

AÑO 1958

Expediente núm.



242539

# REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL

**PATENTE DE INVENCIÓN**

**MEMORIA DESCRIPTIVA**

*que se acompaña a la solicitud de*

una **PATENTE DE INVENCIÓN** por VEINTE años, en España

*a favor de*

FIRMA A. NATTERMANN & CIE, de nacionalidad  
alemana domiciliado en Eupener Strasse 159 a.  
ciudad de Köln-Braunsfeld, Alemania.

*por:*

UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE FOSFOLÍPIDOS  
NATURALES"

Nº 8398

Agente Sr. ELZABURU

50 JUN 1958

P.- 17.120.-

N 1/217



242539

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de FIRMA A. NATTERMANN & CIE., entidad alemana, establecida en Eupener Strasse 159 a, Köln-Braunsfeld, Alemania, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE FOSFOLIPIDOS NATURALES".

---

La invención se refiere a un procedimiento para la obtención de fosfolípidos naturales a partir de fosfátidos brutos vegetales, especialmente de los que se preparan a partir de habas de soja por los procedimientos conocidos. Como es sabido, los

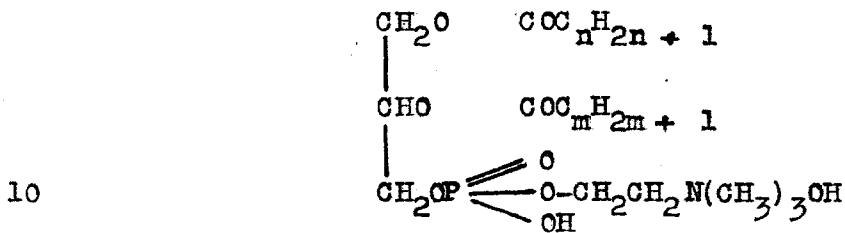
5 ésteres diglicéridos del ácido colín-fosfórico y colamin-fosfórico, son representantes de los ésteres-fosfátidos que están muy repartidos en el reino animal y en el reino vegetal. Puede verse, a este respecto, por ejemplo, el libro de Paul Karrer, Lehrbuch der organischen Chemie, 1950, página 247. Estos ésteres

10 se presentan siempre mezclados, especialmente en los fosfátidos brutos de origen vegetal. En el comercio y en la técnica se conocen estas mezclas de sustancias con el nombre de lecitina. De acuerdo con la nomenclatura química, se sobrentien-

242539

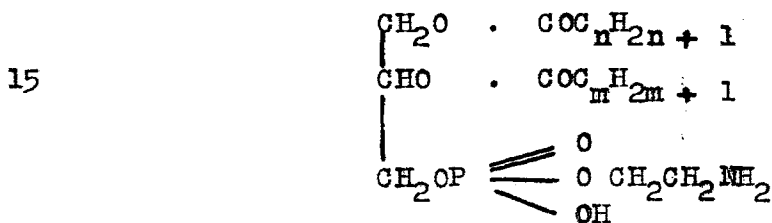


den, desde luego, con el nombre de lecitina, o bien lecitinas, solamente los representantes de la clase de los fosfátidos que llevan colina como grupo básico. Cuando el componente básico es la colamina, el nombre químico correspondiente es el de cefalina. (ver Karrer, loc. cit. página 247). Los ésteres-fosfátidos presentan la siguiente fórmula estructural:



lecitina

(ester diglicérido del ácido colinfosfórico)



Cefalina

20 (Ester diglicérido de ácido colamin-fosfórico)

Como los restos de ácido graso cambian, existen varias lecitinas y varias cefalinas.

Se ha encontrado que, en ciertas condiciones, se pueden obtener fosfolípidos naturales, a partir de fosfátidos brutos de origen vegetal, especialmente también a partir de fosfátido bruto de soja, en los cuales los ésteres diglicéridos de ácido colin-fosfórico predominan, o bien están constituidos exclusivamente por ésteres diglicéridos de ácido colinfosfórico, y, además, presentan un contenido elevado en ácidos grasos esenciales que, por su parte, tienen una importancia decisiva adi-

25

30

2 42539



cional sobre la actividad médico-terapéutica de esta clase de cuerpos biológicamente importantes.

