

332626

PATENTE DE INVENCION

Your ref: 9673.



## *Memoria Descriptiva*

*sobre*

"PROCEDIMIENTO PARA EXTRAER DE SEMILLAS SAPONINAS O SAPOGENINAS ESTEROIDALES".

*Solicitante:* NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION, entidad norteamericana, residente en Kingsgate House, 66-74 Victoria Street, Londres, S.W.1., Inglaterra.

-----

Este invento se refiere a la extracción de saponinas y sapogeninas esteroideas de materias vegetales.

5. Las substancias vegetales productoras de sapogenina se cultivan en varias partes del mundo y



- las sapogeninas que pueden extraerse de ellos son de considerable importancia comercial puesto que pueden usarse como materia prima para la fabricación de varios compuestos esteroides biológicamente activos, particularmente corticosteroides. Las sapogeninas se encuentran en la planta normalmente en forma de saponinas en cantidades relativamente pequeñas, por ejemplo alrededor de 2,5, y se han dedicado muchos estudios al problema de una extracción eficiente.
- 5.
10. Las materias vegetales particulares con las que se interesa el presente proceso son semillas productoras de sapogeninas, por ejemplo las de las familias Leguminosas, Balanitáceas, y Zigofiláceas y en particular las semillas derivadas de los géneros
15. Trigonella, Trifolium y Balanites. En el pasado se han propuesto varios procesos para la extracción de sapogeninas de tales materias, y todos han implicado la extracción de las saponinas del material vegetal con un disolvente como un primer paso, seguido por la hidrólisis del enlace glucosídico en la saponina extraída para
20. dar la sapogenina.
25. En la extracción de saponinas y sapogeninas de semillas y otras materias vegetales se ha pensado que era esencial el pulverizar, moler finamente o triturar la materia vegetal tanto como fuera posible para romper la estructura vegetal tanto como se pudiera puesto que esto se creía que permitía un mejor acceso del disolvente de extracción o agente hidrolítico a los compuestos esteroides.



5. Se ha descubierto ahora que en tanto se trate de extracción de semillas, hay ventajas que ganar al evitar la rotura de la estructura celular. En primer lugar se ha descubierto, con gran sorpresa, que el rendimiento total de saponinas recuperadas puede aumentarse cuando se trata la semilla en forma sin triturar y además que el problema de manipulación se simplifica, en particular en las fases de filtración, lavado y extracción.
10. Por ende, el presente invento provee un proceso para extraer saponinas o saponinas esteroideas de semillas productoras de saponinas esteroideas, lo que comprende el tratamiento de la semilla en forma sin triturar, sea con un disolvente de saponina para obtener una solución de saponina, sea con una sustancia capaz de hidrolizar los enlaces glucosídicos para obtener un hidrolizado que contiene saponina.
15. La semilla que ha de ser objeto del proceso del presente invento puede tratarse en forma de semilla entera o embrión entero (germen) o semilla rota o embrión roto dependiendo del tamaño de la semilla entera. Así, las semillas pequeñas, por ejemplo hasta 5 mm de diámetro mayor, pueden tratarse convenientemente sin romper pero en el caso de semillas mayores, se prefiere frecuentemente romper la semilla para dar trozos más pequeños. La reducción de la semilla a polvo debe ser evitado, desde luego, y la mayoría de la semilla sin triturar será retenida normalmente por una criba N° 30, British Standard 410 (B.S. 410).
- 20.
- 25.

22 OCT



- 4 -

- Es posible disgregar las semillas productoras de sapogenina para obtener por una parte embriones y por otra cubiertas de semillas y otras capas, y se han obtenido particularmente buenos resultados si estas envolturas y capas están total o parcialmente separadas del embrión, y se somete al embrión entero o triturado al proceso de extracción.
- 5.
- La semilla productora de sapogenina puede ser semilla madura que puede o no ser viable, o puede ser semilla inmadura que tiene sin embargo un contenido útil de saponina o sapogenina.
- 10.
- En los casos en que la semilla tiene un contenido útil de aceite se puede eliminar primero el aceite fijo y volátil, por un proceso que no implica trituración de la semilla, por ejemplo por aplastamiento, y la semilla desgrasada se somete entonces al presente proceso de recuperación de sapogenina. Este paso es importante en el caso de una semilla grande que contiene una alta proporción de aceite, por ejemplo Belanites, y el aplastamiento puede servir a la vez para facilitar la eliminación del aceite y para triturar la semilla a una forma adecuada para utilizarse en el presente proceso.
- 15.
- 20.
- Este invento se refiere en particular a la recuperación de sapogeninas tales como la diosgenina y su epímero yamogenina de semilla productoras de sapogenina. Las semillas preferidas para la extracción por el presente proceso son aquellas derivadas de la *Trigonella foenum-graecum* (fenogreco) que se cultiva como cosecha fundamental en muchas partes del mundo in-
- 25.
- 30.

