luego el solvente vaporizado se vuelve a licuar y se reutiliza para nuevo ciclo.
- 45 Habrá tantos ciclos como sea necesario, hasta que no haya obtiene más extracto que mantener. Esto se logra cuando el peso restante de los fragmentos de masa de hojas es aproximadamente del 40% con respecto al peso de los fragmentos de hoja antes de la primera exposición al solvente. En otras palabras, el extracto obtenido constituye aproximadamente el 60% del peso inicial de los fragmentos de la hoja.
- 50 El solvente que se puede usar comprende etanol, metanol, hexano, propanol, isopropanol, CO₂, acetona, agua, acetato de etilo, acetato de nitrilo, tolueno, tetrahidrofurano, cloroformo, diclorometano y otros.
- 55 El extracto, obtenido mediante el procedimiento descrito por la presente invención de la solicitud, se puede usar para matar hongos.
- El extracto, obtenido mediante el procedimiento descrito por la presente solicitud de invención, se usa para matar insectos y ácaros.
- 60 El extracto, obtenido mediante el procedimiento descrito por la presente solicitud de invención, se usa para repeler insectos y ácaros.
- Además, la presente solicitud de invención describe un procedimiento para la producción de un extracto derivado de la planta *Swinglea glutinosa*, en donde el procedimiento comprende:
- 65 A. Exponer hojas verde oscuro brillante de *Swinglea glutinosa* en un ambiente seco, en donde

las hojas están protegidas de la luz solar directa, en donde las hojas están expuestas a un flujo de aire.

- 5 B. Dejar las hojas en el entorno descrito en el punto A hasta que las hojas se vuelvan de un color verde opaco y las hojas sean quebradizas.
- C. Romper las hojas en pequeños fragmentos.
- 10 D. Poner los fragmentos de hojas de *Swinglea glutinosa* en contacto con un solvente al menos una vez.
- E. Repetir la etapa D hasta que el solvente se enriquece con las sustancias derivadas de los fragmentos de las hojas.
- 15 F. Retirar el disolvente para liberar el extracto.

De acuerdo con la presente invención, el extracto de la hoja de *Swinglea glutinosa* se puede utilizar para matar hongos, en donde los hongos susceptibles comprenden:

20

Sphaerotheca pannosa
Botrytis sp.
Fusarium sp.
Colletotrichum sp.
25 *Uncinola necator*
Variola sp.
Peronospora sp.
Puccinia sp.
Cladosporium sp./Hetesporium sp.,
30 y otros.

En otro aspecto de la presente invención, el extracto se puede usar para matar insectos y ácaros, en donde los insectos y ácaros susceptibles comprenden:

35

Liriomyza sp
Tetranychus sp.
Boophilus microplus,
y otros.

40

En un aspecto adicional de la presente invención, el extracto se puede usar para repeler insectos y ácaros, en donde los insectos y ácaros susceptibles comprenden:

45

Liriomyza sp
Tetranychus sp.
Boophilus microplus,
y otros.

50

El extracto de la presente invención se puede combinar con alcanfor y aceites que se ya han sido descritos para matar hongos, matar y repeler insectos y ácaros, en donde los aceites mejorarían los efectos del extracto de la *Swinglea glutinosa* en contra de los hongos, insectos y ácaros, y en donde los aceites se pueden derivar del ajo, naranja, limón, lima, *Cymbopogon sp.*, *Eugenia caryophyllata*, *Eucalyptus sp.*, *Melaleuca alternifolia*, *Citrus simensis*, otras especies de citrus, canela y otros.

55

Los objetivos y las ventajas de la presente solicitud de invención se harán más evidentes en la descripción detallada de la invención y las reivindicaciones.

EJEMPLOS

60

Se recogieron ramas con hojas verdes oscuro y brillantes del árbol de *Swinglea glutinosa* y se colocaron bajo un techo a aproximadamente 25 °C, en un lugar donde había un flujo de aire natural.

