



cación parece debe ofrecer el máximo interés), pero no exclusivamente, entre estos procedimientos, a aquellos destinados a la extracción de ciertos glucósidos de antocianinas.

10

Tiene por objeto sobre todo, hacer que estos procedimientos permitan obtener mejores rendimientos y conducir a la obtención de productos nuevos que puedan utilizarse en el campo terapéutico o en otros campos.

15

Consiste, principalmente, para separar los glucósidos de una mezcla conteniendo azúcares, en someter este medio a una fermentación con ayuda de una levadura apropiada, preferentemente del tipo liofilizado y previamente habituado a los constituyentes de los cuerpos conteniendo los glucósidos a separar, provocando dicha levadura la fermentación de los azúcares, mientras que deja intactos los glucósidos que pueden así ser extraídos; y, en particular, en operar así para la extracción de los glucósidos de antocianinas contenidos, por ejemplo, en el extracto de murtila.

20

25

Comprende además, aparte de esta disposición principal, determinadas otras disposiciones que se utilizan preferentemente al mismo tiempo y de las que se hablará mas explícitamente a continuación, especialmente:

30

Una segunda disposición --relativa mas particularmente, aunque no exclusivamente, a los procedimientos para separar los glucósidos de antocianinas-- consistente en recurrir a una separación por el alcohol, concretamente después de una separación de los azúcares libres de la manera antes dicha, especialmente para aislar las antocianinas libres (provinientes de los glucósidos

35



de antocianas por eliminación del azúcar unido al núcleo) que son solubles en alcohol frío, mientras que el glucósido no lo es.

40 Y podrá, de todas maneras, ser bien comprendida con ayuda del complemento de descripción que sigue y que, bien entendido, se da sobre todo a título de indicación .

45 Según la invención, y mas especialmente según aquel de sus modos de aplicación, así como de aquellos de sus modos de realización de sus diversas partes, a los cuales parece haya lugar de concederles la preferencia, proponiendose por ejemplo la extracción de glucósidos a partir de ciertos extractos vegetales y, en particular, a partir de jugos de frutas, se procede como
50 sigue o de manera análoga.

Vamos pues a suponer, en lo que sigue, que se persigue la extracción de glucósidos de antocianas a partir de extractos o jugos de fruto de murtila (*vaccinium myrtillus*), habiendo sido conducidos los inventores a
55 constatar que los glucósidos de antocianas contenidos en estos frutos constituyen un notable agente para el tratamiento de los ojos, especialmente con miras a aumentar la agudeza visual, así como un agente terapéutico eficaz para otras aplicaciones indicadas mas adelante.
60

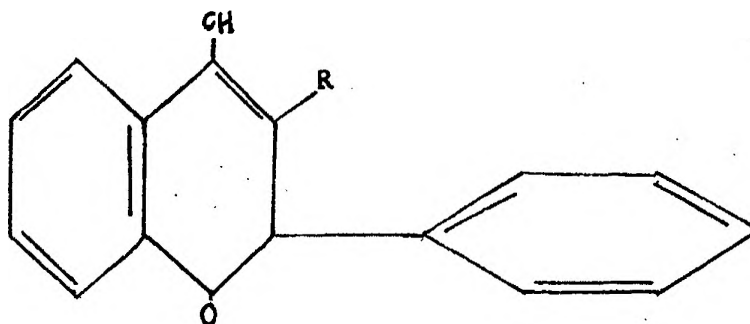
Pero debe quedar entendido que el procedimiento que va a ser descrito podría aplicarse a la extracción de cualesquiera otros glucósidos o heterósidos, de propiedades mas o menos similares.

65 Tratándose pues, mas especialmente, de la extracción de los glucósidos de antociana, éstos se carac-



70

terizan, como todos los glucósidos, por una unión de los azúcares con cuerpos de naturaleza química diferente, lo mas frecuentemente alcoholes o fenoles. Su fórmula es, por ejemplo, del género de la siguiente:



donde R, designa el azúcar ligado.

75

Hay que notar ante todo, y habrá que tenerlo en cuenta para la separación final, que estos glucósidos de antocianinas van acompañados a menudo de agliconos o antocianinas libres, derivados de los primeros por la eliminación, en la fórmula, de una parte, al menos, del azúcar ligado R, y que será necesario, por lo tanto, eliminar.

