

376091

81 ENE 1962



PATENTE DE INVENCION

Ces 53-0/9621.

Memoria Descriptiva

sobre:

SECCION TECNICA
CLASIFICACION I.P.C.
CLASE <u>A 61</u>
SUBCLASE <u>k</u>

PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN EXTRACTO VEGETAL.

=====

Solicitante: INSTITUT DE RECHERCHES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES
 APPLIQUEES (I.R.C.E.B.A.), entidad francesa,
 residente en 8, rue Godot-de-Mauroy, 75 - PARIS 9e,
 Francia.

=====

**POOR
QUALITY**

376091

31 ENE.



- La presente invención se refiere a una preparación medicinal y a extractos de planta particulares así como a la utilización de los citados extractos en medicina, particularmente en el tratamiento de los trastornos glandulares, más particularmente aún en el tratamiento de la hipertrofia de la próstata. La presente invención se refiere igualmente a un procedimiento para preparar los citados extractos y las fracciones intermedias obtenidas durante el procedimiento y que contienen los ingredientes activos.
- 5.
10. En la especificación completa británica nº 25.893 depositada el 9 de junio de 1.967, se ha descrito una preparación medicinal que comprende como ingrediente activo una parte de una planta africana de la familia de las rosáceas, tribu de las emigdalesas, género *Prunus Africana*, en particular una planta conocida bajo el nombre de *Prunus Africana* (Hook) F.Kelkm y *Pygeum Africanum* (Hook) y todas las especies emparentadas, encontradas en particular en Africa del Sur, y en el Este africano.
- 15.
20. En la especificación completa precitada, se ha descrito en particular un extracto de la planta dotado de una actividad y constituido por una "fracción esterólica total", así como a su procedimiento de preparación, caracterizado porque se efectúa la extracción de la planta con un disolvente, en particular, el cloroformo, y se prosigue con una cromatografía sobre columna de sílice utilizando de preferencia el ciclohexano y el benceno como agente de elu-
- 25.

376091

81 ENE. 1971



5. ción. La fracción esterólica total era de este modo un extracto parcialmente purificado en forma de un polvo blanco bien cristalizado que contiene una mezcla de esterol y de otros constituyentes no identificados, que representan el 0,05 % en peso del polvo de planta seco y que muestra en cromatografía sobre capa delgada de silicagel un valor $R_f = 0,28$ aproximadamente.

10. Según la presente invención, se propone ahora un nuevo procedimiento para preparar extractos de la planta *Prunus Africana* precitada y de las especies emparentadas, constituidos por una "fracción purificada", procedente de la fracción esterólica total descrita en la especificación completa nº 25.983, consistiendo el citado procedimiento en una purificación suplementaria.

15. La presente invención se refiere igualmente a la citada fracción purificada y a las composiciones farmacéuticas que la contienen, útiles más particularmente por su actividad en el tratamiento de las enfermedades citadas más arriba.

20. En el ámbito de la presente invención, se ha puesto en evidencia que la actividad del extracto de planta definido anteriormente es debida en efecto a la citada fracción purificada.



La solicitante ha puesto en evidencia ahora en efecto que la actividad del citado extracto de planta se debía más precisamente a ciertos de sus constituyentes con la exclusión del beta-sitosterol, que ha sido caracterizado en la fracción esterólica total. Los ensayos farmacológicos descritos a continuación han permitido demostrar que la fracción purificada según el procedimiento de la presente invención, con eliminación del beta-sitosterol, conserva íntegramente la actividad terapéutica de la fracción total. Esta nueva observación ha conducido así a la solicitante a proseguir y profundizar la experimentación ya comenzada con la fracción total en farmacología y en clínica.

El procedimiento de la presente invención consiste en que la fracción esterólica total, obtenida como consecuencia de la extracción por el cloroformo de una parte de la planta *Prunus Africana* o de especies emparentadas, seguido de una cromatografía en las condiciones indicadas más arriba, se somete a una purificación o separación final por recristalizaciones sucesivas a partir de etanol, acetona y a continuación de nuevo etanol.

