

AÑO _____

Expediente núm. _____



242875

REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
242875

PATENTE DE _____ **INTRODUCCION.**

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de

una **PATENTE DE INTRODUCCION** por **10** años, en España

a favor de

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, entidad _____, de nacionalidad
inglesa _____ domiciliado en **Imperial Chemical House,**
~~existente~~ **Millbank, Londres, Inglaterra.** _____ núm. _____

por:

«**Procedimiento de obtención de ácido giberélico y sus
derivados**».

Nº 8702

Agente Sr. Gómez-Acebo y Modet.

PATENTE DE INTRODUCCION

I.C.I. Case PH.11504A/11656A.

242875



Memoria Descriptiva

sobre:

"Procedimiento de obtención de ácido giberélico y sus derivados".

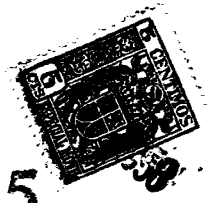
=====

Solicitante:

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED, entidad inglesa, residente en Imperial Chemical House, Millbank, Londres, Inglaterra.

=====

Este invento se refiere a un nuevo ácido orgánico dotado de propiedades fomentadoras del crecimiento de las plantas, y a derivados activos del mismo, en especial, sales y ésteres. Este invento se refiere además a un método de producción del ácido, por un procedimiento



242875

metabólico. Se refiere además este invento a composiciones para uso agrícola, que contengan el nuevo ácido o un derivado activo del mismo.

5. Se ha comprobado que de un cultivo de *Giberella fujikuroi* (Sawada) Wollenweber (= *Fusarium moniliforme* Sheldon) puede extraerse un nuevo ácido orgánico que tiene la propiedad de fomentar el desarrollo de las plantas. Este ácido se denomina continuación ácido giberélico.

10. Este invento por tanto proporciona un nuevo compuesto químico, el ácido giberélico, susceptible de obtenerse de un cultivo de *Giberella fujikuroi*, ácido que se caracteriza por las propiedades siguientes:

15. Punto de fusión: 233-235°C. (enérgico desprendimiento de gas).

Rotación óptica: $(\alpha)_{D}^{20}$; +83° (c, 0,51 en metanol).

Ester monometílico, punto de fusión, 209-210°C.

20. Rotación óptica del anterior $(\alpha)_{D}^{20}$; +75° (c, 0,5 en etanol).

Ester p-Bromofenacílico, punto de fusión, 218-219°C.

Hidrólisis con ácido mineral hirviente; desprendimiento de 1 mol de dióxido de carbono.

25. Derivado acetílico, punto de fusión 233-234°C. (dec.).

Rotación óptica del anterior $(\alpha)_{D}^{17}$; +152° (c, 0,5 en etanol).

30. Giberelato metil-acetílico; punto de fusión, 180-181°C.

242875



Rotación óptica del anterior (α)_D 18; +150°
(c, 0,4 en etanol).

5. La curva de absorción infrarroja ("null" de Nujol, este último es un producto de Marca Registrada) de material cristalizado en acetato de etilo/petróleo ligero (punto de ebullición 60-80°C), como se indica en el dibujo de la memoria provisional nº 19,238/54. Líneas de difracción, de los rayos X por el polvo del material, como se indica en la Tabla 1. Las intensidades "I" de las líneas de las fotografías del polvo
10. se calculan con referencia a la línea más acusada a la que se asigna una intensidad de 10.



242875

TABLA I

LINEAS DE DIFRACCION DE LOS RAYOS X POR EL POLVO DE
ACIDO GIBBERELICO.

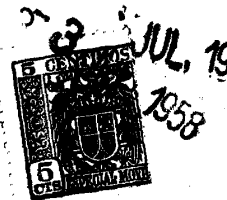
(ex acetato etílico)

	<u>Separación</u>	<u>Intensidad</u>	<u>Separación</u>	<u>Intensidad</u>
	"d"	"I"	"d"	"I"
5.	10.20	5b	2.786	1
	8,73	2b	2.687	1
	7.33	5b	2.549	2
	6.69	w	2.485	2
10.	6.01	5b	2.418	w
	5.31	10b	2.350	1
	5.06	$\frac{1}{2}$	2.305	1
	4.84	$3\frac{1}{2}$	2.249	w
	4.60	7	2.172	1
15.	4.33	3	2.120	1
	4.03	3	2.040	w
	3.85	w	2.003	w
	3.714	3	1.971	w
	3.591	3	1.936	w
20.	3.389	$1\frac{1}{2}$ b	1.920	w
	3.214	1	1.863	w
	3.085	w	1.853	w
	2.993	$1\frac{1}{2}$	1.780	w
	2.882	$1\frac{1}{2}$	1.698	w

25. w indica una reflexión débil.

b indica una reflexión muy difusa.

242875



La tercera cifra después de la coma decimal, es de significación poco segura.