80

85

Siendo ésto así, recordaremos en primer lugar que la materia prima o extracto de murtilla, de la que se parte para la extracción de los glucósidos en cuestión, contiene, además de los glucósidos y antocianinas libres de los que se ha hablado:

90

- azúcar libre o fermentativo en proporción importante,
- sales minerales,
- ácidos orgánicos,
- resinas,
- y eventualmente otras impurezas.



95 Disponiendo de un extracto tal de murtillo, obtenido por ejemplo por concentración al vacío, se elimina primeramente, en una primera fase, el azúcar libre.

A este efecto, se somete el extracto a una fermentación que tiene por objeto eliminar los azúcares sin tocar los glucósidos.

100 Esta fermentación tiene lugar con ayuda de levaduras liofilizadas que se han activado previamente y se han aclimatado a los glucósidos en cuestión.

105 Las levaduras liofilizadas que, como se sabe, se obtienen por congelación a temperatura baja y sublimación del hielo, son, por ejemplo, las que suministra el Instituto Pasteur (especialmente del tipo "saccharomices oviformis"), y se activan de la forma siguiente:

110 Las citadas levaduras son puestas en suspensión durante varios días en una solución de sacarosa según las indicaciones del Instituto Pasteur. Cuando la fermentación está casi terminada, se procede a aclimatar la levadura a los glucósidos a tratar, incorporando a esta suspensión una pequeña cantidad q del extracto de murtillo a tratar, siendo esta cantidad en la proporción de, por ejemplo, $1/25$ de la cantidad total Q a tratar.

115 La temperatura será mantenida a un valor del orden de 22 a 25°.

120 Se deja la citada suspensión, así completada, en la oscuridad, durante tres o cuatro días, agitándola todos los días. Esta suspensión está entonces lista para el tratamiento de fermentación.

Para el citado tratamiento, que tiene por objeto la eliminación de los azúcares por fermentación, se mez-



125

cla la suspensión de levadura susodicha, con la cantidad Q de extracto de murtilla, con aproximadamente cinco veces su peso de agua y se opera el tratamiento durante un periodo conveniente, del orden de 12 a 15 días por ejemplo, en condiciones de aerobia parcial.

130

La fermentación da lugar, por transformación de los azúcares, al alcohol y a un desprendimiento de CO^2 . Este desprendimiento molesta al desarrollo de la levadura, de tal suerte que es conveniente desgasear. Pero no hay que trabajar tampoco en aerobia total, pues se produciría entonces un desarrollo excesivo de la levadura en detrimento de la formación de alcohol, y con fermentaciones secundarias además.

135

Parece que un buen resultado puede obtenerse contentándose con eliminar parcialmente el CO^2 cada dos o tres días por aspiración de la atmósfera en el recipiente de tratamiento o por insuflación de una corriente de aire. Es necesario, además, agitar, ya sea de forma continua, ya solamente una o varias veces por día.

140

Suponiendo terminado este tratamiento de fermentación, hay que filtrar, por ejemplo en el filtro-prensa, (discos de celulosa o papel), para eliminar las levaduras, así como las impurezas que pudieran estar disueltas gracias a la presencia de los azúcares. Seguidamente se evapora al vacío reducido, de modo que no se sobrepase la temperatura de 50° , y se obtiene entonces un residuo conteniendo los glucósidos de antocianas, puesto que éstas, como se puede comprobar, no son afectadas por la fermentación.

150

De ser necesario, para verificar que la fermentación



tación ha sido bien terminada, se puede volver a sembrar el residuo de levaduras: no debe haber ya producción de alcohol ni desprendimiento de CO².

Se dispone pues de un residuo que contiene en principio las diversas sustancias a excepción de los azúcares libres y de los productos eliminados por filtración.

La segunda fase del procedimiento consistirá en separar los glucósidos de antocianinas del citado residuo, y ésto preferentemente, utilizando la propiedad de que los glucósidos de antocianinas son poco solubles en alcohol en frío, mientras que las otras sustancias (antocianinas libres, ácidos orgánicos y la mayor parte de las resinas), lo son.

Para esta separación se procede, en primer lugar, al secado del residuo, preferentemente al vacío fosfórico, seguidamente se tratan por el alcohol etílico a ebullición los cuerpos extraños susodichos que se disuelven. Al enfriarse, los glucósidos de antocianinas se separan y son recogidos por filtración. Se repite la operación varias veces, si es necesario, hasta obtener una solución alcohólica muy ligeramente coloreada. Se nota en efecto, en la primera operación, cierta coloración debida a la presencia de las antocianinas libres. Esta coloración disminuye progresivamente en las operaciones sucesivas, lo que prueba la eliminación de las citadas antocianinas libres.