De esta manera se eliminan los cristales de beta-sitosterol presentes en la fracción esterólica total y se obtiene la fracción purificada deseada. Esta está constituida por una mezcla siruposa recogida en las aguas madres de recristalización y que contiene esteroides.



A continuación se describe un ejemplo de preparación de la fracción purificada según la presente invención. El citado ejemplo está dado a título de ilustración solamente sin limitar en modo alguno la invención

5. en su alcance y su espíritu.

EJEMPLO

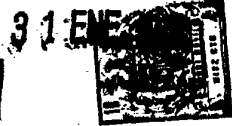
10. 100 g de polvo de corteza de *Pigeum Africanum* finamente triturados se extraen con cloroformo y el extracto pastoso obtenido con un rendimiento del 0,5 % con relación al peso del polvo de corteza de partida se somete consecutivamente a una operación de cromatografía sobre columna de sílice, en las condiciones definidas en los ejemplos 2 y 3 de la especificación completa nº 25.893.

15. De este modo se obtiene la fracción esterólica total con un rendimiento de 0,05 % con relación al peso del polvo de corteza de partida.

20. Se somete la fracción esterólica total en cantidad de 2.730 mg a cristalizaciones sucesivas: una vez en etanol, tres veces en acetona y, finalmente, una vez en etanol.

Eliminación del beta-sitosterol.

25. Las aguas madres dan de este modo sucesivamente cuatro porciones de cristales, que representan en total 675 mg, que se someten para caracterización a los ensayos siguientes:



La cromatografía en fase gaseosa efectuada según los métodos descritos en la especificación completa nº 25.893 muestra la gran pureza de los cristales obtenidos que es superior al 99%.

5. Las características físicas de los cristales son las siguientes:

Punto de fusión: 134 - 135°C.

Cristalizan en acetona y etanol.

Su naturaleza esteróidica se muestra por

10. la reacción de Liebermann positiva.

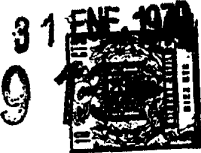
Además se ha obtenido su espectro de masa, espectro de R.M.N. y espectro I.R. Se ha medido su tiempo de retención en cromatografía en fase gaseosa.

15. En particular se ha hecho la valoración del beta-sitosterol por cromatografía en fase gaseosa de la fracción esteróidica total en las condiciones descritas en la especificación completa nº 25.893 precitada.

20. El método de valoración utilizado está fundado en el procedimiento de sobrecarga. A este efecto se prepara una solución titulada de la fracción esteróidica total, se la hace sufrir la cromatografía a una temperatura absolutamente estable y se recoge el pico del beta-sitosterol. Se añade a la solución una cantidad conocida de beta-sitosterol puro. Se hace volver a pasar la nueva solución así obtenida en cromatografía gaseosa en las condiciones precitadas. Se recoge de nuevo el pico que este vez

25.

37609



- es más elevado. Se mide la altura de los dos picos consecutivamente obtenidos y se calcula la diferencia de los valores observados. Esta diferencia corresponde a la cantidad de beta-sitosterol añadida. Basta entonces recurrir a una
5. regla de tres para encontrar las cantidades respectivas de beta-sitosterol y de residuos en una fracción dada puesto que las alturas de los picos son proporcionales a las cantidades de beta-sitosterol.

- Los resultados de los ensayos precitados
10. han permitido identificar los cristales obtenidos como anteriormente que eran de beta-sitosterol.

Extracto purificado.

- Las aguas madres conservan 396 mg de una mezcla siruposa susceptible de contener en el caso más
15. desfavorable 20 % de beta-sitosterol y en el caso más general 10 % de beta-sitosterol. La citada mezcla siruposa contiene con la exclusión del beta-sitosterol siete productos principales que se han puesto en evidencia por cromatografía.

20. La cromatografía sobre caps delgada tal como se ha descrito en la especificación completa británica nº 25.893, permite verificar la presencia de tres productos principales a parte del propio beta-sitosterol. El enriquecimiento según la invención tiene por consecuencia
25. la revelación de cuatro manchas suplementarias de produc-

31 EN



- 7 - 376091

to que existen en proporciones netamente inferiores.