22 OCT. 1956

- 5 -

- cluyendo países que bordean el mar Mediterráneo, otros territorios del Africa del Norte, Portugal, India, Pakistán y Rusia. Otras semillas de las que se pueden extraer sapogeninas por el presente proceso incluyen
5. *Trigonella cerúlea*, *T. corniculata*, *T. Crética*, *T. Hamosa*, *T. platycarpus*, *T. radiata*, *Trifolium ornitopodioides* y *Balanites aegyptiaca* y *B. Wilsoniana*. El contenido total de sapogenina de estas semillas es corrientemente entre 1-2% sobre una base libre de humedad dependiendo de su origen.
- 10.

- Se ha descubierto también que el rendimiento total de sapogeninas esteroidales puede aumentarse si se incuba la semilla durante un periodo de tiempo antes de ser sometida al proceso de extracción.
15. Esta incubación comprende el mantener las semillas a una temperatura elegida en presencia de un medio acuoso. La temperatura debe elegirse de tal manera que acelere los cambios biológicos en el material vegetal que mejora el rendimiento total de material productor de sapogenina. Por ejemplo, en el caso de semillas, la temperatura seleccionada, que puede ser desde unos 5°C hasta 40°C y hasta 80°C, dependerá de que la germinación de la semilla haya de ser alentada o disminuída. Cuando el material de semilla está incubado con agua, la cantidad
20. de agua puede limitarse suficientemente para que se absorba toda por el material de semilla y no haya una fase acuosa presente. De manera alternativa se puede añadir una cantidad mayor de agua para proveer una fase acuosa separada durante el periodo de incubación y a su
25. final. En el caso de fenogreco es deseable utilizar por
- 30.



- lo menos 5 partes en peso de agua por cada parte por peso de semilla, pero esta proporción puede aumentarse a 10:1 e incluso a 20:1. En esta situación las sapogeninas pueden recuperarse de los materiales productores de sapogeninas solubles en agua que están en la fase acuosa. Se cree que el pretratamiento de la semilla de esta manera favorece bien la formación adicional de material productor de sapogenina por síntesis, o debido a la liberación de sapogeninas existentes en la semilla, o ambos procesos pueden estar implicados. Se ha descubierto que cuando se incuban las semillas de esta manera el rendimiento total de sapogeninas puede influirse por la presencia de luz u oscuridad, o la presencia o ausencia de aireación adicional durante el periodo de incubación. Puede ser deseable también la adición de suplementos minerales a los medios acuosos. En general se encuentra que el rendimiento total puede incrementarse por técnicas de incubación en un 100% de más según la edad y el origen de la semilla y el método particular de incubación.
- 5.
  - 10.
  - 15.
  - 20.

El rendimiento total de sapogeninas recuperadas puede también incrementarse si la incubación y/o la hidrólisis se llevan a cabo en presencia de escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-tetracosano) u otro precursor de esteroide en la vía biosintética de la saponina.

Se puede añadir escualeno como tal, por ejemplo como sustancia química purificada de grado cromatográfico, o puede añadirse en forma de materia animal o vegetal sin refinar que contenga escua-

- 25.
- 30.



- leno. Por ejemplo, hígado, bacterias, hongos, tales como levadura, patatas, semillas frutos y hojas de especies de *Bisum*, *Trigonella Trifolium*, etc; aceite de nuez molida; y aceite de oliva contienen todos escualeno
5. disponible y puede usarse en lugar de la substancia misma una cantidad de estos calculada para proporcionar la cantidad deseada de escualeno. Una posibilidad más es usar un precursor de esteroide, por ejemplo un compuesto químico más simple que pueda ser tomado en la
10. cadena biosintética en el material vegetal y convertirse en saponina o sapogenina por las células del material vegetal. Tales precursores incluyen el escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametiltetracosano-2,6,10,14,18,22-hexano) ácido mevalónico; 3-metil-buteno-3-ol; y geraniol, o
15. sus derivados tales como pirofosfatos. Otros compuestos relacionados en la vía biosintética pueden usarse solos o como mezclas de uno con otro o con escualeno. De nuevo el material adicionado, por ejemplo geranio, no es necesario añadirlo como producto químico puro, sino que
20. puede añadirse como producto sin refinar natural o sintético, por ejemplo aceite de geranio (aceite de palmarrosa) e incluso puede añadirse en forma de materiales vegetales productores de geraniol. Puede utilizarse escualeno marcado isotópicamente u otros precursores,
25. por ejemplo marcados con  $C^{14}$  o tritio para dar saponinas o sapogeninas marcadas isotópicamente. Pueden también añadirse enzimas que participen en la biosíntesis del escualeno y esteroides. Estos pueden tomar la forma del tejido animal o vegetal conteniendo escualeno ya mencionados o de extractos de estos tejidos, libres de células
30. o de enzimas aislados.