Si fuese necesario se podría efectuar una repetición al acetato de etilo, para una purificación suplementaria, puesto que los glucósidos de antociana buscados,

270335



son solubles en este acetato.

185 Suponiendo que nos contentamos con la purificación por el alcohol enfriado, el residuo obtenido, que contiene los citados glucósidos, puede ser tratado seguidamente al agua, después de lo cual la solución es filtrada: esta última operación elimina los polímeros que han podido formarse durante la evaporación de la solución al final de la fase de fermentación.

190 Se obtiene finalmente el producto buscado, es decir, el o los glucósidos de antocianas, extraídos del jugo de frutas inicial, este producto corresponde a la fórmula general indicada mas arriba. Por cromatografía sobre papel uni-dimensional y utilizando un disolvente compuesto de butanol acético saturado de agua, se descubren una serie de manchas coloreadas de rojo oscuro, con un coeficiente RF medio de 0.20. La luz ultravioleta hace aparecer otra serie de manchas de un RF medio de 0,4.

200 Es este producto el que presenta notables cualidades desde el punto de vista de la agudeza visual.

El citado producto puede ser aplicado al sujeto paciente de diversas maneras, por ejemplo por inyección, o en forma de comprimidos o de gotas.

205 Parece que se obtienen excelentes resultados haciendo absorber al sujeto en tratamiento, (por ejemplo cuando se desea aumentar pasajeramente la agudeza visual por la noche), dosis del orden de 250 mg del producto en cuestión, especialmente en forma de seis comprimidos de 210 40 mg cada uno. Los efectos se manifiestan generalmente después de una o dos horas.

La demandante ha procedido a efectuar ensayos



sistemáticos de la manera siguiente.

215 Con ayuda de los aparatos adecuados se han de-
terminado en una gran cantidad de sujetos diferentes los
tres parámetros siguientes:

220 El umbral luminoso bruto de la retina (S L B),
los umbrales luminosos locales de determinados
puntos de la retina (4 puntos centrales y 6
puntos excéntricos).

La frecuencia crítica de fusión luminosa (F C F).
Para cada ensayo, el sujeto examinado ha sido
sometido a una adaptación de treinta minutos
a la oscuridad total.

225 Se ha observado de una manera general:
para el S L B una mejora significativa,
para los S L locales mejoras igualmente impor-
tantes, tanto en el campo central como en el
campo periférico,

230 y para el F C F un ligero aumento.

He aquí, por ejemplo, el resultado de una obser-
vación particular.

235 El sujeto era un adulto de 22 años, en perfec-
to estado de salud, poseedor de una agudeza visual de
10/10 en visión diurna.

240 Se le ha sometido a tres pruebas para explorar
los tres parámetros antes indicados, después de haberlo
adaptado a la obscuridad durante treinta minutos. Los va-
lores de los parámetros han sido anotados y se ha estable-
cido un diagrama.

Se le ha hecho absorber seis comprimidos de
40 mg, exponiéndolo a la luz durante una hora.



245 Después se le ha readaptado a la obscuridad y se le ha sometido a las mismas pruebas ya citadas, primeramente una hora después de la medicación, seguidamente dos horas después.

La mejora, comprobada ya al cabo de una hora, se ha manifestado notablemente mayor después de dos horas.

250 A título de ejemplo puramente indicativo, he aquí una fórmula para la composición de los comprimidos o gráneas: - para un comprimido:

- Glucósidos de antocianas. . . 0,040 a 0,100 g
- Kieselghur. 0,100 g
- Azúcar. 0,040 g
- 255 Talco 0,015 g
- Almidón 0,015 g
- Estearato de magnesia . . . 0,005 g

260 El nuevo producto obtenido de acuerdo con la invención presenta, pues, un interés terapéutico innegable, tanto si se trata de sujetos sanos como de sujetos deficientes.

265 Presenta además otras cualidades que se acostumbra calificar de actividad vitamínica P. Por esta razón se encontrarán otras aplicaciones, aparte de la aplicación a la actividad visual, en que su empleo será benéfico para el tratamiento de ciertas enfermedades que van acompañadas de un aumento de la fragilidad y de la permeabilidad capilares.