Un primer trabajo ha consistido en fijar las proporciones relativas de cada uno de estos productos en la mezcla.

5.

Para 100 % de esteroides (a parte del betasitosterol) se han encontrado proporciones próximas a las siguientes:

T 1	10 %
T 2	6 %
T 3	8 %
T 4	4 %
T 5	8 %
T 6	24 %
T 7	40 %

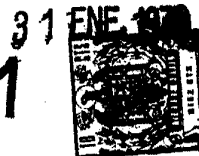
10.

(Las numeraciones T.1 a T 7 corresponden al orden de las manchas sobre cromatografía sobre capa delgada, los números más elevados corresponden a los Rf más elevadas).

15.

El enriquecimiento conseguido como se ha descrito más arriba ha conducido pues a separar siete productos, mientras que en el estado precedente aparecían solamente tres.

La cromatografía sobre columna de la mezcla de los siete manchas no nos ha permitido separar con suficiente fineza cantidades suficientemente importantes de cada uno de los productos.



También, se ha adoptado el método de separación por cromatografía sobre capa delgada preparativa.

Consiste en depositar sobre una línea horizontal por debajo de la placa una cantidad de la mezcla

5. que pese casi 100 mg. La mezcla se disuelve en un poco de cloroformo y a continuación se deposita por toques a todo lo largo de la línea de partida, cada toque depositado se seca inmediatamente.

10. Cuando este trabajo ha concluido, la cromatografía se efectúa como de ordinario con cloroformo como disolvente.

Los productos de la mezcla se separan entonces en banda según su Rf.

15. La placa se seca y a continuación la capa de sílice que soporta cada banda (bien visible merced al color del producto y merced al exámen en luz ultravioleta a 250 m μ) es raspada y eluida con cloroformo.

El cloroformo que contiene cada porción se evapora y el residuo se pesa.

20. Tras varias cromatografías sobre capa delgada preparativas sobre vidrio Merck con sílice como soporte G. 254 fluorescente de 2 mm de espesor, las siete porciones se obtienen puras.

25. La mancha T 3 corresponde al producto que se ha revelado más activo farmacológicamente. Esta sus-

376091



tancia está caracterizada por los elementos siguientes:

Un espectro de masa

Masa : 412

Picos importantes M/E : 256, 226, 218, 12

5.

un espectro de R.M.N.

Singulete 0,72 ppm metilo

Doblete 0,82 ppm metilo

Doblete 0,84 ppm metilo

Singulete 0,90 ppm metilo

10.

" 0,96 ppm metilo

" 1,18 ppm metilo

" 1,26 ppm metilo

Múltiplete centrado sobre 2,30 ppm

Múltiplete centrado sobre 5,80 ppm: protón

15.

oléfinico

y un espectro I.R. que se ha representado en

la figura 1 en la que se ha representado la transmitancia en función de la longitud de onda expresada en μ y del número de ondas expresado en cm^{-1} , siendo el disolvente

20. CCl_4 .

La mezcla siruposa obtenida según el procedimiento de la presente invención se ha sometido a los ensayos farmacológicos descritos a continuación, con el fin de controlar su actividad. Los resultados se han comparado a los de la fracción esterólica total (EST) de la especificación completa británica nº 25.893 y a los de la frac-

25.



ción esterólicas total acondicionada en forma de cápsulas con visitas a una administración en el caso del hombre (FST - cápsulas), cada cápsula tiene la formulación siguiente:

5. FST 25 mg
Aceite de cacahuete..... q.s.p. 100 mg

Revestimiento

10. Gelatina
Glicerina
Sorbato potásico
Bióxido de titanio
Azul de solantreno
Triazina
q.s.p. una cápsula terminada con 155 mg de peso medio.

15. Se recuerda que:

1.- El principio activo FST no presenta per os ninguna toxicidad aguda sobre la rata y el ratón a la dosis de 5 a 8 g/kg que corresponde a más de 4.000 veces la dosis terapéutica.

20. 2.- La FST-cápsula administrada per os a la rata y el ratón no determina ningún fenómeno de toxicidad aguda a las dosis de 6 a 8 g/kg que corresponde a más de 500 veces las dosis terapéuticas.

