

21 A



228442

P A T E N T E   D E   I N V E N C I O N

-----  
-----  
a favor de

MERCK & C<sup>o</sup>., INC. - de nacionalidad norteamericana - domi-  
ciliada en RAHWAY (New Jersey E.U.) 126 East Lincoln Avenue,

por:

"Procedimiento para purificar novobiocina".

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

M e m o r i a   D e s c r i p t i v a

Este invento se refiere a un procedimiento útil pa-  
ra purificar antibióticos, y atañe más concretamente a un  
procedimiento útil para la purificación de un nuevo antibió-



tico que en el primer momento se designó con el nombre de cathomycina, pero que definitivamente ha recibido el nombre de novobiocina.

5 La nueva substancia antibiótica novobiocina es un producto valioso, que inhibe eficazmente la reproducción de bacterias patógenas, especialmente de microorganismos grampositivos. Se produce cultivando una especie de microorganismo antes desconocida, que se ha denominado Streptomyces spheroides, en medios nutritivos acuosos apropiados, en condiciones aeróbicas. Un cultivo de este microorganismo productor de novobiocina se ha depositado en la Sección de Fermentación del Departamento de Investigaciones Utilitarias del Norte, Ministerio de Agricultura de EUA, Peoria, Illinois, y añadido a su colección permanente de cultivos con la designación de NRRL 2449.

15 Un objeto del presente invento es habilitar un procedimiento nuevo para aislar novobiocina del caldo de fermentación. Otro objeto consiste en proporcionar un procedimiento para purificar novobiocina; y otro, proporcionar un método para preparar novobiocina cristalizada. Otros fines se deducirán de la descripción detallada siguiente.

20 De acuerdo con una forma de realización del presente invento, se ha comprobado que la novobiocina se puede purificar y aislar mediante acidificación de una solución alcalina de esta substancia. El antibiótico, débilmente ácido, es esencialmente insoluble en soluciones ácidas acuosas, y, por tanto, este método ofrece un medio muy conveniente de aislar el producto de la solución, y de purificarlo notablemente a la vez. Así, este método puede emplearse para preparar novobiocina de soluciones acuosas obtenidas filtrando el caldo de fermentación alcalino producido por Streptomyces



spheroides cultivados en medios nutritivos acuosos adecuados, en condiciones aeróbicas. Por ejemplo, acidificando el caldo de fermentación alcalino con ácido clorhídrico, a un pH aproximado de 2, virtualmente toda la novobiocina se precipita y puede recuperarse fácilmente en forma sólida. Buena parte de los contaminantes o impurezas que existen en el caldo de fermentación son solubles en la solución ácida, y por ello se separan simultáneamente de la novobiocina precipitada.

Se ha comprobado que empleando este método de aislar y purificar la novobiocina presente en el caldo de fermentación, la precipitación del antibiótico se efectúa ventajosamente empleando diatomita filtrante u otra sustancia similar. Cuando se precipita novobiocina de este modo, se recupera rápida y convenientemente por filtración. Al precipitar así, se ha comprobado que la adición de unas 5 lbs. de diatomita filtrante por 100 galones de solución cargada de novobiocina es suficiente para obtener un precipitado fácilmente filtrable. Sin embargo, se pueden emplear cantidades mayores o menores de sustancia filtrante, según la solución particular de que haya de precipitarse la novobiocina.

Al aislar la novobiocina de sus soluciones alcalinas acuosas obtenidas de caldos de fermentación, encuentro ventajoso emplear un ácido halohídrico, como el clorhídrico, para acidificar el caldo, aunque también sirven para este fin otros ácidos que no alteren el antibiótico. El empleo de ácido clorhídrico es particularmente ventajoso, porque muchas de las impurezas contenidas en el caldo de fermentación son solubles en solución acuosa de ácido clorhídrico, y por eso se pueden separar fácilmente del antibiótico precipitado.

De acuerdo con otra forma de realización de este in-

228442

21 AB



5      vento, se ha visto ahora que puede purificarse además la novobiocina natural obtenida por precipitación a partir de caldos de fermentación acidificados, disolviendo al efecto el producto precipitado en un disolvente soluble de la novobiocina, como etanol, metanol, acetona, dioxano, metiletilcetona y sus análogos, evaporando el disolvente de la solución resultante, y extractando con butanol, una solución acuosa alcalina del residuo. Esta extracción con butanol se realiza mejor empleando una solución alcalina del antibiótico ajustada a un pH 9, aproximadamente; de ese modo, la sal monosódica de novobiocina pasa a la capa de butanol, y se separa de las impurezas contaminantes insolubles en este disolvente.

