



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 307 648**

51 Int. Cl.:
C07D 519/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01974534 .8**

96 Fecha de presentación : **15.10.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1326870**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.2003**

54 Título: **Método de extracción.**

30 Prioridad: **16.10.2000 GB 0025313**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es: **Neem Biotech Limited**
71 Heol y Coed, Rhiwbina
Cardiff CF14 6HR, GB

72 Inventor/es: **Williams, David, Michael y**
Pant, Chandra, Mohen

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 307 648 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

Método de extracción.

5 Esta invención se refiere a un método para tratar una muestra impura de azadiractina aislada de una fuente natural para incrementar su pureza.

10 La azadiractina A (normalmente denominada simplemente azadiractina) está presente en todo el nim (Azadirachta Indica) y en cantidades significativas de hasta 0,8% en las semillas y es bien conocida por sus propiedades beneficiosas potencialmente de amplio espectro, incluyendo propiedades insecticidas. Se ha encontrado que la azadiractina se presenta en varias otras plantas que incluyen el árbol del paraíso y el babul. Además, varios cientos de compuestos se han identificado en el nim, muchos estando presentes en las semillas incluyendo los 12 triterpenoides principales que incluyen nimbina, salanina y 3-tigloilazadiractol (también conocido como azaridactina B). Se ha observado que varios de estos compuestos tienen propiedades farmacéuticas insecticidas beneficiosas. La tabla al final de esta descripción
15 contiene una lista de los fitoquímicos de Azadirachta Indica y su localización (corteza, semillas, etc.).

20 Se conocen métodos en los que la semilla de nim (u otra fuente de azadiractina) se procesa, incluyendo etapas de extracción con disolvente para obtener un extracto sólido en bruto que contiene la azadiractina; típicamente tales procedimientos conocidos (por ejemplo, patente de EE.UU. N° 5856526) dan como resultado un producto que contiene normalmente hasta 15% de azadiractina y ocasionalmente 25-30%. Para aislar azadiractina A pura (por ejemplo, por encima de aproximadamente 90% de pureza), se usan normalmente métodos cromatográficos costosos. Como resultado, la azadiractina con una pureza de 80% se vende al por menor actualmente por aproximadamente 85.000 dólares de los EE.UU. de A. por gramo.

25 EP 0834254 A1 se refiere a una preparación de azadiractina, en forma de polvo sólido seco, que tiene una pureza de hasta 88%; teniendo un concentrado para emulsión hasta 30% en peso de azadiractina, y un procedimiento para preparar dicho polvo seco de azadiractina a partir de semillas/almendras de nim, que comprende: (a) desintegrar las semillas/almendras de nim en un polvo; (b) someter a dicho polvo a extracción continua usando metanol o metanol o etanol acuoso (alcohol rectificado) o etanol acuoso a temperatura ambiente; (c) concentrar el extracto y agitar el
30 concentrado con éter de petróleo o hexano y separar en fases mediante métodos convencionales; (d) agitar la fase más densa que contiene una cantidad principal de azadiractina con un disolvente orgánico inmiscible con agua y agua según se requiera, dependiendo del disolvente usado para la extracción, y separar en fases mediante métodos convencionales; (e) concentrar la fase orgánica y añadir gradualmente el concentrado a éter de petróleo o hexano bajo agitación a temperatura ambiente; (f) filtrar bajo succión y secar bajo vacío a una temperatura en el intervalo de 25-
35 65°C para obtener un extracto de semillas/almendras de nim como un polvo que tiene azadiractina de 10-19% de pureza; (g) redissolver el producto obtenido en la etapa (f) en un disolvente y añadir la solución a éter de petróleo o hexano a temperatura ambiente gradualmente bajo agitación dando un sólido blanco, que después de la filtración y el secado bajo vacío a 65°C da como resultado azadiractina que tiene 15-26% de pureza como un polvo blanco; (h) disolver la azadiractina (10-19%) procedente de la etapa (e) en un disolvente orgánico y someter a cromatografía en
40 columna (gel de sílice) mediante elución por etapas usando diferentes composiciones de hexano/éter de petróleo y acetato de etilo, conduciendo a polvo de azadiractina sólido de hasta 49%; (i) disolver la azadiractina que tiene hasta 49% de pureza en metanol, etanol o acetonitrilo y someterla a HPLC (columna C18) para producir azadiractina de una pureza de hasta 88% en forma de polvo sólido y (j) agitar el producto de la etapa (i) con disolventes y emulsionantes con o sin un agente sinérgico y un estabilizante UV para obtener el concentrado emulsionable.