Las cantidades de escualeno (o fuente de escualeno u otro precursor) que ha de añadirse al material de semilla depende de varias variables, por ejemplo la naturaleza y estado del material de semilla y las condiciones del pretratamiento y extracción, pero puesto que el escualeno residual puede recuperarse fácilmente del producto de saponina, el uso de una cantidad en exceso de las necesidades no es necesariamente antieconómico. Se ha descubierto que se obtienen resultados muy útiles usando hasta el 50% en peso de escualeno basado en el peso en seco del material de semillas.

Se pueden incubar las semillas con enzimas degradantes tales como celulasa o pectinasa como pretratamiento adicional o alternativo. Se cree que esto ayuda al escualeno y otros precursores y mas tarde al agente hidrolizante a ponerse en contacto con las células. Cuando se adopta el pretratamiento por enzimas, éste y la incubación mencionada anteriormente pueden llevarse a cabo simultáneamente, y puede introducirse escualeno en cualquier estadio durante el periodo de incubación.

Pueden recuperarse los compuestos esteroidales de la semilla sin triturar, que puede haberse sometido a incubación y/o pretratamiento con escualeno etc, extrayendo la semilla con un disolvente de saponina para dar una solución de saponina de la que puede recuperarse la saponina por tratamiento adicional o que puede ser hidrolizada para dar un hidrolizado del que pueden recuperarse las saponinas. Esta extracción



- se ha sustituido en general sin embargo, y el proceso del presente invento se usa de preferencia en asociacion con el método de extracción más moderno en que la semilla se somete a condiciones de hidrólisis de tal manera que el enlace glucosídico en la saponina se rompa para dar un hidrolizado que contiene sapogenina, la cual puede entonces extraerse con un disolvente de sapogenina.
- 5.
10. La conversión de las substancias productoras de sapogenina a sapogeninas puede ser llevado a cabo por tratamiento con un ácido mineral para hidrolizar los enlaces glucosídicos. Una manera conveniente de efectuar esta conversión implica calentar, por ejemplo hasta temperatura de reflujo, con ácido clorhídrico 2N durante unas 5 horas. Sin embargo son adecuados otros ácidos minerales no oxidantes tales como el ácido sulfúrico, y también pueden utilizarse otros materiales ácidos, tales como sales ácidas. Las sapogeninas pueden extraerse fácilmente de la fracción
- 15.
20. ácida insoluble del hidrolizado por extracción con un disolvente de sapogenina tal como un hidrocarburo.
- Según el invento, un procedimiento de preferencia incluyen incubar las semillas sin triturar de fenogreco a temperatura de hasta 40°C durante unos siete días con agua, calentando el producto incubado con ácido clorhídrico diluido, y recuperando la disgenina del material libre de ácido e insoluble en él por extracción con un disolvente orgánico tal como nafta. En este caso las saponinas que son solubles en agua, pueden encontrarse en la fase acuosa al final de la in-
- 25.
- 30.



cubación, pero las sapogeninas formadas por hidrólisis son insolubles en el ácido acuoso y pueden filtrarse junto con las semillas tratadas antes de la extracción con disolvente.

5. Para ilustrar el invento se dan los siguientes Ejemplos. En estos Ejemplos, el término "diosgenina" incluye la diosgenina sólo o junto con su epímero yamogenina, mientras que "yamogenina" se refiere a este epímero únicamente.

10. EJEMPLO 1

15. Se incubaba con 4 l. de agua corriente a 37°C durante 2 días 1,1 Kg de una muestra de semillas enteras de fenogreco marroquí que tenga un contenido de humedad del 10% y un contenido de sapogenina por ensayo infrarrojo de 1,16% en una base libre de humedad (b.l.h.). Se añaden entonces 775 ml. de ácido clorhídrico concentrado para hacer 2N aproximadamente con el ácido, y se hierve la mezcla bajo reflujo durante 2 horas y se enfría. Las sustancias insolubles se recogen en
20. la bomba y se lavan con 750 ml de agua, luego con solución diluída de amoníaco hasta que el aglutinado sea alcalino (se usan aproximadamente 500 ml de solución al 10% de amoníaco). La torta del filtro se seca en una corriente de aire a 80°C durante 6 horas, luego se parte y se continúa el secado durante 6 horas adicionales. La sustancia seca (400 g. en peso) se pulverizó groseramente, se puso en un percolador - un tubo de cristal de 62 cm de longitud y 5,1 cm de diámetro - y se maceró con nafta, p.f. 40-60°C durante 1/2 hora y se percoló
25. con el disolvente durante 15 minutos. Después, el perfo-
- 30.



do de maceración se aumenta a 1 hora seguido de percolación durante 15 minutos repitiendo este proceso de 1 hora y 15 minutos una segunda vez. El percalado en bruto (450 ml) no muestra cristales pero al concentrarlo produjo diosgenina bruta 2,05 g, rendimiento 0,21% (b.l.h.) (Fracción A) (p.f. 190-192°C que demuestra ser principalmente diosgenina por C.C.D)(cromatografía en capa delgada). La recuperación del disolvente del líquido madre de la Fracción A produjo aceite, 39g., rendimiento 3,9% b.l.h.