15      Otro método de purificar el precipitado de novobiocina natural obtenido acidificando caldos de fermentación acuosos comprende la trituración de este producto con éter de petróleo, a fin de separar las impurezas que precipiten con la novobiocina, sin perjuicio para esta substancia. Esta purificación es muy útil para eliminar subproductos oleosos de fermentación que precipiten con la novobiocina. Por consiguiente, la novobiocina recuperada de los extractos butanólicos mencionados se purifica convenientemente por trituración con éter de petróleo. Por ejemplo, los extractos butanólicos se pueden evaporar para eliminar el disolvente, y los residuos resultantes se disuelven en una solución acuosa alcalina, para precipitar luego la novobiocina por acidificación, como se ha explicado. Después de recuperar y secar la novobiocina precipitada, a presión reducida, el producto así obtenido se tritura bien con éter de petróleo, para eliminar un 20 a 25% de los subproductos oleosos de fermentación remanentes en el curso de purificaciones anteriores.

5

10

15

20

25

30



De conformidad con otros modos de realización de este invento, se ha comprobado que se purifica la novobiocina natural poniendo en inmediato contacto una solución de novobiocina en un disolvente soluble, como metanol, etanol, acetona, dioxano, metiletilcetona y sus análogos, con alúmina lavada con ácido. Debe utilizarse una relación de alúmina de 50:1, basada en el total de sólidos de la solución de carga, para obtener una purificación satisfactoria. Esto puede hacerse por lotes, mezclando la alúmina lavada con ácido, con una solución del antibiótico, separando por filtración la alúmina que contiene las impurezas adsorbidas, y recuperando el antibiótico impuro de la solución resultante.

Sin embargo, es preferible purificar con alúmina lavada con ácido haciendo pasar una solución de novobiocina por una columna de alúmina lavada con ácido, y lavando la columna con un disolvente adecuado de la novobiocina. De este modo se purifica mucho este antibiótico, y se recupera en forma cristalina del líquido que sale. Al purificar en columna la novobiocina, se ha encontrado particularmente ventajoso emplear una solución de novobiocina en etanol, y recuperar el antibiótico de la columna de alúmina lavando con más etanol, porque puede recuperarse novobiocina en cristales del eluato de etanol resultante concentrando éste hasta un pequeño volumen, y dejando reposar la solución acosa de etanol hasta que cristalice el producto buscado. Si se quiere, el producto cristalino así obtenido se puede purificar nuevamente por recristalización en acetona y éter de petróleo, a fin de obtener novobiocina cristalizada substancialmente pura. Los cristales impuros de novobiocina pueden disolverse al efecto en acetona anhidra, hasta una concentración aproximada de 5%, agregando luego éter de petró-

228442<sup>21</sup> ABR



leo suficiente para producir un ligero enturbiamiento. Por reposo, la solución resultante deposita cristales de novobiocina esencialmente pura. Durante esta recristalización, se ha encontrado también conveniente purificar de nuevo tratando la solución acetónica de novobiocina con carbón vegetal activado, retirando este material, y añadiendo éter de petróleo a la solución filtrada de acetona, con lo que se obtienen cristales de novobiocina esencialmente pura.

Los medios descritos aquí para aislar y purificar novobiocina pueden emplearse por separado para purificar novobiocina que contenga diversas impurezas. También es posible combinar estos procesos para recuperar y purificar novobiocina contenida en caldos de fermentación, a fin de obtenerla en cristales. Como es evidente para los entendidos en la materia, puede alterarse el orden de las operaciones, y en ciertos casos es posible que alguna de estas operaciones no sea necesaria para purificar una determinada novobiocina impura.

Los ejemplos siguientes son formas ilustrativas de realización del procedimiento descrito para aislar y purificar novobiocina.