5. Este invento proporciona también derivados funcionales de ácido giberélico que son sales y esteres del mismo, dotados de propiedades de fomento del crecimiento de las plantas. Los ejemplos de los esteres comprenden los esteres alkílicos y específicamente, los esteres metílico, etílico, isopropílico, butílico y octílico. Los compuestos en los que los grupos hidroxilo del ácido giberélico están esterificados con ácidos alifáticos o ácidos aromáticos, específicamente ácidos acético, butírico y benzóico, comprenden un tipo adicional de éster de ácido giberélico. Las sales con preferencia usadas, son las de metal alcalino y otras sales tales como las de metal alcalino térreo, tal como el calcio.
- 10.
- 15.

20. Este invento proporciona también mezclas dotadas de propiedades de fomento del desarrollo de las plantas, que comprenden ácido giberélico o un derivado activo del mismo, y un diluyente. Este puede ser líquido o sólido y puede estar constituido por, o contener sustancias nutritivas para las plantas, especialmente orígenes de nitrógeno.

25. Además, este invento proporciona un procedimiento de producción de ácido giberélico o mezclas que lo contengan, que comprende el cultivar una variedad activa de *Giberella fujikuroi* en un medio acuoso, y continuar el cultivo después de cesar el crecimiento activo.

30. El ácido giberélico puede producirse por la *Giberella fujikuroi* desarrollada como cultivo superficial

242875



- o profundo, como cultivo agitado y aireado en un medio acuoso adecuado. Un medio conveniente debe contener un origen de carbono, (por ejemplo sucrosa, glucosa o glicerol, a 2-30% peso/volumen); una sal de amonio o
5. un nitrato o una combinación de proteína (por ejemplo peptona) como origen de nitrógeno (para dar una concentración de N en el medio, de 0,01-0,5%, siendo en general adecuada una concentración de 0,08%) una sal de magnesio (por ejemplo sulfato magnésico heptahidratado
10. al 0,05% o alrededor de esa concentración que, convenientemente, añada también sulfato, asimismo necesario, pero que puede añadirse de alguna otra forma, si se usa otra sal de magnesio) un fosfato (por ejemplo fosfato monopotásico al 0,05-0,5%, siendo el 0,1% una concentración adecuada), una sal de potasio (que puede ser convenientemente el fosfato, ver lo anterior) y trazas (alrededor de 1-10 partes por millón de metal) de sales de hierro, cobre, zinc, manganeso y una traza (1-10 partes por millón de metal) de un molibdato.
20. Las fermentaciones pueden realizarse convenientemente a una temperatura del orden de 25 a 33°C.
- No todas las variedades del hongo producen ácido giberélico. Los resultados de ensayos realizados en distintas variedades indican sin embargo que las
25. variedades aisladas de las plantas jóvenes de arroz atacadas por la enfermedad denominada "bacanae" son más propensas a producir ácido giberélico que las variedades aisladas de otras plantas huéspedes, tales como el algodón, el maíz y el ananás. De las variedades encontradas en la caña de azúcar, algunas son activas para
- 30.



242875

la producción de ácido giberélico, otras no. Las variedades del hongo que producen el ácido, son morfológicamente indistinguibles de las que no lo producen, y si una variedad es o no activa, solo puede determinarse cultivándola y ensayando el cultivo.

5.

Las variedades de *Giberella fujikuroi* que producen ácido giberélico, son las llamadas "Sawada" y "Miyake" que pueden obtenerse del Centraalbureau voor Schimmelcultures de Baarn, Holanda. Cuatro variedades, de muestra colección de mohos, las 1001, 1004, 1135 y 1139 son también productivas de ácido giberélico. Se han depositado muestras de estas variedades en el Centraalbureau y en el Instituto Micológico de la Commonwealth, de Kew, Surrey. Los cultivos de estas variedades cultivadas como se describe en esta memoria, contendrán ácido giberélico.

10.

15.

Un método para obtener ácido giberélico, comprende generalmente las etapas siguientes:

20.

1 - desarrollo de un cultivo del moho en un medio acuoso.

2 - filtración y extracción del medio con un adsorbente.

3 - elución del adsorbente.

4 - purificación del ácido obtenido por elución.

25.

Un adsorbente preferido es el carbón vegetal activado.

El ácido giberélico se ha producido en cultivos en reposo y agitados, empleando medio Raulin Thom, que contenía sucrosa como origen de carbono.

30.

Para obtener rendimientos máximos en cultivos



242875

agitados, es necesario proseguir la fermentación durante lo que se considera un tiempo prolongado, de acuerdo con las normas corrientes. Esto lo indica la tabla siguiente que proporciona los datos de rendimiento/tiempo para una partida de 100 litros de medio Haulin Thom que contenía 4% de sucrosa, graduado inicialmente para un pH de 3,5 y a 25°C.