270 Por ejemplo, un sujeto que presente un estado arterioscleroso o atacado de hipertensión arterial o de una hemopatía, podrá utilizar a título curativo y sobre todo profiláctico, los comprimidos tales como los arriba



indicados.

275 Estos productos podrán ser utilizados, no solamente en las afecciones vasculares que afectan al organismo en general, sino tambien en las enfermedades en que la afección vascular permanece mas particularmente localizada en tal o cual región del cuerpo.

280 En general, las dosis parecen ser del orden de 400 mg. por ejemplo, particularmente bajo la forma de comprimidos conteniendo 100 mg del producto.

Los citados productos se prestarían, bien entendido a otras muchas aplicaciones, incluso no terapéuticas.

285 Finalmente, los procedimientos de separación propios de la invención pueden, bien entendido, ser utilizados para la separación de los glucósidos y heterósidos de otra naturaleza a aquella de los que se ha hecho mención mas especialmente, pudiendo en cada caso particular eliminar los azúcares que acompañan generalmente a estos glucósidos, mediante la fermentación efectiva propia de la citada invención, y ello en todos los casos en que la fermentación no afecta a los glucósidos.

295 Como es evidente por sí mismo y como resulta por otra parte de lo ya dicho, la invención no se limita en modo alguno a aquellos de sus modos de aplicación, así como tampoco a aquellos de sus modos de realización, de sus diversas partes, que han sido mas especialmente considerados; ella se extiende por el contrario, a todas las variantes.

300

N O T A

En esta Patente de Invención se reivindica:



305 1º.- Perfeccionamientos aportados a los procedimientos para la obtención de glucósidos, particularmente glucósidos de antocianinas, a partir de un medio
 310 conteniendo azúcares, especialmente a partir de sustancias vegetales tales como jugos de frutas o extractos de frutas, en particular de murtila, caracterizado por el hecho de que, para separar los glucósidos del citado medio, se somete este medio a una fermentación con ayuda de una levadura adecuada, de preferencia liofilizada y previamente acostumbrada a los glucósidos a separar, provocando la citada levadura la fermentación de los azúcares, mientras que deja intactos los glucósidos que pueden así ser extraídos.

315 2º.- Perfeccionamientos aportados al procedimiento según reivindicación 1, caracterizados por el hecho de que, después de la eliminación de los azúcares libres por la fermentación, se separan las otras impurezas, es decir, especialmente los ácidos orgánicos y
 320 las resinas.

325 3º.- Perfeccionamientos aportados al procedimiento según reivindicaciones 1 y 2, caracterizados por el hecho de que, para la separación de las impurezas se utiliza la propiedad de los glucósidos de ser solubles en el agua y muy poco solubles en el alcohol.

330 4º.- Perfeccionamientos aportados al procedimiento según reivindicaciones 1 a 3, caracterizados por el hecho de que la primera operación de fermentación es seguida de una filtración, la cual elimina las levaduras así como las impurezas disueltas gracias a la presencia de los azúcares.

27.335

- 13 -



335

5^a.- Perfeccionamientos aportados al procedimiento según reivindicaciones 1 y siguientes, caracterizados por el hecho de que se evapora seguidamente en el vacío reducido, con el fin de no sobrepasar la temperatura de 50^o, de modo que se obtenga un residuo que contiene los glucósidos, así como las otras impurezas.

340

6^a.- Perfeccionamientos aportados al procedimiento según reivindicaciones 1 y siguientes, caracterizados por el hecho de que el residuo, después de una fase de secado, especialmente al vacío fosfórico, es tratado a ebullición por el alcohol y seguidamente enfriado y sometido a una filtración que permite recoger los glucósidos.

345

7^a.- Perfeccionamientos aportados al procedimiento según reivindicaciones 1 y siguientes, caracterizados por el hecho de que los glucósidos son seguidamente vueltos a tratar al agua, filtrando después la solución para la eliminación de los polímeros que han podido formarse durante la evaporación de la solución al final de la fase de fermentación. Y

350

8^a.- "PERFECCIONAMIENTOS APORTADOS A LOS PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCION DE GLUCOSIDOS, PARTICULARMENTE GLUCOSIDOS DE ANTOCIANAS", de conformidad en un todo en lo esencial y fines industriales a lo descrito en la precedente memoria descriptiva.

355

Esta memoria consta de TRECE hojas escritas o mecanografiadas por una sola cara a doble espacio en 356 líneas.

Madrid, 9 de abril de 1962

Por autorización de la interesada.