EJEMPLO 1º.-

Se aisló novobiocina purificada de un caldo de fermentación preparado cultivando Streptomyces spheroides en un medio nutritivo acuoso, como sigue:

Después de filtrar todo el caldo a un pH 9, se añadieron 5 lbs. de tierra de diatomeas (Hyflo Supercel) por 100 galones de caldo filtrado. El caldo se acidificó lentamente hasta un pH 2, con ácido clorhídrico. Después de diez minutos de agitación, el lote se filtró, y la torta se



lavó con agua. En el filtrado ácido no se advirtió actividad. Los sólidos precipitados, sin el material filtrante, demostraron una pureza próxima a 0,2-0,3%.

5 La torta resultante de precipitar con ácido se extractó dos veces con metanol acuoso al 85%, ajustando a un pH 9, empleando aproximadamente 1/10 del volumen de caldo primitivo para cada extracción. La recuperación total mediante esta extracción fue de un 80% de la bioactividad total contenida en el caldo. Los sólidos en solución tenían  
10 una pureza de 1 a 1,5%.

La solución acuosa de metanol se concentró hasta obtener una solución acuosa de alrededor de 1/10 del volumen de la solución metanólica primitiva. Se ajustó el pH a 9 con sosa cáustica, y la solución se extractó dos veces con volúmenes iguales de n-butanol. La relación aparente de distribución con pH 9 es de 40:1, aproximadamente. Los sólidos  
15 contenidos en el extracto butanólico tenían una pureza de 4-6%.

El extracto butanólico se concentró a 1/10 del volumen primitivo, y se añadieron a 15 volúmenes de agua a un pH 9. Se agregó material filtrante (Hyflo Supercel), en cantidad aproximada de 0,5 g./galón, a base del volumen primitivo de caldo, y se ajustó lentamente el pH a 2, mediante  
20 adición de ácido clorhídrico. Toda la substancia bioactiva se precipita sobre el material filtrante y se separa así. La pureza de los sólidos, exceptuando el material filtrante, era de un 10 a 12%.

La torta se desecó en vacío a 40°C, se desmenuzó y trituró con éter de petróleo, hasta que el filtrado salió  
30 incoloro. Esto elimina 20 a 25% de los sólidos presentes, y elimina los productos oleosos inactivos de fermentación

21 ABR.

228442



remanentes de las operaciones anteriores. No se perdió bioactividad por esta trituración, y los sólidos remanentes dieron 12 a 15% de pureza.

5 La torta se extrajo con etanol anhidro, hasta que los extractos etanólicos salieron de color muy débilmente amarillo. Estos extractos se reunieron y concentraron hasta una solución de 15 a 20% de sólidos, con un ensayo biológico de 200.000 u/c.c., aproximadamente. La pureza de este material sólido era de 20 a 30%, con un índice biológico de 1000 a 1500 u/mg.

10 La solución etanólica concentrada se sometió a cromatografía sobre alúmina lavada con ácido. Se requiere una relación de alúmina de 50:1, basada en el total de sólidos presentes en la solución de carga, para obtener una purificación satisfactoria. El material activo pasa por la columna, mientras que gran parte de los sólidos extraños presentes quedan en ella. La columna de alúmina se eluyó con etanol, para recuperar la novobiocina. Aproximadamente 95% de la bioactividad se hallaba en 2,5 a 3 espacios huecos de la columna.

TABLA 1.

Volumen (c.c.)	Ensayo biológico (u/c.c.)	mg/c.c.	u/mg.	Unidades, total
25 Carga col. 1000	220,000	265	830	220 x 106
Fracción 1*1000	460	2.5	183	0.46 x 106
Fracción 2 1000	42,000	19.6	2140	42 x 106
Fracción 3 1000	76,000	31.3	2420	76 x 106
Fracción 4 1000	62,000	22.3	2780	62 x 106
30 Fracción 5 1000	37,000	13.4	2760	37 x 106
Fracción 6 1000	13,000	4.5	3020	13 x 106

21 AB  
228442



Fracción 7 <u>1000</u>	<u>4,500</u>	<u>1,3</u>	<u>3450</u>	4.5 x 106
Promedio 7000	33,500	13,2	2520	

Volumen de alúmina = 8.000 c.c.

5 Volumen de huecos = 2.600 c.c.

Línea ancha

\* (primer color).

