

27 FEB 1961 264688 20.606
N. 1/243



264688

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

PATENTE DE INVENCION

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de FIRMA A. NATTERMANN & CIE., entidad alemana, establecida en Eupenerstrasse 159a, Köln-Braunsfeld, República Federal Alemana, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE COMPUESTOS HIDROSOLUBLES DE ESTERES DIGLICERIDOS DEL ACIDO COLINFOSFORICO".

Los ésteres de diglicéridos del ácido colinfosfórico naturales, libres de ésteres de diglicéridos del ácido colaminfosfórico y con un contenido elevado de ácidos grasos no saturados y esenciales, poseen, como es sabido, una importancia muy grande en la biología y en la medicina. Estos ésteres se obtienen por el procedimiento de la patente española No. 242.539, a partir de fosfátidos vegetales crudos, especialmente el fosfátido crudo de la soja, mediante extracción con acetona y a continuación con alcohol, a una temperatura que no sobrepase los 35°C y bajo exclusión de aire u oxígeno, en presencia de



264688

un gas inerte, todo ello de modo que el residuo de la extracción, liberado de la acetona en el vacío y en presencia de un gas inerte, es sometido a una nueva extracción repetida con alcohol, se dejan las soluciones alcohólicas reposar durante
5 varios días, después se liberan de las materias suspendidas o coloidales que fueron disueltas al mismo tiempo, y finalmente, a efectos de separar los ésteres de diglicéridos del ácido colinfosfórico, de los ésteres de diglicéridos del ácido colaminfosfórico, se hacen pasar, bajo exclusión de luz, aire u oxígeno, por una columna llena de una suspensión alcohólica de un
10 óxido o carbonato de uno o varios elementos de los grupos II y III del sistema periódico, después de lo cual se eluye la suspensión con alcohol y finalmente se concentran las soluciones alcohólicas salientes en el vacío, en presencia de un gas inerte.
15

Con el fin de poder administrar los ésteres anteriormente citados más fácilmente, de inyectarlos parenteral y especialmente también por vía intravenosa, se han propuesto los inventores, el transformar estos ésteres, en sí insolubles en
20 agua, en compuestos hidrosolubles. Asimismo se han propuesto los inventores, obtener a partir de dichos ésteres, compuestos hidrosolubles, que prácticamente puedan conservarse indefinidamente, a pesar de que los ácidos grasos no saturados y esenciales en ellos contenidos, están expuestos de modo especialmente fácil a los ataques oxidantes, debido a sus enlaces dobles. Es sabido, que a partir de los ácidos biliares y grasas, así como también lipoides, entre los que figuran, como es sabido, también los colinfosfolípidos, se forman compuestos moleculares hidrosolubles. De la bibliografía se desprende sobre
25 el particular lo siguiente, reconociéndose al mismo tiempo la
30



264688

gran importancia que tienen los compuestos moleculares formados a partir de grasas y compuestos similares, por un lado, como ácidos biliares o similares, por otro lado, para el metabolismo en el organismo humano:

5 Ya en el Lehrbuch der Physiologischen Chemie, Leipzig 1850, 2ª edición, se llama la atención sobre el hecho de que los ácidos biliares son capaces de emulsionar las grasas. Se sabe asimismo desde aquellas fechas que los fosfolípidos que se presentan en la bilis, activan todavía más el efecto emul-
10 gente del ácido biliar. Los ácidos biliares más conocidos existentes en el hígado son capaces de formar compuestos moleculares con lípidos y lipoides. Gracias a estos compuestos moleculares se provoca la hidrosolubilidad de las materias que de otro modo son insolubles. Con estos complejos puede tener
15 lugar un intercambio de los lípidos o lipoides vitales en el metabolismo celular. Son insustituibles en los hechos fisiológicos.

MORRE y ROCKWOOD (Proc. Roy. Soc., Londres, 60, 438-442, 1896) mencionan en sus trabajos la solubilidad de las grasas
20 en las soluciones de los ácidos biliares. Pudieron demostrar que el ácido oléico mismo se disuelve en un 4 - 5% en la bilis, mientras que el ácido esteárico es mucho menos soluble. Ahora bien, si se mezclan ambos ácidos, entonces la solubilidad de la mezcla aumenta hasta un 15%. Agregando una gran proporción
25 de Na_2CO_3 se logró incluso duplicar la solubilidad. Si se sustituyen los ácidos grasos libres por grasas neutras, entonces la solubilidad se hacía sensiblemente menor.

