



P A T E N T E D E I N V E N C I Ó N
=====

a favor de

INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE CHIMIQUE APPLIQUEE - de nacionalidad
francesa - domiciliada en 12, Quai Henri IV, PARIS (Francia),

por :

"Procedimiento para el tratamiento de todas las especies de adormide-
ras, incluso las cultivables en regiones templadas, para aumentar su
contenido en alcaloides extraíbles".

-----:oOo:-----

M e m o r i a d e s c r i p t i v a .

El presente invento se refiere a un nuevo procedimiento para
extraer de adormideras los alcaloides que contienen.

Es sabido que, según las especies de adormideras, se obtienen



rendimientos muy distintos en alcaloides totales de opio; mientras que el Papaverum album ó somniferum da rendimientos óptimos, en general, otras especies, como P. nigrum, no dan más que cantidades escasas inexplotables.

5 Se ha tratado de seleccionar adormideras de la segunda especie para obtener otras mejoradas en proporción de alcaloides, y cultivables en regiones templadas. Estas investigaciones son lentas y difíciles, y la producción de alcaloides del opio sigue concentrada actualmente en comarcas de condiciones climáticas particulares, favorables al desarrollo del P. album con rendimiento máximo.

10 Se ha comprobado, y este es el objeto principal del presente invento, que se podían mejorar con ventaja los rendimientos en alcaloides de las diversas especies de adormideras, sometiendo el material recolectado en condiciones normales, y antes de todas las operaciones de extracción de alcaloides, a una fermentación por microorganismos, que

15 aumenta notablemente el contenido de las adormideras en alcaloides extraíbles.

Las adormideras tratadas pueden estar en diversos grados de maduración.

20 Una ventaja de este procedimiento es que permite utilizar, en condiciones de explotación rentable, un material procedente de especies de adormideras elegidas para ser cultivadas en condiciones climáticas amplias, y en particular en cultivos normales en las regiones templadas.

25 Otra ventaja apreciable, en ciertas especies de adormideras, como el P. nigrum, pobres en alcaloides, proviene de que el material de cultivo es prácticamente inexplotable antes de su fermentación en instalaciones de carácter industrial, lo que permite intervenir eficazmente la producción de alcaloides.

30 El invento tiene asimismo por objeto el empleo, para la fermentación



tación del material vegetal (esencialmente cápsulas de adormidera muy ricas en alcaloides, y también tallos y raíces), de microorganismos aislados a partir de cápsulas de adormidera naturalmente contaminadas por mohos. Entre los mohos aislados, se han caracterizado muy en particular hongos del género Alternaria, como A. tenuissima y A. chartorum, sin que estas indicaciones se puedan considerar como limitativas en el marco del presente invento.

Un segundo objeto del invento concierne a la conservación y al desarrollo de las cepas de microorganismos precitadas. Se sabe, en efecto, que las cepas de tales microorganismos, y en particular de ciertas variedades de Alternaria, tienden a desarrollarse por cultivos y resiembras, en forma vegetativa a expensas de la esporulación. Se ha visto que, para las aplicaciones prácticas objeto del presente invento, es posible conservar y desarrollar convenientemente las cepas de los microorganismos característicos del invento mediante resiembra en un medio natural, a base de polvo de adormidera, ó en un medio artificial muy empobrecido en sustancias nutritivas, a fin de mantener los microorganismos en estado de vida retardada. Las cepas recién aisladas se pueden conservar igualmente tras liofilización.

El procedimiento utilizado para la fermentación de adormideras es clásico. Consiste en incubar el material vegetal, previamente disperso en agua, ó sea sumergido, en fermentación aerobia, es decir, con aportación de aire previamente esterilizado. Naturalmente, la dispersión del material vegetal en agua se ha sembrado en microorganismos. La fermentación se conduce a una temperatura variable entre 5° y 40°, y mejor constantemente comprendida dentro de los 25° a 30 °C. La incubación puede durar de un día a un mes, con preferencia de seis a diez días. Al final del periodo de incubación, se separa por filtración ó aireación una parte líquida y otra sólida; esta última consiste en vegetal tratado y micelio de los hongos. Ambas partes se someten a tra-

33859



tamientos de extracción, a fin de aislar los alcaloides totales.