10 El eluato etanólico de la columna de alúmina se concentró a un 5% de sólidos. Se añadió agua hasta enturbiamiento, empleando poco más de un volumen igual, y se dejó cristalizar el antibiótico. La cristalización fué muy lenta. Al cabo de cinco días quedaba aún en los líquidos sobrenadantes hasta 15% de la bioactividad primitiva. La agitación y/o los cambios de temperatura parecen influir poco

15 en el ritmo de la cristalización. La novobiocina cristalizada dió una potencia biológica aproximada de 2500 a 3000 u/mg.

20 Este material cristalino se disolvió en acetona anhidra para dar una solución al 30%. La solución se trató con una cantidad de Darco G-60 igual al doble del peso del material cristalino disuelto. El Darco se separó por filtración, y se lavó repetidamente con acetona para diluir la solución hasta una concentración aproximada de 5% de sólidos. Se añadió éter de petróleo hasta enturbiamiento, y se dejó cristalizar la novobiocina. Se recuperó así 90 a 95% de la bioactividad, y la novobiocina cristalizada obtenida dió un índice biológico de 4500 a 5000 u/mg.

25

30 Puede producirse un caldo de fermentación para preparar novobiocina por fermentación sumergida del siguiente modo:

Un frasco de Blake con 25 ml. de medio nutritivo de agar acuoso estéril, de la siguiente composición

228442



5	Extracto de levadura	1%
	Dextrosa	1%
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,12%
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,075%
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,05%
	Agar	2%

disuelto en agua, se inoculó con tierra tomada de un cultivo en suelo de Streptomyces spheroides MA-319 (NRRL 2449), y se incubó a 26°C durante cuatro a cinco días, hasta esporulación abundante.

Se añadieron luego 20 ml. de agua esterilizada al contenido del frasco de Flake, y se rasparon las esporas para obtener una suspensión. Unos 5 ml. de la suspensión de esporas resultante se agregaron a un matraz de Erlenmeyer de 2 litros, con pantalla de dirección, que contenía 750 ml. del siguiente medio acuoso esterilizado:

20	Extracto de carne de buey	0,3%
	Hidrolizado de caseína (amina NZ)	1%
	Dextrosa	1%
	Cloruro sódico	0,5%

con pH 7,2 aproximadamente. Se tapó luego el matraz con algodón, y se incubó a 26°C en un agitador giratorio durante 48 horas.

El cultivo vegetativo así preparado se añadió luego a una vasija de fermentación de acero inoxidable, de 50 galones de capacidad, que contenía unos 25 a 30 galones de un medio esterilizado de carne de buey, con la composición antes citada. Después de agregar 3% de Alkaterge C (oxazolina sustituida) en aceite mineral como agente antiespumoso, el medio se incubó a 26°C durante 48 horas. En el transcurso de este período de incubación, se agitó el medio, y se hizo pasar a



través del mismo una corriente de aire esterilizado, a razón de unos 3 cpm.

En una vasija de fermentación de acero inoxidable, de 200 galones de capacidad, se cargarón seguidamente 100 galones de un medio acuoso que contenía estos ingredientes:

Harina de soya (Staley 4S-50)	3%
Dextrosa	2%
Solubles de destilerías	0,75%
Cloruro sódico	0,25%

con un pH 7,1 aproximadamente. Después de esterilizar el medio con vapor a unos 120°C, durante treinta minutos, se inoculó la carga con un 8,4% del cultivo vegetativo preparado en la vasija de 50 galones, como ya se ha descrito.

Luego se incubó la carga a 26°C, agitando y aireando a razón de 12 pies cúbicos por minuto. Al cabo de 96 horas, el caldo fermentado que contenía novobiocina tenía una actividad aproximada de 410 u/ml.

La novobiocina reacciona como un compuesto orgánico ácido, y se disuelve fácilmente en soluciones alcalinas tales como las soluciones acuosas de hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de metales alcalinos, y también en metanol, etanol, butanol normal, butanol secundario, ácido acético, dioxano, acetona, y metiletilacetona. Es insoluble o escasamente soluble en éter, benceno, acetato de etilo, cloroforno, tetracloruro de carbono, dicloruro de etileno, agua y ácido clorhídrico. La novobiocina puede precipitarse de una solución alcalina por acidificación.

Se ha obtenido novobiocina en dos formas cristalinas, por los métodos antes descritos. Una de ellas, que se presenta en rosetas, funde a unos 152-154°C; la otra, con as-



pecto de agujas planas, ha dado un punto de fusión de unos 170-172°C. Ambas formas se producen juntas a veces, y pueden separarse por medios mecánicos.