Se ha encontrado además que los ésteres diglicéridos de ácido colin-fosfórico obtenidos de acuerdo con el procedimiento de la invención, se pueden desdoblar enzimáticamente, por 5 tratamiento con veneno de serpientes, siendo atacados y escindidos, por el veneno de las serpientes, los ácidos grasos que se encuentran en la posición alfa, de manera que resultan ésteres colínicos del ácido monoglicérido-fosfórico, que llevan 10 el nombre de lisolecitina, que presentan, lo cual es sorprendente, todavía ácidos grasos esenciales, poli-insaturados, en la posición beta, siendo esto de considerable importancia desde el punto de vista fisiológico y medicinal.

Con arreglo a la terminología médica actual, se comprenden 15 bajo el nombre de ácidos grasos esenciales, de un modo general, los ácidos grasos necesarios para la vida, que no pueden ser sintetizados por el organismo. Se trata de ácidos grasos poli-insaturados, de configuración muy determinada, entre los cuales, el ácido linólico ocupa una posición clave para el 20 organismo humano, ya que, partiendo de dicho ácido, puede formarse en el organismo, por ejemplo, el ácido araquidónico, que es un ácido esencial, muy activo, es decir, un ácido C<sub>20</sub> tetraénico. Con respecto a la importancia que tienen los ácidos grasos esenciales para el organismo humano, citaremos brevemente, 25 a manera de ejemplo, las siguientes publicaciones, entresacadas de la multitud de datos existentes en la bibliografía:

Rieckehoff y colaboradores (Arch. Biochem. 25, 1-12, 1950) encontraron, en ensayos con animales, que, en el caso de una dieta concarencia de grasa, era suficiente ya una pequeña cantidad 30 de ácido linólico para que el organismo sintetizase ácido ara-

242539



quidónico.

Schulz (Medizin. 29/30, VII, 1007, 1954), comprobó que, en los casos de enfermedades agudas de parénquima del hígado, se acortaba la duración de la enfermedad suministrando ácidos grasos poli-insaturados. También en el caso de hepatopatías crónicas, se ha señalado un éxito claro.

Allegri (Arch. Sc. med. Torino, 97, 6, 1954) demostró, en experimentos con animales, que, en comparación con animales de control, ratas parcialmente hepatectomizadas, que habían sido alimentadas con ácidos grasos insaturados, presentaban una regeneración más rápida del hígado que les quedaba - medida por el peso y por el cuadro histológico - (fuerte actividad cariocinética) y aumento considerable del diámetro nuclear.

Knipping (Munch. med. Wschr. 97, 28, VII, 901, 1955) demostró que los ácidos grasos poli-insaturados eran capaces de acortar las hepatopatías ligeras y de gravedad media, y sobre todo, la fase, sobre la que es tan difícil influir, entre hepatopatía y recuperación. En ensayos con animales, se regenera el engorde del lóbulo y aumenta la acumulación de glicógeno en el hígado. Además, la secreción de la bilis resulta excitada y disminuye el cuadro de ácido pirúvico.

Según Schettler, los ácidos grasos esenciales poli-insaturados, no solamente ejercen una acción lipotrópica, sino que también manifiestan una acción favorable sobre la síntesis de glicógeno.

En relación con la importancia que corresponde a los fosfolípidos que llevan colina, en general, y a los ácidos grasos esenciales, especialmente para la medicina, el inventor se ha planteado la misión de obtener, partiendo de fosfátidos brutos

242539



de procedencia vegetal, preferiblemente de fosfátidos brutos de soja, preponderantemente, o de modo exclusivo, esteres colínicos del ácido diglicérido-fosfórico, que tienen un contenido máximo posible en ácidos grasos esenciales. La invención  
5 tiene, pues, por objeto principal, la elaboración de fosfátidos vegetales, especialmente de fosfátidos brutos de soja, de tal manera que, por un lado, se mantengan los ácidos grasos esenciales contenidos en los ester-fosfátidos en estado natural, es decir, que se pueden revalorizar en el más alto grado  
10 apetecido, pero, por otro lado, separar del modo más completo posible la máxima cantidad de muchas de las sustancias acompañantes, entre las cuales figuran también todos los ester-fosfátidos, que no presentan colina como componente básico. Según esto, la invención se refiere a un procedimiento para la  
15 preparación de fosfolípidos naturales con un contenido elevado en ácidos grasos esenciales y colina, así como al producto mismo obtenido de acuerdo con este procedimiento.