25. 3.- La administración a la rata durante un período de 52 días de 10 y 100 mg/kg de FST por vía oral



(6 a 60 veces la dosis terapéutica) no ha determinado ninguna modificación significativa en el crecimiento ponderal y el peso de los órganos tratados.

5. 4.- Los diferentes exámenes, practicados en el transcurso de esta experimentación de toxicidad de larga duración, han permitido comprobar:

10. a) un crecimiento ponderal normal en el caso de los animales tratados e incluso superior a los testigos en el caso de ratas machos que reciben la dosis de 600 mg/kg.

15. b) la ausencia de modificaciones significativas con relación al testigo, bien en el peso de los órganos, bien en su aspecto macroscópico, bien, finalmente, en el estudio microscópico de las diferentes preparaciones histológicas efectuadas.

c) el paralelismo entre animales testigos y animales tratados de las numeraciones globulares (hematias y leucocitos) efectuada en diferentes estados de la experimentación.

20. d) la estabilidad de los grados medios de colesterol total sérico comparativamente a los grados séricos de este cuerpo, en el caso de los animales testigos,

25. e) ninguna perturbación de las funciones de reproducción en el caso de los animales tratados.



5. Se ha procedido al ensayo farmacológico de la fracción purificada (FP) según la presente invención. En el transcurso de este ensayo, se ha comparado la actividad de la citada fracción con la del beta-sitosterol y con la de una mezcla de beta-sitosterol y de fracción purificada, en proporciones que corresponden a la presencia de cada uno de los constituyentes en la fracción esterólica total.

10. Se ha conducido la experimentación con cinco lotes de 18 animales, a saber ratas machos adultos, de un peso medio de 350 g, durante 50 días se han administrado los productos sometidos al ensayo seis veces por semana por medio de una sonda esofágica. Los productos se han administrado en las condiciones siguientes:

15. 1er lote:
Un lote testigo no ha recibido más que aceite de oliva neutro (excipiente)

2º lote:
Un lote ha recibido beta-sitosterol del comercio (2 mg/kg).

20. 3er lote:
Un lote ha recibido beta-sitosterol recristalizado según el ejemplo precipitado (2 mg/kg).

25. 4º lote:
Un lote ha recibido la fracción purificada recogida en las aguas madres según el ejemplo precipitado (0,4 mg/kg).

376091



5º lote:

Un lote ha recibido una mezcla de beta-sitosterol del comercio y de la fracción purificada definida en 4º (2+0,4 mg/kg).

5. Las dosis indicadas mas arriba corresponden a la proporción de cada uno de los constituyentes de la fracción esteróide total, la dosis activa de esta es proxima a 2 mg/kg.

10. La determinación de la actividad se ha efectuado por exámen de las modificaciones histológicas para cada lote de animales. Se han tomado de todos los animales sacrificados los dos lóbulos ventrales de la próstata que se han fijado inmediatamente al líquido Bouin Alcohol.

15. Los ensayos no muestran ninguna modificación histológica con los tres primeros lotes. Por el contrario, se observan idénticas modificaciones para los lotes nº 4 y 5. Estos resultados demuestran que la fracción activa se encuentre exclusivamente en las aguas madres en fracción purificada (4º lote) y que la adición de beta-sitosterol (5º lote) no añade nada a la actividad del producto.

25. Sin que la invención quede limitada a la hipótesis siguiente, se puede añadir que si el beta-sitosterol no tiene ninguna actividad deseada como



lo muestran las pruebas anteriores, estas revelan además que no hay sinergia entre el beta-sitosterol y la fracción purificada en el seno de su mezcla que reconstituye la fracción esterólica total.

5. Otra serie de experimentaciones farmacológicas ha tenido por finalidad estudiar y comparar la acción eventual sobre la estructura histológica de la prostata de ratas seniles:

10. a) de la fracción total en solución en aceite de cacahuete,

b) de la fracción purificada

La técnica empleada ha sido la siguiente:

1.- Experimentación de la fracción esterólica total FST:

15. El ensayo se ha efectuado durante un período de 50 días sobre ratas machos adultos, de un peso medio de 350 g.

Para esta experimentación se han utilizado 30 animales repartidos en tres lotes:

20. Lote nº 1:

- utilizado como lote testigo que ha recibido únicamente aceite de cacahuete a la dosis de 0,5 ml/kg.