5 Una solución de novobiocina en hidróxido sódico N/10 muestra una característica de absorción ultravioleta con máximo alrededor de 3070 Å (E% 600). Una solución de novobiocina en ácido clorhídrico N/10 en metanol acuoso, da asimismo una característica de absorción ultravioleta con máximo alrededor de 3240 Å (E% 390).

10 El espectro de absorción infrarrojo de una muestra de novobiocina amorfa substancialmente pura, suspendida en un aceite mineral (Nujol), se tomó en un espectrofotómetro de rayos infrarrojos Baird Associates Model 12B, con prismas de cloruro sódico, y presentaba varios picos característicos, los más significativos de los cuales corresponden a las siguientes frecuencias, expresadas en micrones:

15 5,856 (ancho); 6,10, 6,21, 6,30, 6,49, 6,63, 7,4-7,6 (ancho resaltado); 7,78, 7,96, 8,27 (débil); 8,60 (resalto), 8,7 (resalto); 9,13, 9,40, 10-10,1 (ancho); 10,28, 10,60 (ancho);

20 12-12,30 (ancho); 12,60-12-75 (ancho), 13,07 y 13,39. La muestra de novobiocina amorfa empleada para determinar este espectro se preparó partiendo de otra muestra de novobiocina cristalina, por el siguiente método de "normalización".

25 A una solución de 1 g. de novobiocina cristalina en 100 ml. de acetona, se añadió aprisa 1 litro de éter de petróleo, y luego se separó de la solución novobiocina amorfa. El producto precipitado se recuperó por filtración, se lavó con éter de petróleo, y finalmente se secó a 100°C, a presión reducida.

30 La novobiocina contiene los elementos carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno. He aquí el resultado del análisis.

228442



lisis elemental de una muestra de novobiocina cristalina:

Carbono	60,24-60,26%
Hidrógeno	6,56-6,49%
Nitrógeno	4,86%
Oxígeno	29,3%

5

La novobiocina es una sustancia ácida, que forma sales al reaccionar con bases. Por reacción de novobiocina con un equivalente de hidróxido sódico, se obtiene la sal monosódica de novobiocina; y la reacción con dos equivalentes de hidróxido sódico proporciona la sal disódica. De manera análoga, al reaccionar novobiocina con otras bases inorgánicas, pueden obtenerse las correspondientes sales metálicas. La reacción de novobiocina con una base orgánica, por ejemplo, con una amina, da las correspondientes sales de amina; así, al reaccionar novobiocina con metilamina se obtiene la sal de metilamina de la novobiocina.

10

15

El carácter ácido de la novobiocina es también una característica distintiva de este nuevo antibiótico; triturando una muestra de novobiocina con hidróxido sódico se obtienen dos grupos básicos de combinación: el primero, que constituye la sal monosódica, se produce a un pH 7 aproximadamente, y tiene un pKa alrededor de 3,8; y el segundo sobreviene con un pH aproximado de 11, y tiene un pKa aproximado de 9,4.

20

25

La novobiocina cristalizada posee una actividad microbiológica de unas 4000-5000 u/mg., determinada por métodos normales de difusión en placas, empleando Bacillus megaterium ATCC 9885, y una forma substancialmente pura de novobiocina como patrón. El método de valoración es el mismo aplicado para la bacitracina.

30

21 ABR.  
228442



La novobiocina inhibe en principio el desarrollo de microorganismos grampositivos, y muestra igualmente alguna actividad contra los gramnegativos. Entre los gérmenes cuya reproducción se detiene con concentraciones muy bajas de novobiocina o sus sales, pueden mencionarse los siguientes:

5 Micrococcus pyogenes var. albus, M. pyogenes var. aureus,  
Diplococcus pneumoniae, Corynebacterium diphtheriae tipo  
gravis, Cor. diphtheriae tipo intermedius, Cor. diphtheriae  
10 tipo mitis. Cor. xerose, Cor. renale, Neisseria meningitidis,  
Sarcina lutea (VD), M. aureus, M. pyogenes var. aureus resis-  
tente a la aureomicina, y M. pyogenes var. aureus resistente  
a la penicilina.