Fueron H. WIELAND y H. SORGE (Z. physiol. Chem. 87, 1-27, 1916) los primeros en introducir el concepto de ácidos colei-
30 nicos. Se trata aquí de compuestos aditivos de ácidos grasos



204688

y ácidos del grupo de los ácidos biliares. Ambos autores descubrieron que únicamente con el ácido desoxicólico y el ácido apocólico tiene lugar una formación de complejo auténtica. El ácido desoxicólico es un ácido saturado con dos hidroxilos, un ácido dioxicólico; el ácido apocólico es un ácido no saturado, también con dos grupos hidroxilo, un ácido dioxicolénico. También los otros ácidos biliares forman compuestos aditivos. En primer término se encuentran biológicamente los aductos del ácido desoxicólico. Así por ejemplo pudo J.C.M. VERSCHURE (Clin. chim.acta, Amsterdam, 1, 511-518, 1956) mediante electroforesis sobre papel e investigaciones en la ultracentrífuga, demostrar la presencia de un complejo de lecitina y desoxicolato de elevado peso molecular, en la vesícula biliar humana. Los componentes se encontraban en una proporción de 1 : 8.

A.E.MEYER y J.P.McEVEN (Am.J.Physiol. 153, 386-392, 1948) comprueban que precisamente el ácido desoxicólico y el ácido cólico, aplicados sobre la superficie de paredes celulares, son capaces, gracias a sus compuestos químicos moleculares, de iniciar procesos de metabolismo. Incluso influyen sobre los movimientos intestinales. Como ácido más fuertemente activo fué reconocido el ácido desoxicólico. Es capaz de formar el ácido cólico macromolecular.

H.RHEINBOLDT y colaboradores (Ann. 451, 256-273, 1927 y Ann. 473, 249-259, 1929), investigaron asimismo los ácidos co-
leínicos y los sistemas de sustancias a ellos subordinados. Consiguieron formar, a partir de una solución alcohólica de ácido desoxicólico y ácido esteárico, un compuesto molecular que tiene un punto de fusión definido. El compuesto era tan estable que no pudo ser disociado ni por hidrogenación ni por oxidación.

264688



5 El número de moles de ácidos biliares, especialmente del ácido desoxicólico o del ácido apocólico, ligados por 1 mol de ácido graso, depende de la magnitud molecular de los ácidos grasos. Para los miembros superiores de la serie de los ácidos grasos vale siempre el número 8. Los ácidos grasos penetran en la retícula de los ácidos biliares, cuando se forma el ácido coleínico. Las interferencias de rayos Roentgen no se modifican apenas nada por esta adición. Los ácidos grasos se depositan en los intersticios que forman los ácidos biliares. Se introducen, por así decirlo, en las canales existentes en la red. Así es comprensible que la proporción entre los números molares de ácidos grasos al ácido desoxicólico aumente al ir subiendo el número de carbonos de la cadena carbonada. No obstante se ha comprobado que no es necesario que los canales estén completamente llenos. Pueden presentarse intersticios entre las moléculas dobles de los ácidos grasos.

10 Estos fenómenos los pudieron presumir G. GIOCOMELLO y E. BIANCHI (Gazz. Chi. Ital. 73, 3, 1943) en el análisis estructural por rayos Roentgen, si bien no lo han podido demostrar hasta hoy de manera irrecusable.

15 RHEINBOLDT pudo demostrar que, no solamente los ácidos biliares forman compuestos moleculares con ácidos grasos, sino también con ácidos alicíclicos o sus compuestos, que posean una cadena lateral larga.

25 Del estado actual de la técnica se desprende que son necesarias cantidades relativamente grandes de sales de ácidos biliares para que, a partir de éstas y por ejemplo de la lecitina, se formen compuestos hidrosolubles, requiriéndose 8 moles de ácido biliar por cada mol de lecitina.