TABLA II

	Horas de fermentación	Rendimiento (mg./l.)
10.	93	18
	117	33
	141	39
	164	82
	187	105
15.	212	92
	236	138
	262	160
	284	189
	331	193
20.	402	249

El tiempo en que el ácido giberélico empieza a acumularse en un cultivo de una variedad adecuada de *Gibberella fujikuroi* y el rendimiento final de ácido giberélico, están influenciados por las concentraciones del origen de carbono y del origen de nitrógeno, y por la relación de estas dos concentraciones en el medio usado.

Los ejemplos siguientes, se facilitan como aclaración.

30. Se cultivó una variedad del moho, productora

242875



de ácido giberélico, en volúmenes de 30 litros de medio de la composición siguiente:

	Sulfato magnésico	30 g.
	Fosfato monopotásico	150 g.
5.	Concentrado de elementos en pequeña cantidad ✗	60 ml.
	Monohidrato de glucosa	} ver a continuación
	Nitrato amónico	
	Agua	30 l.

10. ✗ La composición del concentrado de elementos en pequeña cantidad, era:

	$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g.
	$\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O}$	0,015 g.
	$\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g.
	$\text{MnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$	0,01 g.
15.	K_2MoO_4	0,01 g.
	Agua	100 ml.

20. El medio se agitó y se aireó a razón de 10 litros/minuto manteniéndose a una temperatura de 25°C. El valor del pH del medio, se ajustó a 4,5 antes de esterilizar.

Los rendimientos de ácido giberélico (mg./l.) en distintos períodos durante la fermentación en medios que contenían concentraciones distintas de glucosa y nitrato amónico, figuran en las Tablas siguientes:

242875



TABLA III

Rendimiento de ácido giberélico (mg./l.)

Monohidrato de glucosa	Horas de fermentación	Concentración de NH ₄ NO ₃ (g./l.)			
		1.2	2.4	4.8	9.6
16%	120	-			
"	161	19	-		
"	195			-	
"	212		59		
"	219	40			-
"	258	61	146	44	49
"	330	102	114	204	5
"	402	139	312	204	4
4%	138	-	-		
"	168			-	-
"	185	65	34		
"	210			4	5
"	282	100	71	8	8
"	305	107	71	5	7
2%	100	-			
"	114		-		
"	137		5	-	-
"	161	41	5	2	-
"	185	42	7	-	-
20%	139		3		
"	163		20		
"	235		123		
"	259		134		
"	283		162		
"	307		189		
"	331		244		
"	402		364		
"	426		368		
"	474		408		
"	618		544		
"	666		424		
"	738		465		
"	785		501		

242875



Estos resultados muestran que (a) el rendimiento de ácido giberélico aumenta con una relación creciente de glucosa/ NH_4NO_3 ; (b) el rendimiento de ácido giberélico aumenta con el aumento de glucosa.

TABLA IV

5. Rendimiento de ácido giberélico (mg./l.)

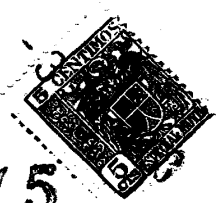
	NH_4NO_3	0.96	0.48	0.24	0.12
	Dextrosa				
10.	16	94	211	310	148
	8	5	60	185	200
	4	13	-	54	118
	2	5	5	8	50

15. (c) en medios de concentración dada de glucosa, la producción de ácido giberélico empieza antes en los de baja concentración de NH_4NO_3 .

20. (d) en medios de concentración dada de NH_4NO_3 , la producción de ácido giberélico empieza antes en los de baja concentración de glucosa.

25. (e) el ácido giberélico se produce por el hongo únicamente durante los períodos en que acumula o subsiste a base de las reservas internas de grasa y carbohidrato, o sea cuando la síntesis neta de proteína o el crecimiento activo del hongo se ha refrenado por la agotación del nitrógeno por el carbono en el principio nutritivo. Las mejores condiciones para la producción del ácido parecen ser aquellas en las que el nitrógeno es el

242875



factor que limita el crecimiento activo, y el carbono está en exceso, aunque desde luego, es necesario que en el medio nutritivo exista primitivamente nitrógeno suficiente para permitir el crecimiento adecuado del hongo antes de empezar la producción de ácido.

5.

En general se obtienen elevados rendimientos de ácido giberélico cultivando el moho en un caldo nutritivo que contenga de 0,2 a 0,3% de nitrato amónico (u origen equivalente de nitrógeno) y de 10 a 30% de glucosa (u origen equivalente de carbono) o sea de 0,07 a 0,1% de nitrógeno y de 3,5 a 10% de carbono.

10.

EJEMPLO 1.

Para el cultivo en reposo, el medio Raulin Thom se dispuso en cantidades de 1 litro en vasijas de barro, y los cultivos se incubaron durante unos 10 días a 25°C. La incubación de los cultivos con agitación duró de tres a cinco días a 25°C. El filtrado del cultivo de pH = 4 o inferior (ajustado con ácido clorhídrico normal, en caso de necesidad) se extrajo con 10 g./l. de carbón de madera activado B.D.H. El carbón de madera secado al aire (con un 20 a 30% de humedad), se apuró continuamente con acetona y el producto obtenido se evaporó a presión reducida, para dar un concentrado acuoso que se extrajo dos veces, con, por lo menos, un volumen igual de acetato de etilo. Las soluciones combinadas en acetato de etilo, se extrajeron dos veces con el 25% de su volumen de fosfato moderador, de pH = 6,3 (136 g. de KH_2PO_4 y 24 g. de KOH en 1 l. de agua). Los extractos de moderador se

15.