El residuo que queda después de la percolación con nafta p.f. 40-60°C se extrae con este disolvente en un aparato soxhlet durante 4 horas. La percolación preliminar con el disolvente elimina suficiente aceite para impedir la ebullición lenta en el matraz que contiene el disolvente hirviendo que alimenta. La eliminación del disolvente (1 l.) da una pasta (10 g) que se refluye con nafta p.f. 100-120°C, 100 ml. La solución caliente se filtra para eliminar todo resto de substancia insoluble y el filtrado produjo en dos veces, diosgenina cruda 3,13 g, rendimiento 0,31% b.l.h. (fracción B (p.f. 190-193°C que demostró ser principalmente diosgenina por C.C.D.). El rendimiento total de diosgenina bruta, Fracción A + B 5,18 g, 0,52% b.l.h. El líquido de la Fracción B produce 36g. de aceite, rendimiento 3,6% b.l.h. al recuperar el disolvente.

Se continúa la extracción con nafta, p.c. 40-60°C, en un extractor soxhlet durante un período adicional de 18 horas. Las agujas separadas del disolvente (1 l.) sin concentración previa de la solución



5. Fracción C: gitogenina bruta, 0,28 g. rendiendo 0,03% b.l.h. (p.f. 244-248°C, gitogenina confirmada por C.C.D.). El líquido madre se evapora hasta que esté seco, dando un residuo sólido, Fracción D: gitogenina bruta 0,23 g., rendiendo 0,02% b.l.h. (p.f. 235-239°C; por C.C.D una mezcla de gitogenina y diosgenina).

Sumario:	Diosgenina 5,2 g	0,52% b.l.h.
	Gitogenina 0,5 g	0,05% b.l.h.
	Aceite 75 g	7,5% b.l.h.

10. EJEMPLO 2

15. La semilla entera de fenogreco marrquí utilizada en el Ejemplo 1 se machaca, y esta semilla rota en forma de embrión fragmentado con 45% de su peso de fragmentos no embrionarios, se utiliza tras conservarlo a 20-22°C, durante unas 16 a 72 horas - durante cuyo tiempo los procedimientos de fragmentación y separación produjeron el material en varios lotes pequeños. Este material 660 g., todo el cual pasa a través de una criba N° 10, 95% del cual es retenido por una criba N° 20
20. siendo retenido todo él por, una criba N° 30 (B.S. 410) (ensayo infrarrojo: sapogenina total 1,68% b.l.h.) equivalente a 310 g. de embrión fragmentado, libre de fragmentos no embrionarios y humedad, se incuba en dos bandejas cerradas, cada una de longitud de 30,5 cm, anchura de 23
25. cm y profundidad 5 cm. con un volumen total de 2 l. de agua corriente a 37°C, durante 3 días. Casi toda el agua es absorbida por el material. Se transfiere a un matraz apropiado el material con ayuda de 500 ml de agua, se añaden 550 ml de ácido clorhídrico concentrado y se hierve
30. la mezcla bajo reflujo durante 2 horas. Se continúa la

2200

extracción como en el Ejemplo 1 produciendo:

Diosgenina 2,85 g. (en 4 veces) (0,48% b.l.h., semilla fragmentada)

Aceite 62, 1 g. (9,4% b.l.h., semilla fragmentada)

5. EJEMPLO 3

- (a) 110 g. de un lote adicional de fenogreco marroquí que tenga un contenido de humedad ensayado de 10% y un contenido en sapogenina total de 1,50% b.l.h. se hierven bajo reflujo con 500 ml de ácido clorhídrico 2N durante 2 horas y se enfría. El residuo insoluble en ácido se recoge en la bomba y se libra de ácido lavándolo con cuatro volúmenes sucesivos de agua corriente usando 100 ml cada vez, luego con 80 ml de solución al 10% de amonpiaco y finalmente con otros 100 ml de agua corriente. La torta se seca a 80°C durante 6 horas en la estufa secadora de aire caliente se pulveriza (peso 28,6 g) y se macera en un extractor de soxhlet durante 1 hora con nafta (por ejemplo 40-60°C) y se deja drenar. La eliminación del disolvente produce aceite = 6,5 g. (rendimiento = 6,5%). No hubo separación de sapogenina por concentración del aceite o breve enfriamiento a 5°C. La cromatografía en capa delgada muestra una baja concentración de diosgenina en el aceite.

- El residuo que queda después de la maceración con nafta fría (por ejemplo 40-60°C) se extrae con este disolvente en un aparato soxhlet durante 6 horas. La recuperación del disolvente de un material cristalino que tras disolverlo en nafta (por ejemplo 100-120°C) bajo reflujo y enfriarlo, produce diosgenina bruta 0,41 g (rendimiento 0,41% b.l.h.) p.f. 193-195°C. Similarmente, la



- 14 -

continuación de la extracción en soxhlet del residuo durante un período de 24 horas produce gitogenina bruta = 0,08 g. (0,08% b.l.h.).