65

Las ramas con hojas se movían periódicamente para garantizar la exposición de todas las hojas al flujo de aire. Después de aproximadamente tres días, las hojas que estaban secas y se volvieron de color verde opaco se recolectaron de las ramas, y dichas hojas ya secas y de color verde opaco se rompieron en fragmentos de no más de 0,05 mm con un molino de cuchillas.

5 Se colocaron aproximadamente 30 kilogramos de los fragmentos de las hojas en un tamiz de acero con aberturas en red de 0,05 mm. El recipiente que contenía el tamiz de acero que contenía los fragmentos de las hojas se llenó con una mezcla de 320 litros de etanol y 70 litros de agua durante aproximadamente 45 minutos. La mezcla de etanol-agua se retiró y el etanol-agua se vaporizó mediante calentamiento.

10 El extracto restante se guardó y el etanol-agua vaporizado se convirtió nuevamente en líquido en un espacio separado y cerrado mediante un condensador. La mezcla de etanol y agua se reutilizó para llenar el recipiente que contenía el tamiz de acero con fragmentos de hojas seis veces más, cada vez de 25 minutos a 35 minutos. La cantidad final de extracto obtenido fue de aproximadamente 18 litros, en donde el extracto era un material viscoso verde oscuro.

Se preparó una solución de 2 ml del extracto / litro de agua y se usó para el siguiente experimento:

15 Se propagó una cepa aislada de un hongo patógeno en un medio de cultivo adecuado para la cepa. Luego, se preparó una suspensión en agua a una concentración de 1×10^6 esporas/ml. Se preparó una placa con el medio de cultivo solamente y una placa con el medio de cultivo preparado con el extracto de 2 ml / litro de solución de agua. Ambas placas se bañaron con 20 μ l de la suspensión con esporas.

20 Después de la incubación de las placas durante 12 días a temperatura ambiente, se midió el porcentaje de inhibición para cada hongo con los siguientes resultados:

25	<i>Fusarium oxysporum</i>	72,20%
	<i>Botrytis cinerea</i>	80,70%
	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	68,40%
	<i>Colletotrichum sp.</i>	90,44%

30 Para la *Sphaerotheca pannosa* se aplicó una suspensión de esporas a las hojas de plantas de rosas sanas bañadas con el extracto de 2 ml / litro de solución de agua, y a las hojas de las plantas de rosas sanas sin bañar. Luego se observaron las hojas de ambas plantas de rosa n busca de la formación de pústulas de hongo después de 15 días. Hubo un 65,7% menos de formación de pústulas en las hojas de las plantas de rosa bañadas con el extracto de 2 ml / litro de la solución de agua.

35 Con respecto a la *Liriomyza sp.*, se realizó una prueba de repelencia comparando las hojas bañadas de las plantas de frijol con el extracto de 2 ml / litro de solución de agua y las hojas no bañadas de las plantas de frijol. Las plantas con las hojas bañadas y sin bañar se colocaron dentro de una jaula con *Liriomyza sp.* Después de 24 horas, los puntos de enfermedad causados por *Liriomyza sp.*, en hojas de ambas plantas se compararon. Las plantas con las hojas bañadas con los 2 ml del extracto / litro de solución de agua presentaron un 75,3% menos de puntos de enfermedad que las plantas con hojas sin bañar.

40 Con respecto al *Tetranychus sp.*, se realizó una prueba de repelencia comparando cortes en forma de discos de 5 mm hechos de las hojas de las plantas de frijol, en donde los discos de 5 mm de las hojas que se bañaron con los 2 ml del extracto / litro de solución de agua se compararon con los discos de 5 mm de las hojas sin bañar, y en donde un disco de 2 mm de una hoja sin bañar con ácaros de *Tetranychus sp.*, se colocaron sobre ambos discos de 5 mm de las de hojas. Después de 24 horas hubo un 78,4% menos de ácaros de *Tetranychus sp.*, en la parte superior de los discos de hoja de 5 mm bañados con los 2 ml del extracto / litro de solución de agua que en los discos de hoja de 5 mm sin bañar.