45 La presente invención proporciona un nuevo procedimiento de extracción con disolvente por el que puede incrementarse la pureza de una muestra en bruto de azadiractina, potencialmente hasta una pureza por encima de 90%, sin la necesidad de recurrir a métodos cromatográficos. El procedimiento también puede permitir que los otros subproductos potencialmente valiosos, tales como nimbina, salanina y gedunina, asociados con las fuentes naturales de azadiractina sean concentrados y aislados.

50 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método no cromatográfico para tratar una fuente de azadiractina:

- 55 (a) disolviendo dicha fuente de azadiractina en un disolvente polar orgánico;
- (b) combinando la solución de la etapa (a) con un disolvente no polar orgánico para formar una única fase que contiene dichos disolventes y muestra disuelta;
- 60 (c) tratando dicha única fase de la etapa (b) con una solución salina acuosa para formar una fase acuosa y una fase que contiene el disolvente no polar orgánico; y
- (d) recuperando una u otra o ambas de la fase acuosa y la fase que contiene el disolvente no polar orgánico.

65 Cuando, como será normalmente el caso, la fase acuosa se recupera, puede tratarse para aislar un componente que contiene azadiractina de la misma. Alternativamente, según se describe con más detalle posteriormente, puede reunirse con lavados subsiguientes de la fase no polar orgánica reciclada y a continuación tratarse para separar el componente que contiene azadiractina de los mismos.

ES 2 307 648 T3

Se ha encontrado que, cuando una muestra en bruto de azadiractina se trata de acuerdo con este aspecto metodológico de la invención, se establece un equilibrio entre las fases orgánica y acuosa en las que la azadiractina A, D, H e I y, según se cree, también la gedunina se acumulan preferentemente como un material bien similar a jarabe o bien sólido (dependiendo de la fase de purificación) que se encuentra en la capa o fase acuosa de la etapa (c). La azadiractina B, la nimbina y la salanina se acumulan preferentemente en la capa no polar orgánica. Esto proporciona medios por los que los diversos compuestos de la muestra de partida pueden separarse entre sí y enriquecerse.

El método de la presente invención puede usarse para aislar uno cualquiera o más de los diferentes componentes de fuentes de azadiractina naturales tales como las semillas de nim. Aunque esto normalmente incluiría el aislamiento de la azadiractina A, que es un producto natural extremadamente valioso cuando está en forma pura, no es necesariamente el caso que la azadiractina A se aisle en todas las realizaciones de la invención; así, en algunas realizaciones de la invención, el método puede llevarse a cabo para aislar otros componentes de las semillas de nim.

En realizaciones preferidas del método de este aspecto de la invención, la fase orgánica no polar en la etapa (c) se recupera y se somete de nuevo al tratamiento de la etapa (c). Este tratamiento de la fase orgánica no polar con la solución salina acuosa puede repetirse varias veces hasta que no se observa más materia sólida que se acumula en la fase acuosa. Esto puede requerir, por ejemplo, hasta 10 ciclos, típicamente hasta 5 ciclos. El componente que contiene azadiractina puede aislarse de la fase acuosa al final de cada ciclo y combinarse; alternativamente, las fases acuosas recuperadas procedentes de cada ciclo pueden reunirse y, si se desea en esta fase, el componente que contiene azadiractina puede aislarse. Partiendo de una muestra de 30% de pureza y después de someter a ciclos de este modo, el producto sólido obtenido puede contener típicamente aproximadamente 45% de azadiractina A.

Cuando la muestra de partida tiene una concentración baja de azadiractina (por ejemplo, 5-10%), puede ser deseable, en lugar de reciclar la fase no polar orgánica, aislar la muestra que contiene azadiractina sólida de la fase acuosa y reciclar esta a través de las etapas de procesamiento (a)-(c). Esto puede llevarse a cabo varias veces hasta que la concentración de azadiractina en el material sólido alcanza una concentración de aproximadamente 40%.

La muestra que contiene azadiractina que se somete al método de la presente invención puede ser una que contiene al menos 10% de azadiractina, y así resulta de un procesamiento preliminar de la fuente natural (que puede contener cantidades variables de los diversos compuestos de interés dependiendo de la calidad de las semillas u otra fuente) para incrementar el contenido de azadiractina hasta ese nivel. Cuanto mejor sea la pureza de la azadiractina de partida, menos ciclos se requerirán para alcanzar un material de alta pureza. Pueden obtenerse buenos resultados usando, como el material de partida para el procedimiento de la invención, una muestra que contiene azadiractina en la que el contenido de azadiractina es del orden de 25-30%. Como una alternativa, se ha encontrado que el procedimiento de la presente invención puede usarse para purificar una muestra tomada directamente de las semillas de nim (u otra fuente primaria de azadiractina), es decir, sin procesamiento preliminar. Esto proporciona una alternativa valiosa al uso de las etapas de procesamiento preliminares convencionales y una fuente primaria de azadiractina.