5. (b) A modo de comparación se incuban 110 g. de la misma muestra de fenogreco según se describe en el Ejemplo 3 (a) con 500 ml de agua corriente a 37°C durante 6 horas y se añaden entonces 105 ml de ácido clorhídrico concentrado. Se hierve la mezcla bajo reflujo durante 2 horas y el proceso se completa entonces según se describe en (a) anteriormente con los siguientes rendimientos:
- 10.

Aceite obtenido tras maceración durante 1 hora = 5,7 g (5,7% b.l.h.).

15. Diosgenina bruta, después de extracción durante 6 horas = 0,70 g. (0,70% b.l.h.) o.f. 191-194°C.

Mezcla de diosgenina y gitogenina obtenida tras la extracción durante otras 12 horas = 0,02 g. (0,02% b.l.h.), C.C.D.: Gitogenina más indicios de diosgenina) p.f. = 246-248°C. Gitogenina tras la extracción durante 24 horas adicionales = 0,07 g. (0,07% b.l.h.) p.f. 245-247°C.

20.

EJEMPLO 4

25. Se fragmenta fenogreco de origen de Pakistán Oeste para separar el embrión rico en sapogenina de la capa micilaginosa y cubierta de semilla; se desengrasan parcialmente 20 g del embrión (siendo retenido todo por una criba N° 30, B.S. 410) que tenga un contenido total ensayado de sapogenina del 2,4% b.l.h. extrayendolo con nafta (por ejemplo 40-60°C durante 1 hora. La
30. eliminación del disolvente del extracto produce 0,53 g



- de un aceite (2,7% b.l.h.). Este aceite mostró por C.C.D. que no tenía diosgenina. El residuo del elemento filtrador se seca a 65-70°C y se incuba con 60 ml de agua corriente durante 3 días a 37°C en un recipiente cerrado.
5. Después la mezcla se transvasa a un matraz con lavados de agua y se añade ácido clorhídrico concentrado para que el volumen final sea 150 ml de ClH 2N. Esto se hierve bajo reflujo durante 2 horas y se trabaja para dar diosgenina como en el ejemplo 3. Rendimiento 0,20 g.,
10. 1,0% b.l.h. de embrión.

EJEMPLO 5

- Una muestra de fenogreco de origen marroquí que tenga un contenido total de sapogenina del 1,70% se incuba a 37°C con 20 veces su peso de agua durante períodos de tiempo desde 1 a 96 horas. Se añade entonces ácido clorhídrico concentrado a la mezcla para proporcionar un medio ácido 2N y se refluye la mezcla durante 2 horas. El material libre de ácido insoluble en él se extrae con nafta por ejemplo 40-60°C durante 24
15. horas en un extractor soxhlet para aislar las sapogeninas. La tabla que sigue muestra el efecto del aumento del periodo de incubación en semilla pulverizadas y sin pulverizar.
- 20.

22 OCT. 1964

- 16 -

Sapogenina total por ensayo infrarrojo: %, b.l.h.  
Semilla entera

<u>Tiempo</u> <u>horas</u>	<u>Sin pulverizar</u> <u>(semilla entera)</u>	<u>Pulverizada</u>
1	1.66	1.32
6	1.92	1.26
12	1.72	1.34
18	1.57	1.26
24	1.60	1.41
30	1.61	
36	1.70	
42	1.70	
48	1.55	1.37
54	1.57	
60	1.57	
66	1.57	
72	1.66	1.24

EJEMPLO 6

25. Se añaden 50 ml de agua corriente y 1 ml de escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametiltetracosano) a 5 g de semilla entera de fenogreco. Se coloca la mezcla en un matraz cónico de 500 ml tapado con algodón, y se somete a una luz continua de aproximadamente 2.880 lúmenes/m<sup>2</sup> a temperatura ambiente (20-23°C) con aireación continua agitando para fomentar la germinación. Después de 24 horas el radical muestra una elongación de 2-3 mm
30. más allá del micropilo.



5. El producto incubado se trata con ácido clorhídrico y el material insoluble en ácido se extrae como se describe en el Ejemplo 5 y el producto se trabaja para producir la sapogenina y se ensaya por análisis infrarrojo. El efecto ventajoso de incubarlo con escualeno de esta manera se muestra en la tabla que sigue al Ejemplo 7 donde los experimentos de control se llevan a cabo exactamente de la misma manera pero sin usar, escualeno.

10. EJEMPLO 7  
Incubación de fenogreco con precursor esteroide

15. Se añaden 50 ml de agua corriente con 0,5 ml de escualeno a 5 g de semilla entera de fenogreco, y se incuba en la oscuridad a 37°C durante 24 horas para impedir la germinación subsecuente. Se añaden entonces 0,5 ml de adicionales de escualeno y se somete la mezcla a las condiciones de luz y agitación descritas en el Ejemplo 6. No hubo alargamiento del radical obvio ni siquiera hasta 96 horas de aireación.