Una característica del procedimiento de fermentación utilizado reside en que se puede practicar tanto sobre la dispersión previamente esterilizada del material vegetal como sobre un medio idéntico no esterilizado, siempre que se comience por una siembra (micelio y esporas) bastante rica en microorganismos seleccionados, a fin de asegurar un desarrollo vigoroso, rápido y predominante.

Los alcaloides totales de las fracciones aisladas tras fermentación se extraen de acuerdo con procedimientos conocidos de la técnica actual, por ejemplo, conforme a un método modificado según STAS-OTTO, Ann.Chem. 1856,100:44, que comprende tres extracciones sucesivas con disolventes orgánicos tales como cloroformo con las fracciones prealcalinizadas, y otra más con cloroformo despues de acidificar.

En los ejemplos que se insertan a continuación para ilustrar el presente invento, se exponen separadamente los resultados totalizados de las extracciones alcalinas y de las ácidas, a fin de tener en cuenta el hecho comprobado de que, en los extractos del material fermentado obtenidos despues de acidificar, se encuentran cantidades pequeñas de material no alcaloídico reveladas por cromatografía. Tales materias se pueden atribuir a los micelios de hongos que se someten simultáneamente a extracción; un ejemplo de esos productos es el ácido tenuazónico (aminoácido extraíble en medio ácido).

EJEMPLO 1

Se ponen en suspensión, en 5 lt de agua destilada, 400 g de cápsulas secadas y pulverizadas de un lote recolectado de Papaverum nigrum. El medio se esteriliza a 120 °C durante veinte minutos, y se siembra luego con una cepa específica de Alternaria. Se inouba en aerobiosis durante ocho días a 25°-27 °C. El material obtenido despues de fermentar se trata, en comparación con 400 g de cápsulas del mismo lote no

- 5 338503



fermentadas, con objeto de extraer los alcaloides totales. Los resultados de las extracciones, en tantos por 100 del material de partida, se resumen en la tabla siguiente :

Disolvente de extracción	pH de extracción	Material fermentado (% de extracto)	Material no fermentado (% de extracto)
Cloroformo	Alcalino	0,240	0,028
Benceno	Alcalino	0,101	0,013
Isobutanol	Alcalino	0,289	0,050
Totales parciales		0,630	0,091
Cloroformo	Ácido	0,212	0,088
Totales generales		0,842	0,179

En este ejemplo, la fermentación ha multiplicado por 6,9 el rendimiento de las extracciones alcalinas, y por 4,7 el rendimiento total.

EJEMPLO 2

Se tratan por fermentación, como en el ejemplo anterior, 400 g de cápsulas secadas y pulverizadas de un lote recolectado de Papaverum album, y el material obtenido después de fermentar se compara asimismo en cuanto a su rendimiento de extracción por 100, con las cápsulas iniciales del mismo lote no tratadas. Los resultados obtenidos se resumen en la siguiente tabla :



Disolvente de extracción	pH de extracción	Material fermentado (% de extracto)	Material no fermentado (% de extracto)
Cloroformo	Alcalino	0,295	0,138
Benceno	Alcalino	0,130	0,042
Isobutanol	Alcalino	0,262	0,060
Totales parciales		0,687	0,240
Cloroformo	Ácido	0,238	0,125
Totales generales		0,925	0,365

En este ejemplo, la fermentación ha multiplicado por 2,8 el rendimiento de las extracciones alcalinas, y por 2,5 el rendimiento total.

Se ha tratado también de precisar el papel de ciertos factores que influyen ventajosamente en el proceso de fermentación, y por ello en los rendimientos en alcaloides. Estos factores son las condiciones de fermentación, el estado de división de las cápsulas, la agitación mecánica del medio de cultivo, y la naturaleza de las cepas microbianas utilizadas. Las extracciones de alcaloides efectuadas con adormideras fermentadas han permitido además precisar en los alcaloides totales obtenidos la relación entre las dos clases isoquinoleica y fenantrénica.