Cuando se usa un método de extracción inicial convencional, la naturaleza precisa de este no es crucial para la presente invención, aunque se apunta que diferentes métodos de extracción iniciales dan como resultado diferentes concentraciones de los diversos compuestos de interés en el producto resultante. Un ejemplo de un método de procesamiento preliminar tiene las siguientes etapas:

1. Preparación de las semillas mediante secado al aire a la sombra y separación de las semillas de la pulpa. Es importante no secar a la luz solar completa ya que esto puede provocar la disociación de la azadiractina.
2. Trituración de las semillas secadas con un disolvente para retirar el aceite. Las semillas de nim pueden contener hasta 50% de aceite que deber retirarse usando un disolvente adecuado tal como hexano. El aceite de nim se separa del disolvente que se recupera y el aceite se guarda para la venta, el procesamiento adicional o la formulación.
3. Imbibición de la torta de semillas en un disolvente polar tal como metanol durante un período prolongado de hasta 24 horas sin la aplicación de calor y con agitación lenta. El uso de calor tiende a provocar la disociación de la azadiractina. Repítase la extracción tres veces para maximizar la cantidad de compuestos en el extracto.
4. Separación del líquido metanólico que contiene los compuestos útiles, incluyendo azadiractina, de la torta de semillas. La separación puede ser mediante cualquier medio adecuado incluyendo filtración bajo vacío.
5. Retírese hasta 80% del metanol bajo presión reducida para producir un jarabe espeso. Se añade a continuación agua al jarabe.
6. Añádase diclorometano en la relación de aproximadamente 4:3 partes de mezcla siruposa. Agítase durante hasta 45 minutos y a continuación déjese sedimentar en dos capas. La capa de diclorometano inferior se retira para el procesamiento adicional y la capa acuosa se trata con el mismo volumen de diclorometano en la relación 4:3. La extracción se completa al menos tres veces para asegurar la retirada completa de azadiractina del jarabe.

ES 2 307 648 T3

7. Todas las capas de diclorometano se combinan y se secan con un agente de secado adecuado tal como sulfato magnésico. El agente de secado se retira mediante filtración y el diclorometano se recupera. El extracto se trata con dos veces su peso de hexano para formar un precipitado, que se recupera mediante filtración. El precipitado contiene entonces típicamente aproximadamente 5%-15% de azadiractina.

5

En la etapa (a) del método del primer aspecto de esta invención, la muestra se disuelve en un disolvente polar orgánico. Ejemplos de disolventes adecuados incluyen acetona, metanol y etanol o mezclas de los mismos, prefiriéndose el metanol o la acetona. La cantidad de disolvente polar orgánico usada debe ser suficiente para disolver la muestra, pero por lo demás no es crítica. Se ha encontrado que una cantidad de 200 ml de disolvente por 100 g de muestra es satisfactoria cuando el disolvente es acetona o metanol. Típicamente, el material se añade al disolvente y se agita durante un tiempo suficiente (por ejemplo, 30 minutos) para disolver el material. Cualquier material que sea insoluble puede retirarse, por ejemplo mediante filtración.

10

La solución de la etapa (a) se combina a continuación con un disolvente no polar orgánico para formar una única fase que contiene dichos disolventes y el material disuelto. El disolvente no polar orgánico usado en esta etapa es preferiblemente un hidrocarburo halogenado, tal como tetracloruro de carbono, cloroformo o diclorometano. Sin embargo, también son factibles otros disolventes no polares, tales como tolueno. El disolvente no polar actualmente preferido es el tetracloruro de carbono. Puede emplearse una cantidad del disolvente no polar al menos igual a la cantidad del disolvente polar orgánico usada en la etapa (a). Son factibles relaciones de disolvente polar orgánico a disolvente orgánico no polar de hasta 1:20, pero se prefiere aproximadamente 1:2.

15

20

Típicamente, la única fase formada en la etapa (b) es de un color pardo a pardo oscuro, dependiendo de la pureza del material de partida.