20. El producto incubado se trata entonces con ácido clorhídrico y el material insoluble en ácido se extrae según se describe en el Ejemplo 5 y se ensayó por análisis infrarrojo. El efecto ventajoso de la incubación con escualeno de esta manera se muestra en la siguiente tabla donde los experimentos de control se llevan a cabo en la misma manera exactamente pero sin usar escualeno.
- 25.

22



- 18 -

	Tiempo de aireación en horas a 20-30°C (después de 24 horas de incubación a 37°C en el caso del Ejemplo 7)	Sapogenina Total por análisis infrarrojo % b.l.h.		% de aumento
		Control sin escualeno	Con escualeno	
Ejemplo 6	6	1.75	1.99	14
"	12	1.77	2.03	15
"	24	1.75	2.01	15
Ejemplo 7	48	1.39	1.77	27
"	72	1.43	1.77	24
"	96	1.61	1.92	19

#### EJEMPLO 8

20. Se añade 1 ml de escualeno a 5 g de semilla de fenogreco marroquí y se agita a mano durante 2 minutos. Se añaden 50 ml de agua corriente y se incuba la mezcla en la oscuridad a 37°C durante 6, 24 o 48 (procedimiento A). Se mezclan completamente los componentes agitando mecánicamente durante 15 minutos después de
25. las primeras 3 horas del periodo de incubación de 6 horas, y después de las primeras 4 horas en los otros dos casos. Estas condiciones impiden la germinación de la semilla. El producto incubado se trata con ácido clorhídrico y se extraen las sapogeninas del residuo insoluble

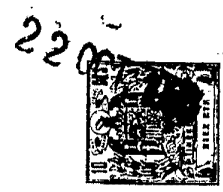
5. en ácido según se describe en el Ejemplo 5. Las sapogeninas se ensayan por análisis infrarrojo. Se llevaron a cabo experimentos adicionales en los que se introduce el mismo volumen de escualeno después de ajustar la mezcla a 2N con ácido clorhídrico y antes de hervir bajo reflujo durante 2 horas (procedimiento B) o se omite el escualeno por completo (procedimiento C). Los ensayos totales de sapogenina se muestran más adelante como % b.l.h.

<u>Tiempo de incubación</u>	<u>Procedimiento A</u>	<u>Procedimiento B</u>	<u>Procedimiento C</u>
Horas	%	%	%
6	2.75	2.32	1.90
24	2.55	2.17	1.86
48	2.42	2.04	1.79

EJEMPLO 9

20. Los procedimientos A y B descritos en el Ejemplo B se repiten utilizando geranio (grado técnico) en lugar de escualeno pero la agitación mecánica de 15 minutos se omite durante el periodo de incubación. Los ensayos totales de sapogenina se muestran más adelante como % b.l.h.
- 25.

<u>Tiempo de incubación</u>	<u>Geraniol</u>	<u>Procedimiento A</u>	<u>Procedimiento B</u>
Horas	ml.	%	%
24	1	2.4	2.10
24	2	2.8	1.96
72	2	1.70	1.99



EJEMPLO 10

5. Las semillas de nueces recién trituradas de *Balanites aegyptiaca* se aplastan en un mortero para dar semilla triturada (80% de la cual se retiene por una criba n° 30 B.S. 410) que se desengrasa con nafta (por ejemplo 40-60°C) durante 1 hora en un extractor de soxhlet a una proporción de 20 sifones por hora. El disolvente se elimina de la semilla desengrasada calentando a 50-75°C en una estufa de corriente de aire.
10. Procedimiento A
15. Se agitan a mano 5 g. de este material desgrasado con 100 ml de agua corriente estéril durante 1 minuto, añadiendo 1 ml de escualeno bajo condiciones asépticas, agitando a mano la mezcla durante un minuto más. Se incuba la mezcla entonces a 37°C en la oscuridad durante 6 horas y el producto incubado se hidroliza con ácido clorhídrico y las sapogeninas se extraen del residuo insoluble en ácido según se describe en el Ejemplo 5. Se ensayan las sapogeninas por análisis infrarrojo.
20. Procedimiento B
25. Se omite la incubación en este procedimiento. Se agitan a mano durante 1 minuto 5 g. del material desengrasado con 122 ml de ácido clorhídrico 2N, se añade 1 ml de escualeno, se agita a mano la mezcla durante un minuto más y se sigue el procedimiento A entonces de hidrólisis y extracción.



Procedimientos C y D ;Se siguen los procedimientos B y A respectivamente, pero sin incluir escualeno en la mezcla.