20.

25.

30.



242875

combinaron, se ajustaron a un pH de 3,8 y se extrajeron dos veces con un volumen igual de acetato de etilo. Al concentrar estos extractos cristalizó ácido giberélico bruto en rendimientos de 40 mg./l. aproximadamente.

- 5. El ácido bruto se purificó por adición de un volumen igual de petróleo ligero (60-80°C) a una solución en acetato de etilo hirviente. La repetición de este procedimiento proporcionó ácido giberélico puro en forma de tabletas ásperas que se descomponían a 233-235°C.
- 10. rotación óptica (α)_D 19 +86°, (σ , 2, 12 en etanol). (Encontrado: C, 65,9, 65,85; H, 6,6, 6,55. El peso equivalente 342 de C₁₉H₂₂O₆ requiere, C, 65,9; H, 6,4%. Peso equivalente (monobásico) 346). El peso molecular se ha confirmado por el método de los rayos X. La célula unitaria era tetragonal y tenía a = b = 10,905, c = 28,74 Å. La densidad era de 1,34 ± 0,01, así pues, el peso molecular (8 moléculas por célula unitaria) es 345.

- 20. La extracción del filtrado del cultivo con disolvente orgánico eliminará el ácido giberélico, aunque no tan efectivamente como cuando se utiliza el carbón vegetal, como en el ejemplo 1 anterior.

La fórmula empírica del ácido y sus derivados

- 25. sería (C₁₈H₁₉O₂) $\begin{matrix} \text{COOX} \\ \text{OY} \\ \text{OY} \end{matrix}$ en la que X puede ser hidrógeno, un radical alkilo o arilo, o un metal, e Y puede ser hidrógeno o un radical acilo.

El ácido giberélico dá un ester metílico, punto de fusión 209-210°C., rotación óptica

3 JUL 1959
6
U.S. POSTAGE

242875

- (α)_D¹⁶ +75° (c, 0,5 en etanol). (Encontrado: C, 66,65; H, 6,85; OMe, 8,5; C₂₀H₂₄O₆ requiere C, 66,65; H, 6,7; OMe, 8,6%) con diazometano o bien ioduro metílico y carbonato potásico en acetona. El ester p-bromofenacílico, tiene un punto de fusión de 218-219°C. (Encontrado: C, 57,65; H, 5,0; Br, 14,35. C₂₇H₂₇O₇Br.H₂O requiere, C, 57,75; H, 5,2; Br, 14,2%). El ácido acetil-giberélico, punto de fusión 233-234°C. (dec.) rotación óptica (α)_D¹⁷ +152°. (c, 0,5 en etanol). (Encontrado: C, 65,1; H, 6,35; C₂₄H₂₄O₇ requiere C, 64,9; H, 6,2%), preparado con anhídrido acético en piridina a la temperatura ambiente, proporciona un éster metílico, punto de fusión 180-181°C. rotación óptica (α)_D¹⁸ +150°. (c, 0,4 en etanol). (Encontrado: C, 65,3; H, 6,7; C₂₂H₂₄O₇ requiere C, 65,65; H, 6,5%), se obtiene también por acetilación del giberelato metílico.

- Como ulteriores ejemplos de esteres alquílicos de ácido giberélico, se prepararon los siguientes, en cada caso por interacción del grupo carboxílico del ácido giberélico y del diazo-hidrocarburo en un disolvente adecuado; el giberelato etílico forma un semi-metanolato, en agujas prismáticas, punto de fusión 150-151°C. (encontrado: C, 66,6; H, 7,6; C₂₄H₂₆O. 1/2CH₄O, requiere C, 66,2; H, 7,2%) que al calentarse a 140°C. en vacío proporciona el éster, libre de disolvente, punto de fusión 155-156°C. (Encontrado: C, 67,3; H, 7,2; C₂₄H₂₆O₆ requiere C, 67,4; H, 7,0%). El isopropil giberelato forma un semi-metatonato en agujas, punto de fusión 151-152°C. (Encontrado, C, 66,5; H, 7,7; C₂₂H₂₈O₆, 1/2 CH₄O requiere C, 66,8; H, 7,5%).



242875

- El semi-metalonato de giberelato butílico forma agujas prismáticas, punto de fusión 152-153°C. (Encontrado: C, 67,6; H, 7,7; $C_{23}H_{30}O_6$, $1/2CH_4O$ requiere C, 67,4; H, 7,7%). El giberelato octílico, forma agujas prismáticas, punto de fusión 157-159°C. (Encontrado: C, 70,2; H, 8,3; $C_{27}H_{38}O_6$ requiere C, 70,7; H, 8,4%).
- 5.