Lote nº 2:

25. -que ha recibido, disuelto en el mismo

376091



- 15 -

volumen de aceite de cacahuete, una dosis de 1 mg/kg de FST

Lote nº 3:

5. - que comprende los animales tratados en las mismas condiciones con 10 mg/kg de FST.
- 2.- Experimentación de la fracción purificada (FP):

En ensayo se ha efectuado durante un período de 50 días sobre ratas machos de un peso medio de 450 g.

10. Los animales estaban repartidos en dos lotes de 20 unidades mantenidos en observación una semana antes del comienzo de la experimentación.

La repartición se efectuó según el método siguiente:

15. - 1 lote testigo de 20 animales que recibían únicamente aceite de cacahuete a la dosis de 0,5 ml/kg.

- 1 lote de ensayo tratado con 2 mg/kg de FP en aceite de cacahuete con el fin de guardar un volumen constante de administración de 0,5 ml/kg. La ingestión del producto se efectuó por medio de una sonda esofágica 6 veces por semana.

20. La determinación de las actividades se efectuó por los métodos ya descritos más arriba en los
25. ensayos precipitados.



Esta serie de ensayos farmacológicos han permitido llegar a las conclusiones siguientes:

- 1.- La fracción esterológica total administrada per os, durante 52 días, a ratas machos presentan una degeneración senil, a las dosis de 1 y 10 mg/día, determina en el caso de los animales tratados importantes modificaciones histológicas de la próstata. Se ha comprobado, en particular, un alargamiento de las células del epitelium de ribete con recuperación a un aspecto cilindro-cúbico desaparecido en el caso de los animales testigos. Estas modificaciones corresponden a una regeneración de las células de ribete de estos órganos con un aspecto cilindro-cúbico normal desaparecido en el caso de los animales testigos.

- 3.- Se puede deducir de estos nuevos ensayos que la fracción esterológica total a la dosis de 1 a 10 mg/kg/día, así como la fracción purificada que se extrae, a la dosis de 2 mg/kg/día, presenta propiedades muy netas de regeneración de la prostata en el caso de ratas a las cuales se administran estos productos, con una recuperación funcional de este órgano y una estimulación importante de la secreción.

- 4.- La administración de la fracción esterológica total se ha efectuado en solución en aceite de cachueta, es decir según la forma galénica de este producto,

25-4-72
- 17 376091



se podrian pués preveer, en medicina humana, resultados idénticos a los que se habían obtenido en experimentación animal, y este hecho se ha confirmado.

5. Por otra parte, se han efectuado ensayos farmacológicos sobre las fracciones aisladas por cromatografía. Los resultados muestran que los productos que corresponden a las manchas T 1, T 4 y T 7 son inactivos, mientras que los productos que corresponden a las manchas T 2, T 3, T 5 y T 6 son particularmente activos.

10. Se ha evaluado el coeficiente de actividad celular de las siete manchas aisladas teniendo en cuenta los puntos siguientes:

- el epitelio está aplastado sobre la mayor parte de la superficie de la próstata.

15. - el epitelio ha aumentado y presenta un aspecto cúbico con signos de secreción.

- el epitelio es cilíndrico y toma un carácter funcional neto,

- presencia de formación papilar.

20. El exámen de las próstatas de las ratas tratadas pone en evidencia que las fracciones T 1, T 4 y T 7 son inactivas ya que son comparables a los testigos.

Testigos

25. 3 animales de cada 15 tienen un coeficiente de actividad celular de 2.



Fracción T 1

4 animales de cada 15 tiene un coeficiente de actividad celular de 2.

Fracción T 4

5. 7 animales de cada 15 tiene un coeficiente de 2.

1 animal tiene un coeficiente de 3.

Fracción T 7

10. 4 animales de cada 14 tienen un coeficiente de 2.