Se ha confirmado que la fermentación del material vegetal podría conducirse con ventaja someténdolo a una esterilización previa. Sin carácter limitativo, esta esterilización se puede realizar manteniendo el material vegetal a 120 °C durante tres horas; lo cual no excluye otras técnicas en vigor, como el empleo de radiaciones. Esta esterilización previa ofrece la ventaja de impedir el desarrollo de di-



versas bacterias con efecto depresivo sobre el aumento del contenido en alcaloides del producto fermentado, así como el desarrollo de mohos indiferentes.

5 Se ha comprobado que la fermentación aerobia de adormideras en inmersión, es decir, haciendo fermentar el material vegetal disperso en agua, como queda descrito, se conduce ventajosamente añadiendo al medio fermentable cierta cantidad de una solución nutritiva para los microorganismos que aseguran la fermentación, por ejemplo, y sin limitación, la utilizada en los siguientes ejemplos 3 y 4.

10 Tambien se ha comprobado que el proceso de fermentación de las adormideras en inmersión se conducía mejor utilizando durante ella un mecanismo de agitación que garantice un batido suficiente. Tal agitación del medio mejora el rendimiento en alcaloides. Esta agitación se puede producir por un medio mecánico, ó utilizando la energía del aire estéril inyectado en el medio, ó por cualquier otro procedimiento conocido. Además, ofrece la ventaja de permitir una evacuación mejor de las calorías desprendidas en el curso de la fermentación.

20 Tambien se ha comprobado que el estado de división del material vegetal desempeña un papel importante en el aumento del contenido en alcaloides del medio fermentado, y que cuanto más fino es dicho material, mayor es el aumento. Por otra parte, esa mayor división del material, en la etapa ulterior de extracción de los alcaloides, permite llevarla más lejos.

25 Igualmente se ha comprobado que el proceso de fermentación se podía realizar tambien en condiciones distintas de las descritas a propósito de las adormideras sumergidas, con aumento asimismo considerable del contenido en alcaloides extraíbles.

30 En efecto, se ha descubierto que la fermentación era posible con éxito empleando adormideras trituradas, eventualmente esterilizadas, y simplemente humedecidas luego entre 20 y 100 % en peso con agua,



ó mejor con un medio nutritivo de los microorganismos, ó sembradas en ellos. En este caso, las adormideras se trituran ligeramente, de modo que la dimensión más bien grande de los trozos de cápsula permita el paso del aire esterilizado, previamente humedecido pasándolo a través de agua. Tal fermentación aerobia de las adormideras humectadas 5 requiere cantidades de aire esterilizado y humedecido del orden no limitativo de 0,5 a 50 litros por minuto (para cantidades de vegetales en fermentación de 1 kg), y mejor de 6-8 lt por minuto. Las condiciones de temperatura y de tiempo de fermentación son las mismas que para 10 fermentar adormideras sumergidas. El volumen del medio en fermentación, y por tanto, del aparato necesario, es menor que en el estado sumergido, lo cual resulta ventajoso.

Se han efectuado igualmente trabajos con relación al aislamiento de mohos del género Alternaria a partir del material vegetal. Durante tres años, se han realizado cultivos y resiembras de una decena 15 de variedades, entre ellas la P1 (referencia IRCHA), utilizada en los ensayos de fermentación de adormideras reseñados en los ejemplos siguientes 3 y 4. Esta cepa se ha depositado en la colección del Laboratorio de Criptogamia del Museo de Historia Natural de París, donde 20 está registrada con el número 1927.

Por otra parte, se pueden tratar conforme al invento adormideras en diversos grados de maduración, pero mejor maduras por completo.

Los ejemplos siguientes ilustran el presente invento, sin limitarlo. En particular, pueden emplearse otros mohos que aseguren la fermentación. 25

EJEMPLO 3 *****

El experimento comprende tres muestras a, b, c, de 1 kg. cada una, de un mismo lote de cápsulas de Papaverum album groseramente trituradas, con granulometría de 0,5 a 2 cm. El material vegetal contenía 30

338593



alrededor de 10 % de agua.