- Otros ejemplos de esteres formados por acilación de un grupo hidroxilo en el ácido giberélico, son: el ácido butiril-giberélico, punto de fusión 192°C. (Encontrado: C, 66,1; H, 7,0; $C_{23}H_{28}O_7$ requiere C, 66,2; H, 6,8%) preparado con anhídrido butírico en piridina a la temperatura ambiente, y el ácido benzoilo-giberélico, punto de fusión 204-205°C. (Encontrado: C, 69,2; H, 5,9; $C_{26}H_{26}O_7$ requiere C, 69,3; H, 5,8%) preparado con cloruro de benzoilo en piridina, a la temperatura ambiente.
- 10.
- 15.

- Los ejemplos de derivados de ácido giberélico en los que el grupo carboxilo está esterificado y un grupo hidroxilo se activa, son los siguientes: giberelato etil-acético, punto de fusión 202-204°C. (Encontrado: C, 66,0; H, 6,9; $C_{25}H_{28}O_7$ requiere C, 66,3; H, 6,8%); acetilgiberelato isopropílico, punto de fusión 202-203°C. (Encontrado: C, 66,7; H, 7,1; $C_{24}H_{30}O_7$ requiere C, 67,0; H, 7,0%), acetilgiberelato butílico, punto de fusión 147-149°C. (Encontrado: C, 67,1; H, 7,2; $C_{25}H_{32}O_7$ requiere C, 67,5; H, 7,3%), butirilgiberelato etílico, punto de fusión 175-176°C. (Encontrado: C, 67,2; H, 7,5; $C_{25}H_{32}O_7$ requiere C, 67,5; H, 7,3%) y benzoilgiberelato etílico, punto de fusión 192°C. (Encontrado: C, 70,5; H, 6,5; $C_{28}H_{30}O_7$ requiere C, 70,3; H, 6,3%) y
- 20.
- 25.
- 30.



242875

acetil-giberelato octílico, que está constituido por un líquido espeso incoloro, punto de ebullición 195-202°C. (temperatura del baño)/5 x 10 mm. (Encontrado: C, 69,6; H, 8,0; $C_{29}H_{40}O_7$, requiere C, 69,6; H, 8,1%).

5. El ácido diacetilgiberélico preparado dejando que el ácido giberélico reaccione con anhídrido acético en piridina a la temperatura ambiente durante cinco días, forma prismas, punto de fusión 186,5-187°C. (Encontrado: C, 64,25; H, 6,15; $C_{25}H_{26}O_8$ requiere C, 64,2; H, 6,1%).

10. El diacetil-giberelato metílico, se preparó por la acción de diazometano etéreo en exceso, sobre una solución metanólica de ácido diacetilgiberélico. Cristalizó en cloruro de metileno/petróleo ligero (punto de ebullición 60-80°C.) y en acetona/petróleo ligero (punto de fusión 60-80°C.) en forma de prismas voluminosos, punto de fusión 166,5-168,5°C. (Encontrado: C, 65,1; H, 6,45; $C_{24}H_{28}O_8$ requiere C, 64,85 H, 6,35%).

15. En el ejemplo siguiente figura un ejemplo del ^{utilizado} procedimiento/para preparar el ester metílico de ácido giberélico.

20. EJEMPLO 2.

(A) Una solución de 207 mg. de ácido giberélico en 7 ml. de metanol, se enfrió a 0°C., y se añadió, con agitación, un exceso de diazometano en éter; 5 horas después de terminar la adición, la solución se colocó en un baño de agua y se evaporó rápidamente a sequedad. El residuo se cristalizó en una mezcla benceno-metanol para dar 159 mg. de giberelato de metilo, que fundía a 208-210°C. Después de una segunda cristalización, el éster fundía a 209-210°C y tenía una rotación óptica de

30.

242875



$(\alpha)_D^{16} +75^\circ$, determinado en una solución en etanol al 0,5%.

5. (B) Se calentó bajo reflujo, durante 8 horas, una mezcla de 125 mg. de ácido giberélico, 0,3 ml. de yoduro de metilo, 0,7 g. de carbonato potásico anhidro y 7ml. de acetona seca. La acetona se separó por destilación, y el residuo se lavó con agua y se secó. La cristalización repetida en una mezcla de acetato de etilo y benceno proporcionó giberelato de metilo que fundía a 204-205°C.

10. Desde luego, los demás ésteres, antes indicados en general, pueden prepararse de modo análogo.

15. El ejemplo siguiente que muestra el método general de preparación de dichos esteres indica la preparación de un éster por reacción del ácido giberélico con un compuesto que contenga un grupo acilo.

EJEMPLO 3.