25

En la etapa (c), la única fase de la etapa (b) se trata con una solución salina acuosa. A escala de laboratorio, esta etapa puede llevarse a cabo en un embudo separador para facilitar la separación de las fases. La solución debe mezclarse a fondo y a continuación dejarse separar para formar dos capas, una capa acuosa y una capa de disolvente no polar debajo. Una solución de material siruposo (dependiendo de la pureza de la muestra inicial) se separa en la capa acuosa.

30

Sales preferidas son aquellas que forman una solución que es de pH aproximadamente neutro (aproximadamente 6,5-7,5), ya que las soluciones salinas básicas o ácidas pueden tender a hacer que la azadiractina u otros componentes se descompongan. Sales preferidas son los haluros de metales alcalinos y metales alcalinotérreos solubles en agua, prefiriéndose particularmente el cloruro sódico. Preferiblemente, la solución salina no está saturada. Una solución que contiene entre aproximadamente 5% y saturada es satisfactoria, siendo óptima una concentración de aproximadamente 10%.

35

El volumen de solución salina con relación al volumen de la fase orgánica resultante de la etapa (b) puede variar de 1:1 a 15:1. Se prefiere una relación de 2:1 en volumen. La mezcla debe agitarse o mezclarse a fondo y a continuación dejarse reposar durante suficiente tiempo para alcanzar la separación, por ejemplo durante un período de tiempo del orden de 30 minutos, para producir dos capas. La capa superior es la capa salina acuosa y la capa inferior es la capa no polar orgánica. Las capas se separan y se prefiere que la capa no polar orgánica se someta a continuación a ciclos adicionales de tratamiento con solución salina hasta que no se observa la acumulación de más materia sólida en la fase acuosa, según se describe anteriormente. En el primer lavado con solución salina, aparece una sustancia siruposa parda oscura en la fase acuosa. Con ciclos repetidos esta se hace más blanca y menos siruposa y el volumen disminuye.

40

45

El componente que contiene azadiractina puede separarse de la fase acuosa cada ciclo o los lavados de solución salina acuosa pueden retenerse y combinarse y los sólidos recuperarse, por ejemplo mediante filtración. El sólido recuperado es normalmente un polvo amarillo/blanco y está enriquecido en azadiractina con relación al material de partida, por ejemplo hasta aproximadamente 45% de azadiractina.

50

La fase acuosa de cada ciclo, después de la retirada del componente que contiene azadiractina, puede recuperarse y retenerse para el procesamiento adicional para recuperar de la misma cualesquiera compuestos solubles en agua de interés.

55

La fase no polar orgánica puede retenerse y tratarse adicionalmente. Este material contiene 3-tigloilazadiractol (a veces conocido como Aza B), y también un número de los otros triterpenoides tales como nimbina y salanina, así como algunos otros compuestos.

60

Para incrementar aún más la pureza del componente que contiene azadiractina separado de la fase acuosa, el sólido recuperado puede someterse a al menos una ronda adicional del procedimiento de la presente invención. Pueden usarse disolventes iguales o diferentes en la ronda segunda y cualesquiera adicionales. Por ejemplo, en una realización, se han obtenido buenos resultados cuando, en la primera ronda, se usa metanol como el disolvente polar y, en la segunda ronda, se usa acetona como el disolvente polar.

65

Según se menciona previamente, el componente que contiene azadiractina aislado de la fase acuosa en el procedimiento de la invención contiene los compuestos azadiractina A, D H e I. Para purificar este componente más, el

ES 2 307 648 T3

sólido puede disolverse en un primer disolvente en el que son solubles diversos compuestos, por ejemplo cloroformo o acetato de etilo. Puede emplearse la cantidad mínima para disolver completamente el material sólido. Se añade a esta solución un segundo disolvente que se combina con el primer disolvente a fin de dar un precipitado de los compuestos disueltos distintos de la azadiractina A. Así, cuando el primer disolvente es cloroformo, el segundo disolvente puede ser éter, por ejemplo en la relación de aproximadamente 1:3. Cuando el primer disolvente es acetato de etilo, el segundo disolvente puede ser hexano. Los disolventes primero y segundo son preferiblemente disolventes de bajo punto de ebullición de modo que pueden retirarse a una temperatura relativamente baja que no descomponga ninguno de los compuestos valiosos separados. Se forma un sólido de amarillo a blanco que contiene principalmente azadiractina D, H e I, junto con algo de azadiractina A. Si se requiere, este material puede retenerse para la separación adicional de estos triterpenoides. La capa de cloroformo/éter (u otra combinación de disolvente primero y segundo) contiene la mayoría de la azadiractina A de la que puede aislarse. Por ejemplo, el éter puede retirarse de la mezcla y el cloroformo reducirse hasta aproximadamente 20% de su volumen original. Los disolventes pueden recuperarse para la reutilización. Puede añadirse a la solución concentrada tres veces el volumen de un disolvente en el que la azadiractina A es insoluble y de bajo punto de ebullición, tal como hexano, pentano o heptano, lo más preferiblemente hexano, para producir un sólido blanco que puede contener aproximadamente 70% de azadiractina A. El filtrado rico en hexano puede recuperarse y recircularse.