50 Con respecto al *Boophilus microplus* (garrapatas) se utilizó una solución de 5 ml del extracto / litro de agua en un experimento de mortalidad, en el que garrapatas adultas que se habían bañado con los 5 ml de solución de extracto / litro de agua y que regurgitaron, se compararon con las garrapatas sin bañar. Tanto las garrapatas bañadas como las garrapatas sin bañar se colocaron en una placa de Petri y se vigilaron. Después de tres días, hubo un 75% más de muertes entre las garrapatas que se habían bañado con los 5 ml del extracto / litro de solución de agua que entre las garrapatas sin bañar.

55

REIVINDICACIONES

5 1. Uso no medicinal de un extracto de las hojas de *Swinglea glutinosa* obtenidas mediante un procedimiento que comprende:

- 10 A. exponer hojas verde oscuro brillante de *Swinglea glutinosa* en un ambiente seco, en donde las hojas están protegidas de la luz solar directa, en donde las hojas están expuestas a un flujo de aire;
- 15 B. dejar las hojas en el entorno descrito en el punto A hasta que las hojas se vuelvan de un color verde opaco y las hojas sean quebradizas;
- 20 C. romper las hojas en fragmentos de al menos 0,05 mm;
- 25 D. poner los fragmentos de las hojas de *Swinglea glutinosa* en contacto con un solvente al menos una vez, en donde el solvente se selecciona de etanol, metanol, hexano, propanol, isopropanol, CO₂, acetona, agua, acetato de etilo, acetato de nitrilo, tolueno, tetrahidrofurano, cloroformo y diclorometano.
- E. repetir la etapa D hasta que el solvente se enriquece con las sustancias derivadas de los fragmentos de las hojas;
- F. retirar el disolvente para liberar el extracto;

para matar hongos.

30 2. Uso no medicinal de un extracto de las hojas de *Swinglea glutinosa* obtenidas mediante un procedimiento que comprende:

- 35 A. exponer hojas verde oscuro brillante de *Swinglea glutinosa* en un ambiente seco, en donde las hojas están protegidas de la luz solar directa, en donde las hojas están expuestas a un flujo de aire;
- 40 B. dejar las hojas en el entorno descrito en el punto A hasta que las hojas se vuelvan de un color verde opaco y las hojas sean quebradizas;
- 45 C. romper las hojas en fragmentos de al menos 0,05 mm;
- D. poner los fragmentos de las hojas de *Swinglea glutinosa* en contacto con un solvente al menos una vez, en donde el solvente se selecciona de etanol, metanol, hexano, propanol, isopropanol, CO₂, acetona, agua, acetato de etilo, acetato de nitrilo, tolueno, tetrahidrofurano, cloroformo y diclorometano.
- E. repetir la etapa D hasta que el solvente se enriquece con las sustancias derivadas de los fragmentos de las hojas;
- F. retirar el disolvente para liberar el extracto;

50 **para matar insectos y ácaros.**

3. Uso no medicinal de un extracto de las hojas de *Swinglea glutinosa* obtenidas mediante un procedimiento que comprende:

- 55 A. exponer hojas verde oscuro brillante de *Swinglea glutinosa* en un ambiente seco, en donde las hojas están protegidas de la luz solar directa, en donde las hojas están expuestas a un flujo de aire;
- 60 B. dejar las hojas en el entorno descrito en el punto A hasta que las hojas se vuelvan de un color verde opaco y las hojas sean quebradizas;
- C. romper las hojas en fragmentos de al menos 0,05 mm;
- 65 D. poner los fragmentos de las hojas de *Swinglea glutinosa* en contacto con un solvente al menos una vez, en donde el solvente se selecciona de etanol, metanol, hexano, propanol, isopropanol, CO₂, acetona, agua, acetato de etilo, acetato de nitrilo, tolueno, tetrahidrofurano, cloroformo y diclorometano.

- E. repetir la etapa D hasta que el solvente se enriquece con las sustancias derivadas de los fragmentos de las hojas;
- 5 F. retirar el disolvente para liberar el extracto;
para repeler insectos y ácaros.