30 Ante la natural sorpresa se ha descubierto que la forma-



231688

ción de complejos entre los ésteres diglicéridos del ácido co-
linfosfórico más arriba descritos y una solución acuosa de una
sal de un ácido biliar, preferentemente la sal sódica, tiene
lugar en un medio alcalino ya con menos de un mol de la sal
5 del ácido biliar por cada mol del éster, a pesar de que en los
ésteres existan exclusivamente ácidos grasos de cadena larga.
El resultado es una solución acuosa clara. A este particular
se puede sustituir la fracción del éster diglicérido parcial-
mente por lisolecitina, con lo que la cantidad de sal del áci-
do biliar necesaria para el procedimiento del presente invento,
10 se reduce aún más. Ventajosamente, se emplea para este fin una
lisolecitina que se obtiene por el procedimiento de la patente
española No. 242.539, a partir del éster diglicérido del áci-
do colinfosfórico, que sirve para los fines del presente pro-
cedimiento.
15

De acuerdo con el invento, la solución alcohólica, fuer-
temente diluida, obtenida por el procedimiento de la patente
española No. 242.539 y que contiene alrededor del 1% de éster
diglicérido, puede como tal ser mezclada, por lo pronto, con
20 una pequeña cantidad de alfatocoferol, antes de que se destile
el alcohol bajo presión reducida, en presencia de un gas iner-
te, después de lo cual tiene lugar como se ha indicado la reac-
ción del aducto que se obtiene en forma de masa pastosa, com-
puesto por el éster diglicérido y el alfatocoferol, con una
25 sal de un ácido biliar. Ante la natural sorpresa ha resultado
que también el aducto proporciona un compuesto hidrosoluble al
reaccionar con la sal de ácido biliar, a pesar de que el alfa-
tocoferol en sí no es hidrosoluble, según se sabe.

El alfatocoferol no solamente sirve para la protección
30 contra la oxidación de los ácidos grasos no saturados, espe-



cialmente de los esenciales, sino que esta sustancia, conocida como vitamina E, posee también un valor biológico-terapéutico propio, que en el producto del procedimiento del presente invento, es adicionalmente importante desde el punto de vista médico. Para los fines del procedimiento del invento, son suficientes cantidades de alfatocoferol del orden de magnitud de aproximadamente 0,2% por cada gramo de éster diglicérido del ácido colínfosfórico; no obstante, se pueden emplear también cantidades mayores, caso de ser ello deseable por motivos medicinales. Se pueden agregar a los ésteres diglicéridos o a la mezcla de ésteres diglicéridos y lisolectina, hasta 2% de alfatocoferol; el producto resultante de esta adición forma con la sal del ácido biliar un compuesto complejo hidrosoluble.

15 Ejemplo de realización:

60 litros de una solución alcohólica al 1% de ésteres diglicéridos del ácido colínfosfórico naturales, libres de ésteres diglicéridos del ácido colaminfosfórico, con un contenido elevado de ácidos grasos no saturados y esenciales, se mezclan con 1,32 g de acetato de alfatocoferol; una vez que éste se ha disuelto por completo, se destila el alcohol a presión reducida y en presencia de un gas inerte; se obtiene un producto de consistencia pastosa. De éste se mezclan 600 g, mientras se agita constantemente bajo una atmósfera de nitrógeno, con 500 ml de una solución de ácido desoxicólico, preparada según se indica más abajo. Se forma una masa viscosa. En el transcurso de 1 1/2 horas, se agrega la cantidad restante de la solución de ácido desoxicólico. Una vez han dado fin todos los procesos de reacción y solución, se acaba de completar con agua de un pH = 7, hasta la concentración definitiva



(12 litros).

54688

240 g de ácido desoxicólico se suspenden en 2 litros de agua y se mezclan lentamente con una solución de NaOH (24 g de NaOH en 500 ml de agua) mientras se hierve, hasta obtenerse una solución clara. Una vez que la solución se ha enfriado por completo, se examina el valor pH y, dado el caso, se corrige con NaOH-n.