La capa no polar orgánica que puede recuperarse en la etapa (c) del procedimiento de la invención contiene principalmente la azadiractina B con algo de azadiractina A, salanina, nimbina y otros compuestos similares. Por ejemplo, esta capa puede tratarse para retirar al menos 50% del disolvente orgánico bajo presión reducida, y a continuación tratarse con un volumen igual de hexano. La mayoría de la azadiractina A y algo de la azadiractina B se precipita, mientras que el filtrado contiene la mayoría de la azadiractina B y otros compuestos.

En todas las fases los compuestos se reparten selectivamente entre las dos capas. El reprocesamiento repetido de los compuestos sometidos a reparto hace que los compuestos se concentren dando purezas por encima de 60% para los compuestos elegidos individuales de interés.

En todas las fases, las diversas fracciones y disolventes se reciclan o recuperan para reutilización reduciendo así el coste global de la extracción y la purificación.

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, pueden producirse cantidades grandes de azadiractina A pura, lo que hasta ahora resultaba imposible. Así, de acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un envase que contiene al menos 10 g de azadiractina A que tiene una pureza de al menos 50%. Puede emplearse cualquier envase adecuado para el producto de azadiractina A, tal como bolsas de plástico y tubos de vidrio o plástico. Preferiblemente, la azadiractina en el envase tiene una pureza de al menos 70%, preferiblemente al menos 90%. El envase puede contener al menos 100 g de la azadiractina A pura, preferiblemente al menos 1000 g de azadiractina A.

La invención se ilustrará ahora por medio del siguiente ejemplo no limitativo.

Ejemplo

Este ejemplo describe los métodos y las técnicas usados para purificar azadiractina A y B de una muestra de azadiractina industrial con una concentración inicial de 30% de azadiractina. El ejemplo se empleó basándose en una muestra de 200 gramos.

Etapa 1

Pésense exactamente 200 g de azadiractina de calidad industrial, análisis 33% de azadiractina A.

Etapa 2

Disuélvanse en 400 ml de metanol a temperatura ambiente, 18°C, agítense hasta que se disuelvan completamente, lo que en este ejemplo lleva aproximadamente 15 minutos.

Etapa 3

Cuando estaban completamente disueltos y mientras todavía se agitaba, se añadieron 800 ml de tetracloruro de carbono (relación de 2:1 con respecto al metanol). La mezcla se agitó durante 10 minutos adicionales.

Etapa 4

Se añadieron 200 ml de salmuera al 10% y se agitaba tan rápidamente como era posible usando un agitador elevado. Se formaba material sólido en la capa de salmuera. Se dejó que el líquido se separara en dos capas siendo la capa inferior la capa de tetracloruro de carbono. Las dos capas se separaron usando un embudo separador y la capa de

ES 2 307 648 T3

salmuera se filtró para retirar el precipitado. Este precipitado se secó bajo vacío hasta peso constante, habitualmente aproximadamente 2 horas. El peso obtenido era 80 gramos. Se preparó una muestra para análisis pesando 19 mg del precipitado y disolviendo en 19 ml de acetonitrilo (1:1). Se diluyeron 100 μ l de la solución con 5 ml de agua de calidad para HPLC. La muestra se analizó mediante HPLC para dar un contenido de azadiractina A de 56%.

5

Etapa 5

200 ml adicionales de la solución de salmuera se añadieron a la capa de tetracloruro de carbono separada y el líquido se agitó rápidamente como antes. Se formaba un precipitado adicional en la capa de salmuera que se recuperaba como previamente. El precipitado se reduce a un volumen con cada lavado y su color cambia de amarillo a blanco. El ciclo se repite hasta que no aparece más precipitado. Esto lleva habitualmente de 4 a 5 lavados. La capa de tetracloruro de carbono se retuvo para tratamiento adicional. Esta capa contenía la azadiractina B. Los lavados de salmuera contenían 21 gramos de sólido que tenía un contenido de azadiractina de 56%.