5. Los resultados del ensayo infrarrojo se muestran más adelante como sapogenina total % b. l.h.

	<u>Procedimiento</u>	%
	C	Sin incubar, sin escualeno 1.60
	B	Sin incubar, con escualeno 1.75
10.	D	Con incubación, sin escualeno 1.00
	A	Con incubación, con escualeno 2.17

EJEMPLO 11

15. Para procurar material uniforme para este Ejemplo y reducir el material extraño y malas hierbas, se agita semilla comercial entera de fenogreco marroquí en cribas, se selecciona y la semilla que pase a través de una criba N° 6 pero sea retenida por una criba n° 10 B.S. 410. La semilla utilizada todavía contiene una pequeña cantidad de semilla de malas hierbas.

20. Procedimiento A

25. Se hierve 1 kg de semilla durante 2 horas bajo reflujo con una mezcla de 4 l. de agua corriente y 820 ml de ácido clorhídrico concentrado en un matraz de 10 l. que luego se enfría a temperatura ambiente (18-20°C) bajo un grifo abierto. Se filtra la mezcla en la bomba y se lava con agua, luego con solución de amoniaco al 5%, y se escurre bien antes de secarlo en una corriente de aire caliente a 70°C durante toda la noche. El material insoluble en ácido (peso de unos 300

22 OCT 1954

- g) se pulveriza en un molinillo de mano Glen Creston, luego se carga ligeramente en extractor soxhlet y se macera con nafta fría (por ejemplo 40-60°C) en el soxhlet. Después de dos horas se inclina el soxhlet para
5. dejar que, la solución de petróleo descargue para dar el Extracto N° 1 (véase más adelante) y luego se continua la extracción con nafta caliente en el soxhlet continuamente de la manera corriente durante (a) 2 horas y (b) 24 horas, para conseguir los Extractor 2 y 3 (véase más adelante). La maceración en frío inicial elimina suficiente aceite para impedir que el matraz hierva con intermitencia y con peligro durante los periodos de extracción caliente. Los extractos N° 1, 2 y 3 se trabajan por separado pero por el mismo procedimiento: Se elimina
10. algo de disolvente y al reposar a temperatura ambiente (18-20°C) los extractos dan diosgenina cristalina bruta. El peso total 4,77 g., 0,53% b.l.h., después de lavar con nafta y acetona y secar a 70°C, p.f. 190-191°C (Aparato de p.f. de Buchi). Aceite 70 g. 8% b.l.h. se
15. obtiene eliminando el disolvente de los líquidos madres.
- 20.

Procedimiento B: Incubación con escualeno durante 24 horas

- Se añade 1 kg de semilla entera a 4 l. de agua corriente en un matraz de 10 l. en una camisa isotérmica. Se añaden 100 ml de escualeno y se
25. caliente la mezcla agitando mecánicamente durante 15 minutos hasta que la temperatura sea de 37°C, en cuyo momento se deja en una incubadora (en la oscuridad) a dicha temperatura. Después de 4 horas se agita de nuevo la mezcla mecánicamente durante 15 minutos, mientras su
30. temperatura se mantiene a 37°C con la ayuda de la camisa.



El matraz se devuelve entonces a la incubadora durante unas 20 horas adicionales. Después se añaden 820 ml de ácido clorhídrico y se hierve la mezcla bajo reflujo durante dos horas. En seguida se termina el aislamiento del aceite y diosgenina según el procedimiento A. El rendimiento de diosgenina bruta cristalina es de 5,72 g, 0,64% b.l.h. casi incolora, p.f. 189-190°C. Este rendimiento es 20% mejor que el dado en el procedimiento A.

5.

Procedimiento C: Incubación durante 24 horas sin escualeno

10.

Se sigue el procedimiento B pero en ausencia de escualeno. La producción de diosgenina cruda cristalina es de 5,25 gms, 0,58% m.f.b. casi incolora, p.f. 189-190°C. Este rendimiento es un 10% mejor que el del procedimiento A.

15.

EJEMPLO 12

Diosgenina marcada con C<sup>14</sup> por germinación de semillas de *Balanites aegyptiaca* a 30°C.

20.

a) Acetato de sodio-2-C<sup>14</sup>: Se esterilizan superficialmente 20 semillas enteras frescas (de un peso sobre 10 g., contenido de humedad 6%) de *Balanites aegyptiaca* recién abiertas, y se distribuyen en pares con precauciones asépticas dentro de diez matraces cónicos de ancha boca de 100 ml tapados, conteniendo cada uno 10 ml de solución estéril de acetato de sodio -2-C<sup>14</sup> de actividad 2µc. Los matraces se ponen aparte en una incubadora (en la oscuridad) a 30°C durante 7 días. Al final de este tiempo han germinado claramente un 50% de las semillas y muestran radículas de una longitud de 1 cm o más. Después todas las semillas se reúnen en un embudo y se lavan bien con agua antes de secarlas a 70°C duran-

25.

30.