Por el contrario las restantes fracciones tienen efectos sensiblemente que corresponden a los de la fracción esterólica total (FST)

FST

15. 12 animales de cada 14 tiene un coeficiente de actividad celular de 2 y 3, y se dividen en:

9 animales de coeficiente 2

3 animales de coeficiente 3.

Fracción T 2

20. 7 animales de cada 15 tienen un coeficiente de actividad celular de 2 y 3, y se dividen en:

4 animales de coeficiente 2

3 animales de coeficiente 3.

Fracción T 3

25. 12 animales de cada 14 tiene un coeficiente de actividad celular de 2 y 3, y se dividen en:



9 animales de coeficiente 2

3 animales de coeficiente 3

Fracción T 5

9 animales de cada 15 tiene un coeficiente

5. de 2 y 3, y se dividen en:

7 animales de coeficiente 2

2 animales de coeficiente 3

Fracción T 6

10 animales de cada 15 tienen un coefi-

10. ciente de 2 y 3, y se dividen en:

8 animales de coeficiente 2

2 animales de coeficiente 3.

En particular la fracción T 3 presenta

coeficientes de actividad celular exactamente superponibles
15. a los de la EST

Además se ha resumido la acción de las
diferentes fracciones separadas por cromatografía sobre próg-
tata de la rata.

20. 135 ratas machos de raza Wustar de un
peso medio de 420 g, adultos de seis meses y medio a ocho
meses y medio se han puesto en observación durante una se-
mana; después repartidas en nueve lotes de 15 animales. 7
lotes se tratan con las diferentes fracciones recogidas por
cromatografía y puestas en solución en aceite. Un lote se

25. trata con la EST, y el testigo no recibe más que el exci-



piente . El volumen ingerido es uniformemente de 0,1 ml por 100 g de peso corporal, el tratamiento se ha administrado cinco veces por semana durante siete semanas, y los animales se han sacrificado al final del citado tratamiento.

5. En la tabla I, se han indicado los nº de los lotes, los productos administrados, su concentración en solución en aceite y las dosis ingeridas en mg/kg de peso corporal

T A B L A 1

nº de lote	Productos administrados	Concentración en mg %	dosis en mg por kg
1	unicemente excipiente	0	0
2	FST	1 000	10
3	T 1	20	0,2
4	T 2	20	0,2
5	T 3	20	0,2
6	T 4	20	0,2
7	T 5	20	0,2
8	T 6	60	0,6
9	T 7	100	1,0

Tras sacrificio, los animales se desangran y se procede a la toma de los dos lóbulos ventrales de la próstata que se pesan y a continuación se sumergen inmediata-



mente en formol al 10 %, con fines de histología.

5. En la tabla II adjunta, se han indicado los pesos medios de las próstatas para cada lote, así como el peso de las ratas al final de la experimentación y el índice prostático (relación del peso de la próstata en mg al peso de la rata en g).

10. Se comprueba que los animales han soportado bien el tratamiento. No se han observado enflaquecimientos. Desde el punto de vista de la mortalidad, se nota sobre las 135 ratas una muerte en el lote nº 2 tratado con la FST.

En lo que se refiere al peso de las próstatas, se comprueba pesos menores con las fracciones T 3 y T 4.

15. Los resultados obtenidos con los ensayos clínicos del extracto purificado son sobretodo interesantes en el adenoma prostático que tiene el estado de la complicación aguda de la retención que es preciso tratar quirúrgicamente: adenomas con residuo post-miccional inferior a 100 g.

20. La acción del extracto purificado según la invención es igualmente interesante frente a las secuelas de prostectomía, en los casos de disectesia cervical.

25. La prostatitis crónica parece poder ser favorablemente influenciada.



Sobre el plano funcional los resultados son muy satisfactorios de una forma constante:

- La poliuria disminuye tanto como las micciones nocturnas.

5.

- El carácter de urgencia miccional diurna desaparece tanto como la intolerancia vesical.

- La importancia volumétrica de orines aumenta y la calidad del chorro y su longitud son netamente mejoradas.