15

Etapa 6

El procedimiento se repitió una tercera vez mediante la adición de 200 ml adicionales de salmuera a la capa de tetracloruro de carbono residual de la etapa 5. El sólido formado era de 46 gramos y se encontró que tenía un contenido de azadiractina A de 69%.

20

Etapa 7

El procedimiento se repitió una cuarta vez mediante la adición de 200 ml adicionales de salmuera a la capa de tetracloruro de carbono residual de la etapa 6. El sólido formado era de 13 gramos teniendo un contenido de azadiractina A de 58%.

25

30

Etapa 8

El procedimiento se repitió una quinta vez con la adición de 200 ml de salmuera a la capa de tetracloruro de carbono residual de la etapa 7. No se obtenía más sólido. La capa de tetracloruro de carbono se secó con $MgSO_4$, se filtró, se redujo hasta 1/3 de su volumen y se añadió tres veces el volumen de hexano. Se formaba un sólido amarillo claro que pesaba 12,3 gramos. El análisis de esta muestra daba azadiractina B en 46% y azadiractina A en 26%.

35

Etapa 9

Todos los lavados de agua de salmuera se combinaron y se añadieron 500 ml de cloroformo. La mezcla resultante se agitó o se mezcló de otro modo y a continuación se dejó separar. La capa de cloroformo se separó, se secó con $MgSO_4$ y el cloroformo se recuperó hasta 1/3 del volumen. Se añadió hexano dando un sólido que se retiró mediante filtración. El sólido proporcionaba 15 gramos, dando 53% de contenido de azadiractina A y 7% de azadiractina B.

40

45

Este era el final de la primera "vuelta".

Etapa 10

El sólido procedente de los cuatro primeros lavados de salmuera se añadió conjuntamente para dar un peso total de 160 gramos. Esto se disolvió en 320 ml de acetona y se agitó hasta que se disolvía completamente. Después de 15 minutos, se añadieron 740 ml de CCl_4 y se agitó. La solución resultante se lavó con 640 ml de salmuera al 10% en cuatro partes de 160 ml cada una.

50

55

Etapa 11

Como con la adición inicial de salmuera, se formaba sólido en la capa de salmuera que se separaba y se secaba como previamente. El primer lavado daba 280 gramos de un contenido de azadiractina A de 83%.

60

Etapa 12

El segundo lavado con 160 ml de salmuera producía 4 gramos de sólido que tenía un contenido de azadiractina A de 65%.

65

ES 2 307 648 T3

Etapa 13

El lavado se repitió como previamente y el sólido se separó y se secó para dar un peso de 6,6 gramos y un contenido de azadiractina A de 49%.

Etapa 14

El cuarto lavado daba un jarabe en vez de un sólido. Este se disolvía en un mínimo de cloroformo y hexano añadidos para dar un sólido blanco y un jarabe amarillo. El sólido blanco se filtró para dar 18 gramos de producto que contenía un contenido de azadiractina A de 40% y de azadiractina B de 30%. El sólido se separó y se secó para dar 10 g de un producto sólido (azadiractina A 57%).

El peso total recuperado en este punto era 142 gramos.

Etapa 15

Las muestras de las etapas 11 en adelante se combinaron y se disolvieron en cloroformo al que se añadía a continuación éter para formar un sólido. Esto se retiró mediante filtración y secado para dar 28 gramos de producto.

Etapa 16

El éter se retiró del filtrado mediante vacío y se añadieron cinco veces el volumen de hexano. Se obtuvo un sólido blanco rico en azadiractina A (azadiractina A, 40 g, pureza 70%). El filtrado se trató para precipitar 12 g de material de azadiractina B. Los diversos lavados se combinaron y se obtuvieron 18 g de un precipitado que contenía azadiractina A y azadiractina B.

Los 28 gramos de azadiractina A de más de 80% de pureza procedentes de la etapa 15 se retuvieron y las diversas fracciones con un contenido inferior de azadiractina se recircularon añadiendo material de calidad industrial reciente y se reprocesaron. De este modo, la concentración de la azadiractina A se incrementaba hasta que alcanzaba el nivel requerido. De forma similar a la azadiractina B, esto se reciclaba hasta que se obtenía la concentración requerida.

El extracto de semillas de nim contiene muchos compuestos diferentes además de la azadiractina A y B. Estos incluyen azadiractina D, H, I, nimbina y salanina. El procedimiento concentra algunos de estos compuestos en la capa de salmuera y algunos en la capa de tetracloruro de carbono, permitiendo su separación y purificación.