La invención tiene por objeto, además, la preparación de un fosfolípido neutro, con un contenido elevado en ácidos grasos esenciales, que esté constituido de un modo prácticamente  
20 exclusivo, por colin-esteres del ácido diglicérido fosfórico y que pueda considerarse como puro desde el punto de vista químico, porque los fosfolípidos que contienen todavía ciertas impurezas no compatibles con el plasma, especialmente el ester diglicérido del ácido colaminfosfórico (= cefalina), no son adecuados para aplicación por vía intravenosa. Sobre esta cuestión  
25 se encuentran los siguientes datos en la bibliografía.

O'Brien publicó en Lancet 271, 232 (1956), investigaciones sobre sustancias que favorecen la coagulación de la sangre.  
30 Se buscaba una relación entre la aparición frecuente de trombo-

242539



sis coronaria y la alimentación modificada, rica en grasas, de los últimos 50 años. El autor ha podido demostrar que, no solamente las grasas sino, en escala mucho más intensa, ciertos fosfolípidos, a saber, fosfatidil-etanolamina (= cefalina) aceleran los procesos de coagulación. En ensayos de alimentación con diferentes tipos de grasas y cefalina, se demostró que la coagulación se modifica con la máxima intensidad después de la cefalina.

Summer y Summer (J. of. Biol. Chem. 134, 531 (1940), han descrito un fermento que existe en la soja (peróxidasa), el cual, en presencia de  $H_2O_2$ , es capaz de oxidar los ácidos grasos insaturados. Este fermento posee, según Mitchlin y Pschenova (Biochimija, 11, 437, 1946) enlaces insaturados, en los que puede fijarse oxígeno de una manera lábil. Las investigaciones de Kamaljan (Biochimija, 16, 396, 1951), pusieron de manifiesto que la adición de colamina rebaja la fijación de oxígeno del fermento, y que también inhibe la decoloración peroxidásica de carotenoides. También el oleato de colamina inhibe la actividad de la peroxidasa.

Igualmente, Sinclair señaló, en su conferencia, presentada en el Simposio sobre la biología de la vejez, celebrado en septiembre de 1956, en Londres, que la elevada coagulabilidad de la sangre puede ser ocasionada por una mayor concentración de fosfátido de etanolamina.

La invención, finalmente, tiene por objeto desdoblar, a partir de los ésteres diglicéridos de ácido colínfosfórico, los ácidos grasos que se encuentran en posición alfa. Los esteres colínicos de ácido monoglicérido-fosfórico, son de gran actividad biológica gracias a una actividad superficial extraordinariamente elevada. Poseen una acción activa en el metabolismo



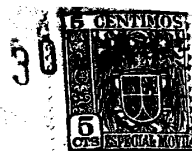
y pueden, por ejemplo, emplearse como energéticos cardiacos. Los esteres colínicos del ácido monoglicérido fosfórico, a diferencia de los esteres del ácido diglicérido fosfórico, son perfectamente solubles en agua. En cambio, son insolubles en éter y en acetona.

Se conoce el procedimiento para preparar esteres del ácido diglicérido fosfórico a partir de fosfátidos brutos, especialmente también a partir de fosfátidos brutos de soja, de tal modo que, primeramente, se extrae el fosfátido bruto con acetona y luego, la mezcla de esteres que resulta en esta extracción se sigue tratando con alcohol.