La solución alcohólica de ésteres diglicéridos del ácido colinafosfórico naturales, libres de ésteres diglicéridos del ácido colaminafosfórico, con un contenido elevado de ácidos grasos sin saturar y esenciales, empleada para el procedimiento del invento, puede prepararse de la manera siguiente:

8 kgs de fosfátido bruto de soja se extraen repetidas veces con alrededor de 150 litros de acetona a una temperatura que no sobrepase los 35°C, con el fin de purificarlos de componentes oleosos. El residuo se libera de acetona en el vacío y en presencia de un gas inerte, después de lo cual se extrae el residuo repetidas veces con etanol, a saber, nuevamente a una temperatura inferior a los 35°C y con exclusión de luz, aire u oxígeno, para lo cual se hace pasar un gas inerte por la instalación extractora. Las soluciones alcohólicas obtenidas en las extracciones, se reúnen y se dejan reposar durante varios días con el fin de liberarlas de las materias suspendidas o coloidales disueltas en ellas, que se depositan y se extraen mediante filtrado o decantación de la solución acuosa. Un litro de la solución alcohólica así obtenida, que contiene sustancialmente ésteres diglicéridos del ácido colinafosfórico, se diluye con alcohol hasta 2 - 3% y en el transcurso de 10 horas se carga, bajo exclusión de luz, aire u oxí-



264388

5 geno, en una columna de absorción de por ejemplo 4 cm. de diámetro, en la que se encuentra una suspensión de óxido de magnesio y óxido de aluminio al 10% en etanol. Después de que la solución alcohólica ha atravesado la columna, se eluye en 3 litros de etanol. Las soluciones alcohólicas obtenidas contienen ésteres diglicéridos del ácido colínfosfórico naturales, libres de ésteres diglicéridos del ácido colaminfosfórico que, con relación a la cantidad total de ácidos grasos presentes, tienen al menos 66% de ácidos grasos esenciales.

10 Para la obtención de la lisolecitina indicada más arriba en la descripción, se condensa la solución alcohólica, de los colinésteres obtenidos, en el vacío en presencia de un gas inerte, y 5,7 g de los ésteres diglicéridos del ácido colínfosfórico naturales, libres de ésteres diglicéridos del ácido colaminfosfórico, se disuelven en 570 c.c. de éter exento de peróxido, se mezclan con 6 c.c. de una solución acuosa de 18 mgr. de veneno de serpiente (*Crotalus adamanteus*), y después de agitarse frecuentemente, se deja reposar 24 horas a temperatura ambiente. A continuación, y sin tener en cuenta el poso
15 producido, se destila el disolvente en el vacío. Se obtienen 2,9 g de colinéster del ácido monoglicérido fosfórico, que contienen 28% de ácidos grasos esenciales, varias veces no saturados, con relación a la totalidad de los ácidos grasos.
20

25 Esta solicitud, que corresponde a la presentada en la República Federal alemana, el 5 de Diciembre de 1960, bajo el nº N 19273 IVb/120, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.



264688

NOTA

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los siguientes:

- 5 1º. - Un procedimiento para la obtención de compuestos hidrosolubles de ésteres diglicéridos del ácido colinafosfórico, mediante la reacción de tales ésteres con ácido desoxicólico, caracterizado por que ésteres diglicéridos del ácido colinafosfórico naturales, libres de ésteres diglicéridos del ácido colaminafosfórico, con un contenido elevado de ácidos grasos no saturados y esenciales, se hacen reaccionar con una solución acuosa de una sal de un ácido biliar en un medio alcalino, empleándose por cada mol de éster menos de un mol de la sal del ácido biliar.
- 10
- 15 2º. - Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que en lugar de parte de los ésteres diglicéridos, se emplea lisolecitina.
- 20 3º. - Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado por que los lisocompuestos obtenidos a partir de los ésteres diglicéridos del ácido colinafosfórico naturales, libres de ésteres diglicéridos del ácido colaminafosfórico, se emplean con ácidos grasos no saturados y esenciales.
- 25 4º. - Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que primeramente se mezcla una solución alcohólica muy diluida de los ésteres diglicéridos, con alfatocoferol, después de lo cual se extrae el alcohol a presión rebajada en presencia de un gas inerte y se hace reaccionar el



264388

FEB 1951

producto así obtenido con una sal de un ácido biliar.

5º. - Un procedimiento para la obtención de compuestos hidrosolubles de ésteres diglicéridos del ácido colínfosfórico.

5 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y con los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de once hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

27 FEB 1951

P. A.

Alfredo de Echeburua
Ingeniero

DG/