T A B L A II

Lotes	Productos administrados	Próstatas en mg	Pesos de les ratas en g	Indice pros tático
1		500 ± 62	437 ± 15,6	1,076 ± 0,215
2	FST	577 ± 96	438 ± 13,6	1,310 ± 0,250
3	T 1	517 ± 94	450 ± 18,6	1,134 ± 0,176
4	T 2	504 ± 84	446 ± 19,8	1,12 ± 0,156
5	T 3	432 ± 66	440 ± 10,3	0,98 ± 0,154
6	T 5	406 ± 101	419 ± 13,0	0,97 ± 0,246
7	T 6	497 ± 106	435 ± 12,9	1,13 ± 0,247
8	T 8	446 ± 105	427 ± 12,9	0,99 ± 0,215
9	T 9,	461 ± 83	428 ± 13,8	1,07 ± 0,191



N O T A

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarse en la práctica debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a una solicitud de patente presentada en Inglaterra, con el número y fecha siguiente: 5473/69 de 31 de enero de 1.969, escogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicite una Patente de Invención por 20 años, sobre: PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DE UN EXTRACTO VEGETAL; caracterizándose por lo siguiente:
15. 1.- Procedimiento para la preparación de un extracto vegetal, de *Prunus Africana*, principalmente de *Prunus Africana* (Hook), F. Kelkm y de especies emparentadas, a partir de una fracción esterólica obtenida mediante la extracción con cloroformo de una parte elegida entre la corteza, la madera, los frutos y las flores
 20. de la planta *Prunus Africana* y de especies emparentadas, y de una cromatografía sobre columna de sílice, caracterizado porque dicha fracción esterólica se somete a
 25. recristalizaciones sucesivas en etanol, acetone y de nuevo etanol, para eliminar los cristales de beta-sitos-



terol, pudiendo fraccionarse el citado extracto mediante cromatografía en capa delgada.

5. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho extracto es fraccionable en el menos siete sustancias esterólicas mediante cromatografía en capa delgada, siendo el disolvente cloroformo.

10. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque para un 100 % de esteroides, dicho extracto es fraccionable, aparte del beta-sitosterol, mediante cromatografía en capa delgada en un porcentaje de 10, 6, 8, 4, 8, y 24 %, según los valores de Rf crecientes, en el menos siete sustancias esterólicas.

15. 4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la sustancia esterólica que corresponde al tercer valor más pequeño de Rf proporcione un espectro de masa con picos fuertes para M/E = 256, 226, 218 y 124.

20. 5.- Procedimiento para la preparación de un extracto vegetal; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 24 hojas escritas a máquina por una sola cara.

25. Madrid, 31 ENE. 1970

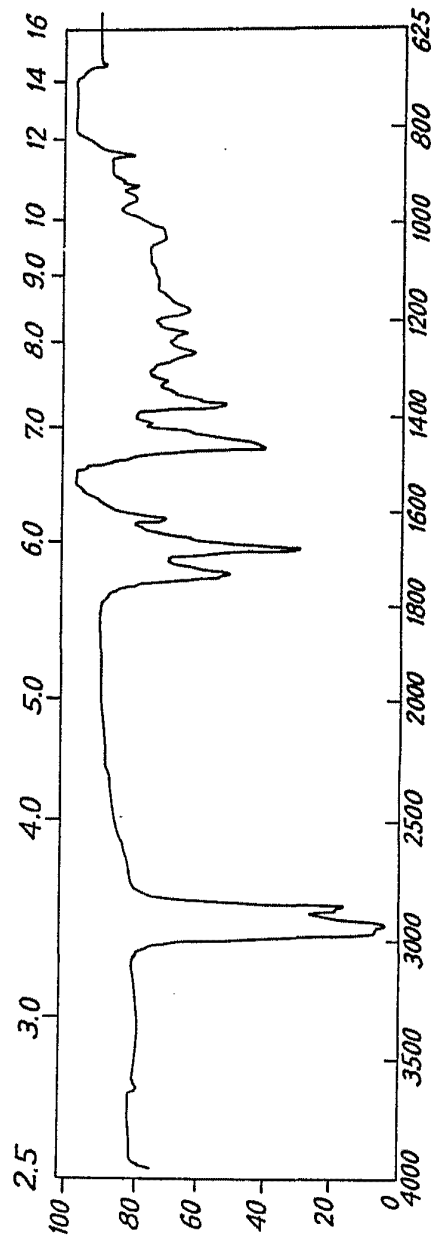
INSTITUT DE RECHERCHES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES APPLIQUEES (I.R.C.E.B.A.)