De acuerdo con la invención, la preparación a partir de fosfátidos brutos, especialmente de fosfátido bruto de soja, se realiza extrayendo a fondo el fosfátido bruto con acetona, a una temperatura que no pase de 35°, y la mezcla obtenida de esta manera se extrae, igualmente a una temperatura que no exceda de 35°, y en presencia de un gas inerte, con alcohol, para lograr una separación amplia de ester diglicérido de ácido colínfosfórico y ester diglicérido de ácido colaminfosfórico. Es conveniente realizar esta extracción en ausencia de la luz. De este modo se consiguen fosfolípidos, con rendimientos prácticamente satisfactorios, que contienen preponderantemente colina como componente básico y, además, presentan 60% de ácidos grasos con relación a los ácidos grasos totales.

De acuerdo con otro paso operatorio, para la separación completa del ester diglicérido del ácido colaminfosfórico, se añade la solución alcohólica, a una temperatura que no pase de 35°, y en ausencia de la luz, del aire, o del oxígeno, en presencia de un gas inerte, sobre una columna en la cual se encuentra una papilla alcohólica de un carbonato o de un óxido

2 42539



de uno o varios elementos de los grupos segundo y tercero del sistema periódico, preferiblemente del aluminio y/o del magnesio. Para los fines de la invención, ha dado resultados especialmente favorables el óxido de aluminio. Evaporando en vacío la solución alcohólica que sale de la columna, en presencia de un gas inerte, se obtienen esteres colínicos del ácido diglicérido-fosfórico químicamente puros, y por tanto adecuados para administración intravenosa, que presentan un contenido especialmente elevado en ácidos grasos esenciales.

Para aumentar los rendimientos en esteres diglicéridos de ácido colínfosfórico, hay que desdoblar, por elución con alcohol, los compuestos de adición que se forman en la columna a partir del óxido o del carbonato, por una parte, y los esteres diglicéridos de ácido colínfosfórico o colamínfosfórico, por otra.

La solución obtenida por elución con alcohol que sale de la columna, se reúne con la primera solución y ambas se concentran al mismo tiempo en vacío, en presencia de un gas inerte.

Los esteres colínicos del ácido diglicérido-fosfórico obtenidos de acuerdo con la invención constituyen una sustancia incolora de consistencia pastosa, que se disuelve fácilmente en éter y en cloroformo, así como también en alcohol, éter de petróleo y otros disolventes orgánicos. Es completamente insoluble en acetona. La cifra de nitrógeno total teórica alcanza 2,05 %. La cifra de nitrógeno de colina determinada analíticamente según Kjeldahl, da 2,04 %. Por lo tanto, más del 99,5% del nitrógeno total, es decir, el 100%, desde el punto de vista práctico, está en forma de nitrógeno de colina. Los ácidos grasos de los esteres obtenidos de acuerdo con la invención se distribuyen en un 17,7% como ácidos grasos saturados y 82,3%

30  
2 4 2 5 3 9



ácidos grasos insaturados, calculado con relación a los ácidos grasos totales. Las cifras absolutas para los ácidos grasos insaturados solamente se distribuyen como sigue: en el 82,3%, el ácido oléico representa el 17,2%; el ácido linólico, 52%;  
5 el ácido linolénico, 13,1%. Si se calculan estas cifras absolutas en cifras relativas, referidas a ácidos grasos insaturados, resulta, para el ácido oléico, 20%, para el ácido linólico 64% y, para ácido linolénico, 16%. Es decir, dentro de los ácidos grasos esenciales, la proporción de ácido linólico por  
10 sí solo alcanza 80%; la proporción de ácido linolénico 20%, gracias al modo operatorio especial de acuerdo con la invención.