- te una noche. El material seco se aplasta y desengrasa por extracción con nafta (por ejemplo 40-60°C) en un soxhlet durante 24 horas, (se eliminan las grasas, esteroides e hidrocarburos marcados antes de hidrólisis
5. ácida con reflujo de ácido clorhídrico 2N durante 2 horas. La substancia neutralizada e insoluble en ácido da una sapogenina bruta por extracción con nafta (por ejemplo 40-60°C) durante 24 horas. Después de la eliminación del disolvente el residuo se disuelve en benceno:cloroformo,
10. 7:3, aplicado a una columna de alúmina (15 g) y la banda verde-amarillenta se eluye con la mezcla del disolvente para dar diosgenina contaminada con un pequeño porcentaje de esterol. La diosgenina se recristaliza a actividad específica constante de acetona, isopropanol y etanol.
15. Se recuperan 0,106 g., 1,13% b.l.h. de diosgenina marcada, teniendo una actividad de  $2,4 \times 10^2$  impulsos por minuto por mg.

b) Acido DLmevalónico-2-C<sup>14</sup>

20. Se repite el procedimiento anterior usando un total de 36  $\mu$ c del ácido DL (18  $\mu$ c del isómero biológicamente activo) en solución acuosa como su sal sódica. Como antes 50% de las semillas muestran una radícula de longitud de 1 cm o más al final de los 7 días a 30°C se logró, pero una incorporación mucho más
25. alta en la fracción de sapogenina bruta y en la diosgenina aislada que con el acetato marcado: Se recuperó 0,128 g. de diosgenina marcada, 1,36% b.l.h. teniendo una actividad de  $6,0 \times 10^3$  impulsos por minuto por mg.



EJEMPLO 13

C<sup>14</sup> diosgenina marcada por germinación de semilla de fenogreco a 25°C

5. Se esterilizan superficialmente  
40 gr de semilla entera de fenogreco marroquí y se in-  
cuba durante 7 días a 25°C en una solución estéril de  
agua corriente que contiene 20 µc de sal sódica del  
ácido DL mevalónico marcado con C<sup>14</sup> (10 µc del isómero  
10. biológicamente activo) mientras está expuesto a la luz  
(2880 lúmenes por metro<sup>2</sup>). Después de 7 días la germi-  
nación era esencialmente de 100% y las sapogeninas mar-  
cadas se recuperaron por un procedimiento similar al  
usado en el Ejemplo 12.

15. Diosgenina = 0,25 g., 0,70% b.l.h., actividad espe-  
cífica  
2,98 x 10<sup>3</sup> impulsos por minuto por mg.

También se recupera gitogenina de  
actividad específica = 1,59 x 10<sup>3</sup> impulsos por minuto  
por mg.

20. N O T A

25. Descrita suficientemente la natura-  
leza del invento, así como la manera de realizarlo en  
la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones  
anteriormente indicadas son susceptibles de modifica-  
ciones de detalle en cuanto no alteren su principio  
fundamental. También se hace constar que el invento co-  
rresponde a una solicitud de patente presentada en In-  
glaterra con fecha 22 de Octubre de 1.965 n° 44939/65,  
acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden  
30. los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que



5. constituye la esencia del referido invento, y por lo que se solicita patente de invención por 20 años en España, sobre: "Procedimiento para extraer de semillas saponinas o sapogeninas esteroidales", caracterizándose por lo siguiente:
10. 1ª.- Procedimiento para extraer de semillas saponinas o sapogeninas esteroidales, caracterizado porque comprende el tratamiento de la semilla en una forma sin triturar sea con un disolvente de saponinas para dar una solución de saponina o con una substancia capaz de hidrolizar los enlaces glucosídicos para dar un hidrolizado que contiene sapogenina.
15. 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la semilla se deriva de la Trigonella foenum-graecum.
20. 3ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la semilla está presente como semilla entera o embrión entero o semilla fragmentada o embrión fragmentado.
25. 4ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la semilla se incuba en presencia de un medio acuoso añadido antes de la extracción o hidrólisis.
- 5ª.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la incubación y/o hidrólisis se lleva a cabo en presencia de escualeno (2,6,10,15,19,23-hexametil-tetracosano) o un precursor esteroide en el camino biosintético de la saponina.

22 OCT 1955



- 5. 6<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado porque la incubación y/o la hidrólisis se llevan a cabo en presencia de escualeno, geraniol, o ácido mevalónico o sus derivados.
- 5. 7<sup>a</sup>.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, caracterizado porque el precursor esteroide se añade en forma de un producto natural que contiene el precursor en forma disponible.
- 10. 8<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se extraen semillas de Trigonella foenum-graecum mediante la incubación de las mismas sin triturar a temperaturas de hasta 40°C por espacio de siete días en presencia de agua añadida, tratándose el producto incubado con ácido clorhídrico diluído y extrayendo el residuo libre de ácido insoluble en ácido con un disolvente orgánico para proporcionar una solución de diosgenina.
- 15. 9<sup>a</sup>.- "Procedimiento para extraer de semillas saponinas o sapogeninas esteroideas", tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria.
- 20.

Esta memoria consta de veintisiete hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,

22 OCT. 1955

25.

NATIONAL RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION

J. GOMEZ ACEBO Y MODEI  
p. Firmado: F. Hernández Ruiz