El lote a testigo se sometió a las operaciones de extracción sin fermentación previa.

5 El lote b fue sometido, en las mismas condiciones que el lote c siguiente, a seis días de fermentación, a partir de su flora natural, sin esterilización ni siembra preliminares.

10 El lote c se ha esterilizado manteniéndolo tres horas a 120°. Después de esterilizado y humedecido como después se indica, se sembró con una Alternaria (cepa P1, referencia IRCHA, antes mencionada), y se sometió a seis días de fermentación.

15 Los lotes b y c se han hecho fermentar sin agitación mecánica. La dimensión más bien grande de los trozos de cápsulas previamente humedecidos asegura el paso del aire esterilizado y humectado, como se ha descrito, inyectado a través de la masa, a razón de 6 a 8 litros por minuto en este ejemplo, y que para la cantidad de material tratado puede ser de 0,5 a 50 litros por minuto.

20 La humectación de las cápsulas se elevó a 75 % empleando un medio nutritivo compuesto de nitrato de amonio (0,3 g), nitrato de potasio (0,3 g), fosfato dipotásico (1 g), con 20 cm³ de solución de oligoelementos y agua ordinaria (hasta completar un litro). El pH del medio nutritivo se ajustó a 6.

25 Esta solución de oligoelementos se prepara disolviendo en agua ordinaria 0,05 g de molibdato de potasio, 0,05 g de borato de sodio, 0,05 g de nitrato de cobalto, 0,05 g de sulfato de cadmio, 0,05 g de sulfato de cobre, 0,05 g de sulfato de cinc, y 0,05 g de sulfato de manganeso. Se añade una gota de percloruro de hierro, y se completa hasta un litro con agua ordinaria. Se hace pasar por esta solución una corriente de anhídrido carbónico, y se filtra.

30 El aire esterilizado que se inyecta, se humedece haciéndolo pasar por una capa de agua situada debajo de la masa de las cápsulas.



La temperatura de la masa en fermentación se mantiene a unos 26 °C mediante un dispositivo de regulación. Normalmente se aprecia un aumento de temperatura de varios grados centígrados en el curso del primer día de fermentación.

5 Los tres lotes, después de fermentar, se someten al mismo procedimiento de extracción descrito seguidamente, el cual difiere del de los ejemplos 1 y 2.

Se someten los tres lotes a dos maceraciones en agua pura, seguidas de una tercera en solución de ácido clorhídrico a 2,23 % en peso.

10 Los filtrados de las tres maceraciones de cada uno de los diferentes lotes se reúnen, se alcalinizan con amoníaco hacia un pH 9, y se extractan con ayuda de un disolvente compuesto de cloroformo y de alcohol isobutílico a 3:1 en volumen. Evaporando el disolvente, se obtiene un residuo seco que corresponde a los alcaloides totales, y que se redissuelve en cloroformo. Esta solución clorofórmica de las bases alcaloídicas se extrae luego con ácido clorhídrico a 2,25 % en peso. El conjunto de los alcaloides vuelve entonces a la fase acuosa ácida.

20 Esta fase acuosa ácida se lava con cloroformo, lo cual permite extraer en la fase orgánica las bases alcaloídicas del grupo isoquinoleico (noscapina y papaverina). El extracto clorofórmico se lava con agua, se seca sobre sulfato de sodio, y se evapora hasta sequedad. El residuo seco obtenido corresponde sensiblemente a la fase isoquinoleica.

25 El extracto acuoso ácido que acaba de agotarse con cloroformo, se alcaliniza con amoníaco hasta un pH 9. Esta solución acuosa básica se lava entonces con una mezcla de cloroformo y alcohol isobutílico a 3:1 en volumen, lo que permite extraer en la fase orgánica las bases alcaloídicas del grupo fenantrénico (morfina y codeína). Después de lavar con agua, esta fase orgánica se seca sobre sulfato de sodio y se evapora hasta sequedad. El extracto seco obtenido corresponde sensiblemente a la fase fenantrénica.