#### EJEMPLO

Se liberan de componentes aceitosos 8 kg. de fosfátido bruto de soja, a una temperatura que no pase de 35°, con unos  
15 150 litros de acetona, repitiendo la operación varias veces. La porción insoluble se libera de acetona en vacío y en presencia de un gas inerte, después de lo cual se realiza una extracción repetida del residuo con etanol y también en este caso a una temperatura máxima de 35° y en ausencia de luz, de aire o  
20 de oxígeno, haciendo pasar por el dispositivo de extracción un gas inerte. Las soluciones alcoholicas se dejan en reposo durante varios días con lo cual se purifican de las sustancias que llevan en suspensión o arrastradas en la disolución en forma coloidal. Concentrando las soluciones en vacío, al mismo tiempo  
25 que se hace pasar un gas inerte, tal como nitrógeno o dióxido de carbono, se obtiene una fracción fosfolípido, con un rendimiento aproximadamente de 25 a 30%, que presenta 60% de ácidos grasos esenciales, referido a los ácidos grasos totales, lo cual corresponde aproximadamente al 45% de la proporción de este componente  
30 te esencial en la molécula total.

242539



Se adiciona 1 litro de la solución así obtenida, en concentración aproximada de 2-3%, en un periodo de 10 horas, excluyendo la luz, el aire o el oxígeno, sobre una columna de adsorción de 4 cm. de diámetro, por ejemplo, en la que se encuentra una papilla, por ejemplo, de óxido de magnesio y óxido de aluminio al 10% en etanol. Después de hacer pasar la solución alcohólica a través de la columna, se eluye con 3 litros de etanol. Las soluciones alcohólicas se concentran en vacío en presencia de un gas inerte. Resultan ahora, según la concentración de la solución del ester colínico, 10-14 gramos de ester colínico del ácido diglicérido-fosfórico, químicamente puro, es decir, exento de cefalina.

Se disuelven 5,7 gramos del ester colínico del ácido diglicérido fosfórico en 570 cc. de eter exento de peróxido, se adicionan con 6 cc. de una solución acuosa de 18 mg. de veneno de serpientes (*Crotalus adamanteus*) y después de agitación frecuente, se deja en reposo durante 24 horas a la temperatura ambiente. Luego, prescindiendo del precipitado que se origina, se destila el disolvente en vacío. Se obtienen 2,9 gramos de ester colínico de ácido monoglicérido fosfórico, que contienen 28% de ácidos grasos esenciales poli-insaturados, calculado con relación a los ácidos grasos totales.

Esta solicitud, que corresponde a las presentadas en Alemania, el 9 de Julio de 1957, bajo el Número 13.867 IVa/531, el 10 de Julio de 1957, bajo el Número 13.873 IVa/531 y 10 de Julio de 1957, bajo el Número 13.874 IVa/30h, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto Ley sobre Propiedad Industrial.

#### NOTA

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan



1054

242539

para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, son los siguientes:

1º. Procedimiento para la obtención de fosfolípidos naturales a partir de fosfátidos brutos vegetales, especialmente lecitina bruta de soja, por extracción con acetona y alcohol, caracterizado porque se extrae primeramente la lecitina bruta, con acetona, a una temperatura que no pase de 35º y en ausencia de aire, o bien de oxígeno, en presencia de un gas inerte, y luego, la mezcla de esteres que resulta en esta extracción, se extrae con alcohol y, finalmente, la solución alcohólica se concentra en vacío al mismo tiempo que se hace pasar un gas inerte.

2º. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque se trabaja en ausencia de luz.

3º. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque la solución alcohólica obtenida por la extracción, se agrega, en ausencia de luz, aire u oxígeno, sobre una columna, que está rellena con una papilla alcohólica de un óxido o de un carbonato de uno o varios elementos de los grupos 2º y 3º del sistema periódico; luego se eluye esta papilla con alcohol y, finalmente, las soluciones alcohólicas resultantes se concentran en vacío en presencia de un gas inerte.

4º. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque se emplea óxido de aluminio.

5º. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 3 y 4, caracterizado porque el ester colínico del ácido diglicérido-fosfórico obtenido al concentrar la solución alcohólica se hace reaccionar con veneno de serpientes en un disolvente.

6º. Un procedimiento para la obtención de fosfolípidos naturales.

242539



Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, ilustrado en el dibujo que se acompaña y para los fines que se han especificado.

5 Esta Memoria consta de once hojas y la presente, escritas a máquina por una sola cara.

Madrid

51 JUN 1958  
P. A

*[Handwritten signature]*  
Albano de Albornoz