TABLA

<u>1-TIGLOIL-3-ACETIL-11-METOXI-AZADIRACTINA</u>	Corteza
<u>1-ALFA-METOXI-1,2-DIHDROAZADIRADIONA</u>	Semilla
<u>1BETA, 2BETA-DIEPOXI-AZADIRADIONA</u>	Semilla
<u>3-ACETIL-7-TIGLOIL-LACTONA-VILASININA</u>	Hoja
<u>3-DESACETIL-3-CINAMOIL-AZADIRACTINA</u>	Hoja
<u>3-DESACETILSALANINA</u>	Hoja
<u>3-DESACETILSALANINA</u>	Semilla

ES 2 307 648 T3

TABLA (continuación)

5	<u>3-TIGLOILAZADIRACTOL</u>	Semilla
	<u>4-EPINIMBINA</u>	Semilla
10	<u>4ALFA, 6ALFA-DIHIDROXI-A-HOMO-AZADIRADIONA</u>	Hoja
	<u>6-ACETIL-NIMBANDIOL</u>	Semilla
	<u>6-DESACETILNIMBINENO</u>	Corteza
15	<u>6-DESACETILNIMBINENO</u>	Hoja
	<u>6-DESACETILNIMBINENO</u>	Semilla
	<u>6-O-ACETIL-NIMBANDIOL</u>	Planta
20	<u>7-ACETILNEOTRICHILENONA</u>	Semilla
	<u>7-DESACETIL-7-BENZOIL-AZADIRADIONA</u>	Semilla
25	<u>7-DESACETIL-7-BENZOILEPOXI-AZADIRADIONA</u>	Semilla
	<u>7-DESACETIL-7-HIDROXI-AZADIRADIONA</u>	Fruto
30	<u>7-DESACETIL-GEDUNINA</u>	Semilla
	<u>17-BETA-HIDROXIAZADIRDIONA</u>	Semilla
35	<u>17-EPIAZADIRADIONA</u>	Semilla
	<u>22,23-DIHIDRO-23BETA-METOXI-AZADIRACTINA</u>	Semilla
	<u>ÁCIDO ARAQUÍDICO</u>	Fruto
40	<u>ASH</u>	Fruto
	<u>ASH</u>	Hoja
45	<u>AZADIRACTINA</u>	Hoja
	<u>AZADIRACTINA-A</u>	Hoja
	<u>AZADIRACTINA</u>	Semilla
50	<u>AZADIRACTOL</u>	Fruto
	<u>AZADIRADIONA</u>	Semilla
55	<u>AZADIRONA</u>	Semilla
	<u>ÁCIDO BEHÉNICO</u>	Fruto
60	<u>BETA-SITOSTEROL</u>	Flor
	<u>BETA-SITOSTEROL</u>	Hoja
	<u>CALCIO</u>	Fruto
65	<u>CALCIO</u>	Hoja

ES 2 307 648 T3

TABLA (continuación)

5	<u>CARBOHIDRATOS</u>	Fruto
	<u>CARBOHIDRATOS</u>	Hoja
	<u>DESACETILNIMBINA</u>	Corteza del Tronco
10	<u>EO</u>	Corteza del Tronco
	<u>EPOXIAZADIRADIONA</u>	Semilla
15	<u>GRASA</u>	Fruto
	<u>GRASA</u>	Fruto
	<u>GRASA</u>	Semilla
20	<u>FIBRA</u>	Hoja
	<u>GEDURNINA</u>	Semilla
25	<u>HIPERÓSIDO</u>	Hoja
	<u>ISOAZADIROLIDA</u>	Hoja
	<u>ISOMARGOSINOLIDA</u>	Planta
30	<u>ISONIMBINOCINOLIDA</u>	Planta
	<u>ISONIMBINOLIDA</u>	Corteza del tronco
35	<u>ISONIMBOCINOLIDA</u>	Hoja
	<u>ISONIMOLICINOLIDA</u>	Fruto
40	<u>KAEMPFEROL</u>	Flor
	<u>ÁCIDO LIGNOCÉRICO</u>	Fruto
	<u>ÁCIDO LINOLEICO</u>	Fruto
45	<u>MAGNESIO</u>	Fruto
	<u>MAGNESIO</u>	Hoja
50	<u>MARGODUNOLIDA</u>	Planta
	<u>MARGOSINA</u>	Corteza del tronco
55	<u>MARGOSINOLIDA</u>	Planta
	<u>MELDENINA</u>	Semilla
	<u>MELIANTRIOL</u>	Semilla
60	<u>MIRICETINA</u>	Flor
	<u>ÁCIDO MIRÍSTICO</u>	Fruto
65	<u>NIMBAFLAVONA</u>	Hoja