Por ejemplo, la sal sódica de novobiocina, ensayada por la prueba de dilución sobre agar en estrías, resultó de-  
15 tener la reproducción de diversas cepas de M. pyogenes var.  
aureus, M. pyogenes var. albus, Neisseria meningitidis (núm.  
274) y Sarcina lutea (VD), a concentraciones inferiores a  
0,5 mcg. por mililitro. Este nuevo antibiótico y sus sales  
afectan asimismo en diversos grados a otros microorganismos.  
20

La novobiocina y sus sales son eficaces agentes antimicrobianos. Por ejemplo, se pueden utilizar para elimi-  
nar microorganismos sensibles de material farmacéutico o sus  
análogos, o para separar ciertos microorganismos de solucio-  
25 nes que contengan mezclas de varios microorganismos. Tam-  
bién sirven la novobiocina y sus sales para el tratamiento  
de animales infectados por microorganismos sensibles a la  
acción de este nuevo antibiótico.

La novobiocina y sus sales tienen actividad contra  
30 estafilococos resistentes a la penicilina, y también contra  
estreptococos y neumococos. Como estos microorganismos son

228442

21 ABM



5

los causantes de la mayoría de las infecciones respiratorias bacterianas, la novobiocina puede usarse en el tratamiento de tales infecciones en el hombre. Para ello, puede administrarse la sal sódica de novobiocina por vía bucal, en forma de cápsulas que contengan, por ejemplo, unos 100 a 500 mg. de antibiótico, hasta una dosis diaria de 1 a 2 gramos.

10

La novobiocina es también eficaz en el tratamiento y la represión de enfermedades de plantas. Así, puede emplearse para combatir la roña o grasa de las habichuelas, causada por el Xanthomonas phaseoli; a tal objeto, se riegan las plantas con una solución acuosa que contiene alrededor de 100 partes por millón de la sal sódica de novobiocina. Tales aspersiones pueden contener diversos humectantes o difusores y/u otros activantes, y pueden prepararse de acuerdo con métodos bien conocidos en la especialidad.

15

NOTA

Se reivindica como objeto de esta patente:

20

1.º Procedimiento para purificar novobiocina, que comprende acidificar una solución alcalina de novobiocina y recuperar la novobiocina que precipita.

25

2.º Procedimiento para purificar novobiocina, que comprende acidificar con ácido clorhídrico una solución alcalina de novobiocina, hasta un pH aproximado de 2, y recuperar la novobiocina precipitada.

30

3.º Procedimiento para purificar novobiocina a partir de caldo de fermentación, que comprende acidificar un caldo de fermentación alcalino filtrado y cargado de tierra de diatomeas, con ácido clorhídrico, hasta un pH aproximado de 2, y recuperar la novobiocina precipitada.

228442

21 AB



5 4.º Procedimiento para purificar novobiocina, que comprende poner en contacto inmediato una solución de novobiocina impura en un disolvente orgánico, con alúmina lavada con ácido, en cantidad equivalente por lo menos a 50 partes en peso de alúmina, por una parte de los sólidos contenidos en la solución; separar la alúmina con las impurezas adsorbidas, y recuperar una solución que contiene novobiocina purificada.

10 5.º Procedimiento para purificar novobiocina que comprende hacer pasar una solución de novobiocina impura en etanol por una columna de alúmina que contiene una cantidad de óxido de aluminio equivalente por lo menos a 50 partes en peso, a base de los sólidos de la solución etanólica; lavar dicha columna con etanol, y recuperar la novobiocina purificada de la solución etanólica resultante.

15 6.º Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la novobiocina se recupera en forma cristalina concentrando la solución etanólica hasta un 5% de sólidos, añadiendo suficiente agua para producir enturbiamiento, y dejando reposar la novobiocina en la solución resultante, de donde se recoge la novobiocina cristalizada que precipita.

20 7.º Procedimiento para purificar novobiocina, que comprende añadir éter de petróleo a una solución de novobiocina en acetona, en cantidad suficiente para formar una solución turbia, y dejar que cristalice la novobiocina de la solución resultante.

8.º Procedimiento para purificar novobiocina.

Esta memoria consta de diez y siete páginas, escritas por una sola cara.

17

21 AB

228442



LONA, a veintiuno de Abril de mil novecientos cincuenta y seis.

P. A.

JOSE M. SOLBAK  
P. P.

A large, stylized handwritten signature in black ink, overlapping the typed name "JOSE M. SOLBAK".