30



El peso de los extractos secos así obtenidos sirve para calcular los rendimientos.

La cromatografía en capa delgada revela que el extracto de la solución acuosa ácida corresponde con bastante exactitud al grupo noscapina-papaverina, mientras que el de la solución alcalinizada corresponde sensiblemente al grupo morfina-codeína.

Los resultados del ejemplo 3 se han reunido en la tabla siguiente :

Muestra	EJEMPLO 3 Alcaloides (g/kg de cápsulas)			Factor de multiplicación de los rendimientos en alcaloides totales
	Extracto en medio ácido	Extracto en medio alcalino	Extractos totales	
<u>a</u> (testigo)	0,85	3,62	4,47	
<u>b</u> (flora natural)	0,76	2,62	3,38	0,75 respecto a <u>a</u>
<u>c</u> (siembra con <u>Alternaria P1</u>)	5,40	5,00	10,40	{ 2,33 " " <u>a</u> { 3,08 " " <u>b</u>
	(1)	(2)		

(1) Factor de multiplicación del rendimiento respecto a a = 6,35.

(2) " " " " " " " a a = 1,38.

La fermentación del ensayo b a partir de la flora natural ha provocado una proliferación intensa de bacterias. El menor rendimiento con relación al ensayo testigo a tiende a demostrar la acción depresiva de la población bacteriana. Por eso conviene utilizar cepas específicas, como las del grupo Alternaria.

En el ensayo c el material vegetal se ha esterilizado, y sembrado después con Alternaria P1 antes de someterlo a fermentación.

338593¹⁴



En este medio estático (sin agitación mecánica), los mohos no se han desarrollado más que en ciertas zonas de la capa superficial de la masa. A pesar de este desarrollo limitado, el rendimiento global de la extracción se ha multiplicado por 2,33 respecto al testigo a.

5

EJEMPLO 4

=====

El experimento comprendía dos muestras de 1 kg de Papaverum album, procedentes del mismo lote utilizado en el ejemplo 3.

10 Las dos muestras de cápsulas se trituraron finamente y se pulverizaron para obtener una granulometría comprendida entre 1/50 y 1 mm, sin que estas dimensiones sean limitativas.

La muestra testigo a se extrae sin fermentación previa.

15 La muestra b previamente esterilizada, se somete a fermentación, sumergida en agua, a razón de 1 kg de cápsulas, con 10 % en peso de humedad, por 15-20 litros del medio nutritivo descrito en el ejemplo 3.

20 Este medio de fermentación se siembra con la misma cepa de antes, y se hace fermentar con agitación mecánica, por ejemplo, mediante un motor que impulsa dos hélices, situadas respectivamente en el fondo y en el centro del fermentador. La velocidad de rotación era de 15-20 rpm, sin que estos valores sean limitativos. Las condiciones de temperatura, de aireación y de lapso de fermentación eran iguales a los del ejemplo 3.

25 El modo de extracción es idéntico al descrito en el ejemplo 3, y en el proceso interviene el medio líquido, después de la fermentación, que equivale a la primera de las dos maceraciones en agua.

Los resultados del ejemplo 4 se han resumido en la tabla siguiente :

3385913



5

Muestra	EJEMPLO 4 Alcaloides (g/kg de cápsulas)			Factor de multiplicación de los rendimientos en alcaloides totales.
	Extracto en medio ácido	Extracto en medio alcalino	Extractos totales	
<u>a</u> (testigo)	1,42	4,65	6,07	
<u>b</u> (siembra con Alternaria P1)	10,51 ⁽¹⁾	10,63 ⁽²⁾	21,14	3,48 respecto a <u>a</u>

10

(1) Factor de multiplicación del rendimiento respecto a a = 7,4.

(2) " " " " " " " a = 2,28.