20. A una solución de 113 mg. de ácido giberélico en 1,8 ml. de piridina pura y seca, se añadió 1 ml. de anhídrido acético. La mezcla se dejó durante 45 horas a la temperatura ambiente, y luego la solución se colocó en un baño de agua y los disolventes se destilaron rápidamente en vacío. El residuo se disolvió en solución de bicarbonato sódico y la solución se filtró acidificándose el filtrado con ácido clorhídrico. El precipitado resultante se recogió por filtración y se cristalizó en una mezcla de acetato de etilo y petróleo ligero (punto de ebullición 60-80°C.) dando ácido acetilgiberélico en forma de rombos que fundían a 233-234°C. (descomposición) y con una rotación óptica de $(\alpha)_D^{17} +152^\circ$

25.

30.



242875

determinada en solución al 0,5% en etanol.

5. Debe hacerse constar que en el alcance de este invento están comprendidos otros esteres de ácido giberélico, tal como por ejemplo los esteres glicólico y fenílico. Los anteriores son solamente por vía de ilustración.

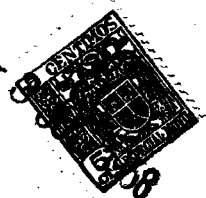
10. Además, debe tenerse presente que se han preparado distintas sales de ácido giberélico. Especialmente las sales de metal alcalino y de amonio son interesantes, por ejemplo el giberelato sódico sesquihidratado, punto de ebullición indefinido a 230-238°C. (descomposición). (Encontrado: C, 57,4; H, 6,15; $2C_{19}H_{24}O_6Na, 3H_2O$, requiere C, 67,7; H, 6,12%); el giberelato potásico, sesquihidratado, punto de fusión indefinido a 225-229°C. (descomposición). (Encontrado: C, 55,6; H, 5,7; $2C_{19}H_{24}O_6K, 3H_2O$ requiere C, 55,5; H, 5,9%), el giberelato cálcico trihidratado, con descomposición a 230-270°C. (Encontrado: C, 88,7; H, 6,0; $(C_{19}H_{24}O_6)_2Ca, 3H_2O$ requiere C, 58,2; H, 6,2%) y giberelato amónico monohidratado, punto de fusión 167-170°C., con descomposición (Encontrado: C, 59,8; H, 7,0; $C_{19}H_{25}O_6N.H_2O$ requiere C, 59,8; H, 7,1%).

20. El ejemplo siguiente aclara un método para preparar la sal sódica de ácido giberélico. Las demás sales indicadas en general anteriormente pueden prepararse lo mismo.

25. EJEMPLO 4.

30. Una solución de 94,03 mg. de ácido giberélico en metanol, recién destilada sobre 3 ml. de hidróxido sódico, se trató a gotas con un volumen de 10,93 ml. de hidróxido sódico acuoso aproximadamente 0,02N libre

242875



de carbonato; el volumen se calculó sobre la base de una titulación paralela, con fenolftaleina, de una parte alícuota, (58,2 mg), de ácido giberélico que precisó 6,76 ml. de solución alcalina para la neutralización.

5. La solución primeramente citada de giberelato sódico se evaporó rápidamente a presión reducida a la temperatura ambiente. La sal sódica residual se secó durante 7 días en un desecador en vacío sobre pentaóxido de fósforo; estaba formada por copos transparentes que se desintegraban a unos 160°C. en un polvo blanco que se transformaba en amarillo oscuro a 210-215°C. y fundía a 230-238°C. con descomposición, de giberelato sódico sesquihidratado (Encontrado: C, 57,4; H, 6,15; $C_{19}H_{24}O_6Na, 3H_2O$ requiere C, 57,7; H, 6,12%).
- 10
15. Los ejemplos siguientes son de otras sales metálicas de ácido giberélico: giberelato de rubidio, punto de fusión 213-216°C. (Encontrado: C, 53,1; H, 5,5; $C_{19}H_{24}O_6Rb$ requiere C, 53,0; H, 5,0%), giberelato de plata dihidratado, punto de fusión 199°C. con descomposición previa. (Encontrado: C, 46,7; H, 5,1; Ag. 21,7; $C_{19}H_{24}O_6Ag, 2H_2O$ requiere C, 46,6; H, 5,2; Ag, 22,1%), giberelato de manganeso trihidratado, punto de fusión 261-266°C., con descomposición previa. (Encontrado: C, 57,5; H, 5,8; $(C_{19}H_{24}O_6)_2Mn, 3H_2O$ requiere C, 57,1; H, 6,0%), giberelato de cobre trihidratado, punto de fusión 245-248°C. con descomposición previa. (Encontrado: C, 56,0; H, 5,7; $(C_{19}H_{24}O_6)_2Cu, 3H_2O$ requiere C, 56,4; H, 6,0%) y el giberelato de plomo monohidratado, punto de fusión 215-218°C. (descomposición). (Encontrado: C, 49,8; H, 5,0; $(C_{19}H_{24}O_6)_2Pb, H_2O$ requiere C, 49,8;
- 20.
- 25.
- 30.