ES 2 307 648 T3

TABLA (continuación)

5	<u>NIMBANDIOL</u>	Hoja
	<u>NIMBANDIOL</u>	Tronco
	<u>NIMBIDINA</u>	Semilla
10	<u>NIMBIDINA</u>	Corteza del tronco
	<u>NIMBINA</u>	Corteza del tronco
15	<u>NIMBINENO</u>	Corteza
	<u>NIMBINENO</u>	Hoja
	<u>NIMBINENO</u>	Corteza
20	<u>NIMBININA</u>	Corteza del tronco
	<u>NIMBINONA</u>	Corteza del tronco
25	<u>NIMBIOL</u>	Corteza
	<u>NIMBIONA</u>	Corteza del tronco
30	<u>NIMBOCINOLIDA</u>	Planta
	<u>NIMBOCINOMA</u>	Planta
	<u>NIMBOLIDA</u>	Hoja
35	<u>NIMBOLINA-A</u>	Tronco
	<u>NIMBOLINA-B</u>	Tronco
40	<u>NIMBOSTEROL</u>	Corteza del tronco
	<u>NIMOCINOL</u>	Fruto
45	<u>ÁCIDO NIMOLICINOICO</u>	Fruto
	<u>NIMOLICINOL</u>	Semilla
	<u>NIMOLINONA</u>	Fruto
50	<u>NONACOSANO</u>	Flor
	<u>ÁCIDO OLEICO</u>	Fruto
55	<u>ÁCIDO PALMÍTICO</u>	Fruto
	<u>FÓSFORO</u>	Fruto
	<u>FÓSFORO</u>	Hoja
60	<u>PROTEÍNA</u>	Fruto
	<u>PROTEÍNA</u>	Hoja
65	<u>QUERCETINA</u>	Flor

ES 2 307 648 T3

TABLA (continuación)

5	<u>QUERCETINA</u>	Hoja
	<u>QUERCITRINA</u>	Hoja
	<u>RESINA</u>	Semilla
10	<u>RUTINA</u>	Hoja
	<u>SALANINA</u>	Semilla
15	<u>SALANOLIDA</u>	Planta
	<u>ESCOPOLETINA</u>	Planta
20	<u>ÁCIDO ESTEÁRICO</u>	Fruto
	<u>SUGIOL</u>	Corteza
	<u>AZUFRE</u>	Semilla
25	<u>TANINA</u>	Corteza del tronco
	<u>VEPININA</u>	Semilla
30	<u>VALSANINA</u>	Hoja

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método no cromatográfico para tratar una fuente de azadiractina:

- 5 (a) disolviendo dicha fuente de azadiractina en un disolvente polar orgánico;
- (b) combinando la solución de la etapa (a) con un disolvente no polar orgánico para formar una única fase que contiene dichos disolventes y muestra disuelta;
- 10 (c) tratando dicha única fase de la etapa (b) con una solución salina acuosa para formar una fase acuosa y una fase que contiene el disolvente no polar orgánico; y
- (d) recuperando una u otra o ambas de la fase acuosa y la fase que contiene el disolvente no polar orgánico.

15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que tanto la fase acuosa como las fases no polares orgánicas se recuperan y la fase no polar orgánica recuperada se trata de acuerdo con las etapas (c) y (d) de la reivindicación 1.

20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el reciclado de la fase no polar orgánica se lleva a cabo una pluralidad de veces.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la fase acuosa en cada ciclo se recupera y a continuación se reúne con cada una de las otras antes del aislamiento de un producto sólido procedente de las mismas.

25 5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el disolvente polar orgánico en la etapa (a) se selecciona de acetona, metanol y etanol o mezclas de los mismos.

6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el disolvente no polar orgánico usado en la etapa (b) es un hidrocarburo halogenado o tolueno.

30 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el disolvente no polar orgánico es tolueno, tetracloruro de carbono, cloroformo o diclorometano.

8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la única fase de la etapa (b) se trata con una solución salina acuosa no saturada.

35 9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la solución salina acuosa es una solución de una sal que forma una solución que es de pH aproximadamente neutro.

40 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la sal se selecciona de haluros de metales alcalinos y metales alcalinotérreos solubles en agua.

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la sal es cloruro sódico.

45 12. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la solución salina contiene al menos aproximadamente 5% en peso de sal.

50

55

60

65