15

Los resultados del ejemplo 4, comparados con los del ejemplo 2, confirman, entre otros extremos, la influencia favorable de los siguientes factores conjugados : estado de división acentuada del material vegetal, agitación del medio en fermentación, empleo de una solución nutritiva, y naturaleza de los mohos utilizados.

20

N O T A

Se reivindica como objeto de la presente patente :

25

1. - Procedimiento para el tratamiento de todas las especies de adormideras, incluso las cultivables en regiones templadas, para aumentar su contenido en alcaloides extraíbles; caracterizado porque las adormideras recolectadas en condiciones normales, se someten antes de cualquier extracción de alcaloides, a una fermentación por microorganismos que tiene por efecto aumentar notablemente el contenido de las adormideras en alcaloides extraíbles.

30

2. - Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque los microorganismos utilizados son mohos aislados a partir de las



cápsulas de adormidera naturalmente contaminadas por los mohos.

3. - Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por-
que los microorganismos utilizados son mohos del género Alternaria.

5 4. - Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por-
que se emplea la cepa Alternaria tenuissima.

5. - Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado por-
que se emplea la cepa Alternaria chartorum.

10 6. - Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por-
que las cepas de mohos aisladas de las cápsulas de adormidera se conser-
van y desarrollan por resiembra en un medio natural a base de polvo de
adormidera.

15 7. - Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por-
que las cepas de mohos aisladas de las cápsulas de adormidera se conser-
van y desarrollan por resiembra en un medio artificial muy empobrecido
en sustancias nutritivas.

8. - Procedimiento según la reivindicación 2, caracterizado por-
que las cepas de mohos recién aisladas de las cápsulas de adormidera se
conservan por liofilización.

20 9. - Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por-
que las adormideras se someten a una fermentación aerobia en estado de
inmersión, y porque para ello se dispersa en agua el material vegetal
constituido por las adormideras, se siembra éste material de microorga-
nismos, se incuba en fermentación aerobia en estado sumergido, con in-
troducción de aire esterilizado, a una temperatura comprendida entre 5°
25 y 40°C, durante un lapso variable entre un día y un mes, y se somete
después el producto de la fermentación a tratamientos de extracción de
alcaloides.

30 10. - Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado
porque la incubación tiene lugar entre 25° y 30 °C, y dura de seis a
diez días.



11. - Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque la dispersión de material vegetal se esteriliza antes de sembrarla de microorganismos.

5 12. - Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque la dispersión de material vegetal no se esteriliza, sino que se siembra abundantemente de microorganismos.

13. - Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque se añade al medio fermentable una solución nutritiva para los microorganismos que asegura la fermentación.

10 14. - Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque se agita el medio de fermentación utilizando cualquier recurso apropiado.

15 15. - Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado porque el material vegetal se divide finamente por trituración y pulverización antes de someterlo a fermentación.

16 16. - Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las adormideras se someten a una fermentación aerobia en estado húmedo, y porque para ello se humedecen las adormideras trituradas hasta una proporción de 20 a 100 % en peso, con agua ó con un medio nutritivo de cultivo de los microorganismos; se siembran de microorganismos, se incuban en fermentación aerobia, simplemente humedecidos de este modo, con introducción de aire esterilizado y previamente humedecido haciéndolo pasar a través de agua, a una temperatura comprendida entre 5° y 40 °C, durante un lapso variable entre un día y un mes, y se somete 20 luego el producto de la fermentación a tratamientos de extracción de 25 alcaloides.

17. - Procedimiento según la reivindicación 16, caracterizado porque las adormideras trituradas se esterilizan antes de humedecerlas.

18. - Procedimiento según la reivindicación 16, caracterizado 30 porque las adormideras se trituran simplemente en partículas gruesas.

338593



19. - Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque se emplea la cepa Alternaria P1, referencia IRCHA.

20. - Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque las adormideras tratadas se hallan en diversos estados ó grados de maduración.

21. - Procedimiento para el tratamiento de todas las especies de adormideras, incluso las cultivables en regiones templadas, para aumentar su contenido en alcaloides extraíbles.

Esta memoria consta de dieciséis páginas, escritas por una sola cara.

BARCELONA,

14 MAR. 1967

P. A.