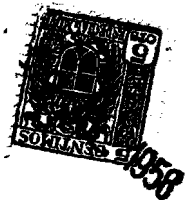
242875

H, 4,8% .

El ácido giberélico y sus derivados funcionales que son sales y esteres, especialmente el ácido acetil-giberélico, el ácido diacetil-giberélico, el ácido

5. butiril-giberélico y el ácido monobenzoil-giberélico, tienen la propiedad de fomentar el crecimiento de las plantas, como indica la descripción siguiente de experimentos con planteles de trigo y guisantes, y cespéd.

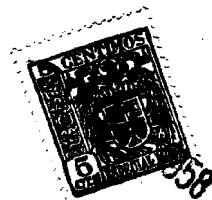
10. Cuando las plantas jóvenes o planteles de trigo se cultivan en agua, y se añade ácido giberélico a la solución de cultivo, en la proporción de 1 a 10 partes por millón de solución, los planteles crecen en mejores condiciones que las plantas sin tratar. El aumento de altura hasta el orden del 50%, es bastante común, y se
15. debe a (a) un gran aumento en la longitud del mesocotilo y (b) a un aumento menor en la longitud de los posteriores internodos y de las hojas. Estas, aunque más largas, son más estrechas que las de los planteles sin tratar. Las plantas mayores son más pálidas de color que
20. las plantas sin tratar, en soluciones de tipo nutritivo bajo, pero este efecto puede eliminarse aumentando la concentración de principios nutritivos en la solución de cultivo. Los resultados de cuatro experimentos, en los que se suministró ácido giberélico a la solución de
25. cultivo, en la proporción de 5 partes por millón, se resumen en la tabla V. Se observará que (a) el peso en verde y el peso en seco de los vástagos aumenta casi en todos los casos (b) el peso en verde y en seco de las raíces se reducen especialmente en el caldo nutritivo de bajo nivel. Los datos primitivos de los que se
- 30.



242875

- formó la tabla V, mostraron también que el aumento de peso en las hojas es corrientemente bastante mayor que las pérdidas de peso de las raíces, de modo que el efecto total del ácido giberélico sobre la planta entera es el
5. aumentar los pesos en verde y en seco. Si solo se consideran los vástagos, el peso en seco debe sus aumentos, en parte, a la redistribución de materia seca entre la raíz y el vástago, y en parte a una mayor síntesis de la materia seca por la planta. Los contenidos de carbono,
 10. nitrógeno, fósforo y cenizas, de pesos iguales de material procedente de plantas tratadas y sin tratar no difieren en alto grado, aunque parece posible la existencia de un aumento en el porcentaje de contenido de carbono y un ligero descenso en el nitrógeno, el fósforo y las
 15. cenizas. En cualquiera de los casos, existe un gran aumento indudable en el carbono asimilado por planta. Esto constituye un punto de algún interés y podría ser debido a que las plantas tratadas tienen una superficie de hojas superior en la que puede realizarse la foto-
 20. síntesis, o podría deberse a un aumento en el grado de asimilación de carbono por unidad superficial de hoja. En experimentos en los que los cálculos necesarios de superficie de hoja se han llevado a cabo, parece que la asimilación superior de carbono se debe al
 25. aumento de superficie de hoja. Existen diferencias cualitativas en los componentes de carbono de las plantas tratadas. Por ejemplo, los carbohidratos totales solubles en etanol al 80% aumentan alrededor del 75% con respecto a los controles y, por cromatografía de
 30. la savia derivada de plantas citolizadas, se ha comprobado

242875



que el contenido de sucrosa aumenta alrededor del 25%, y la concentración de fructosa y glucosa asciende un 100% aproximadamente. Parece por tanto que, como resultado del tratamiento, la glucosa sustituye a la sucrosa como principal componente azucarado de las plantas.

TABLA V

Porcentaje medio de aumento o disminución -en el trigo- por planta, después de tres semanas de tratamiento, resultante de la administración de ácido giberélico.

Experimento	Tipo de caldo nutritivo	Altura	Vástago FW	Vástago DW	Vástago FW	Vástago DW
G0	Bajo	+ 44 ²	--	+ 5	--	- 24 ^{***}
	Elevado	+ 80 ²	--	+ 39 ^{***}	--	+ 3
G1	Bajo	+ 86 ^{***}	+ 9	+ 24 ^{***}	- 24 ^{***}	- 15 ^{***}
	Elevado	+ 108 ^{***}	+ 37 ^{**}	+ 33 ^{***}	- 13 ^{***}	0
G2	Bajo	+ 74 ^{***}	+ 21 ²	+ 26 ^{***}	- 12 ²	- 17 ^{***}
	Elevado	+ 76 ^{***}	+ 11 ²	+ 14 ^{***}	- 25 ²	- 14 ^{***}
G3	Bajo	+ 93 ^{***}	+ 17 ²	+ 16 ^{***}	- 35 ²	- 34 ^{***}
	Elevado	+ 69 ^{***}	+ 5 ²	- 2	- 2 ²	- 16