A. GÓMEZ ACEBO Y MORA
Firmado: F. Hernández Ruiz

FILE NO. 1000

91 EME-870
91 EME-870

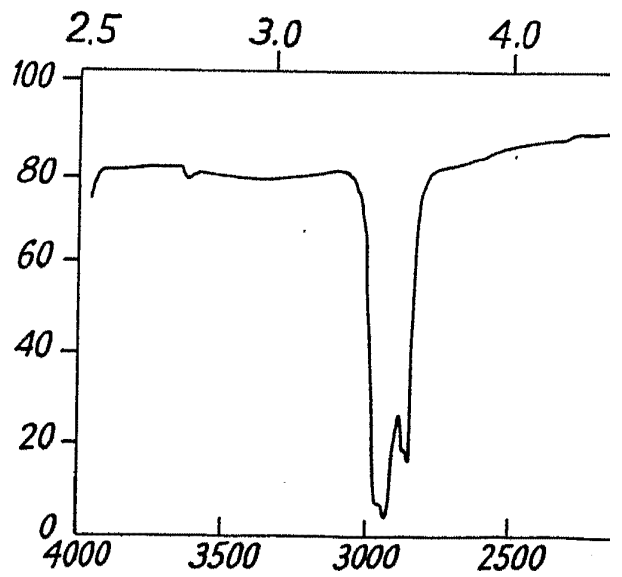
WATER



810-100

810-100

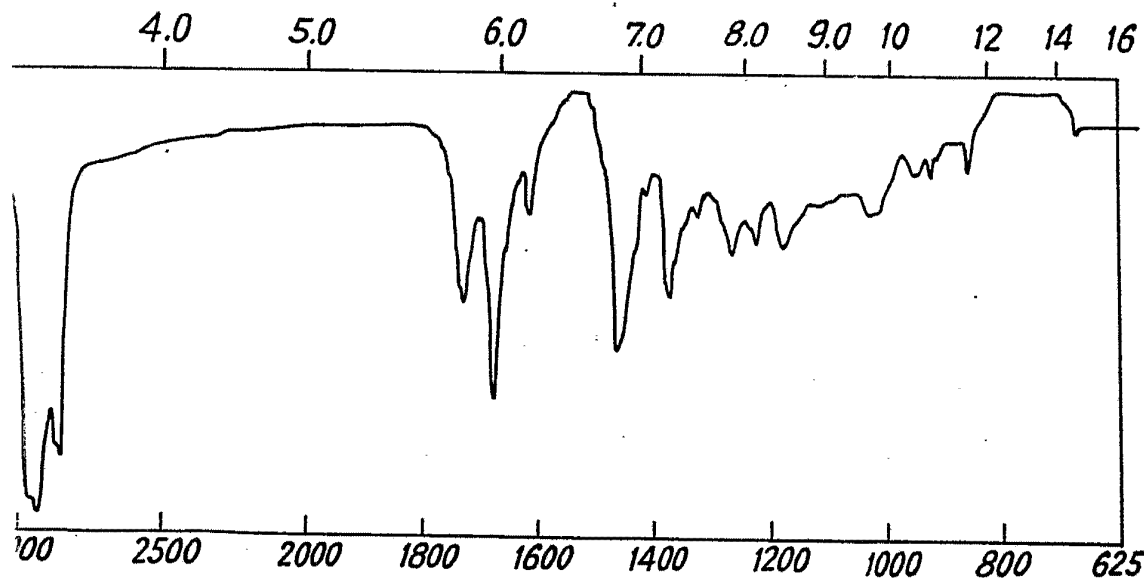
PHI, J. W. (1953)



31 ENE 1970

31 ENE 1970

31 ENE 1970



✓

[Handwritten signature]

31 ENE 1970

31 ENE 1970