*** = estadísticamente significativo (P - 0,01)

** = estadísticamente significativo (P - 0,05)

² = no analizado estadísticamente

FW = peso en verde

DW = peso en seco

242875



El efecto del ácido giberélico sobre planteles de guisante cultivados en agua es todavía más sorprendente que el efecto sobre planteles de trigo. La altura de la planta aumenta en alto grado; en algunos experimentos,

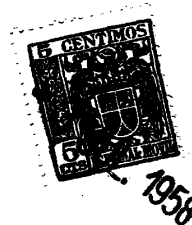
5. los planteles obtenidos han sido de una altura cinco veces mayor que la de las plantas de control. Esto se debe a un gran aumento en la longitud de los internudos. Las plantas son mucho más pálidas de color, que las de control.

Los efectos en la composición química de los planteles de guisante, son análogos a los observados en los planteles de trigo. Existe un gran aumento en el peso en verde de los vástagos, y un aumento menor, pero todavía considerable, en el peso en seco. El peso en verde y el peso en seco de las raíces disminuye como

10. resultado del tratamiento con ácido giberélico. Existe un aumento en la cantidad de carbono, nitrógeno, cenizas, fósforo y potasio por planta, en los vástagos, aunque con respecto al porcentaje del peso en seco, el contenido de todos estos elementos, excepto el carbono
15. disminuye ligeramente. En las raíces todos ellos disminuyen de cantidad.
- 20.

La proporción de carbohidratos solubles en etanol al 80%, aumenta como resultado del tratamiento con ácido giberélico, en el 30%, aproximadamente tomando la planta en conjunto, y en el 40% si se consideran los vástagos únicamente. Igual que en el caso del trigo, el contenido de glucosa de la savia, aumenta acusadamente.

25. El crecimiento reducido de las raíces, no se obtiene necesariamente en todas las condiciones. Por ejemplo, cuando se aplica ácido giberélico a vástagos de
- 30.



242875

guisante, en una pasta de lanolina, se obtiene un aumento de peso de las raíces y de los vástagos.

El efecto sobre los plántales de guisantes, de algunos derivados de ácido giberélico se indica en la tabla VI.

TABLA VI

Compuesto	Aplicado a través de las raíces	Aplicado a través de las hojas
Acido acetil-giberélico	Actividad elevada (igual a GA)	Actividad elevada (igual a GA)
Acido diacetil-giberélico	Actividad elevada	Actividad elevada
Giberelato metil-acetílico	Actividad moderada	Actividad ligera
Acido monobenzoil-giberélico	Actividad elevada	Actividad elevada (igual a GA)
Giberelato etílico	Actividad moderada	Inactivo
Giberelato butílico	Actividad moderada	Inactivo
Acetilgiberelato butílico	Actividad elevada	Inactivo
Acetilgiberelato iso-propílico	Actividad moderada	Inactivo
Giberelato iso-propílico	Actividad elevada	Inactivo
Acido butiril-giberélico	Actividad elevada	Actividad elevada (igual a GA)
Giberelato octílico	Actividad moderada	Inactivo
Acetilgiberelato etílico	Actividad elevada	Inactivo
Acetilgiberelato fenílico	Actividad elevada	No ensayado
Giberelato sódico, sesquihidratado	Actividad elevada	Actividad elevada (igual a GA)
Giberelato potásico, sesquihidratado	Actividad elevada (igual a GA)	Actividad elevada (igual a GA)
Giberelato cálcico sesquihidratado	Actividad elevada (igual a GA)	Actividad elevada (igual a GA)

Aplicado a través de las raíces en solución de cultivo que contenía el compuesto a una concentración de 10 partes por millón

Aplicado a través de las hojas en dosis de 10y/planta en 0,002 ml. alcohol

GA - acido giberélico

242875



- El grado de actividad de los derivados del ácido giberélico parece descender con la sustitución creciente. Por ejemplo, cuando el ácido giberélico se esterifica con alcoholes elevados, el grado de actividad disminuye como puede verse en la tabla VI, aunque el ester octílico retiene todavía algo de actividad. Por el contrario, aunque el ácido acetilgiberélico es tan activo como el ^{mismo} ácido giberélico cuando este ácido sustituido se esterifica con alcoholes de peso molecular más elevado, la actividad del ester desciende análogamente, como se observará en la Tabla VI hasta hacerse despreciable, en este caso particular, en el acetyl giberelato octílico. Asimismo, aunque el ácido diacetilgiberélico es bastante activo, el ester metílico es prácticamente inactivo.
- 5.
- 10.
- 15.

- En el caso de que un derivado sea activo al aplicarse a través de las raíces pero no aplicado a través de las hojas, esto puede deberse en realidad a la hidrólisis del derivado en el suelo, que dé por resultado ácido giberélico libre.
- 20.

- El hecho de que puedan obtenerse aumentos en rendimientos de materia seca, por tratamiento de los planteles de trigo y de guisantes con cantidades muy pequeñas de ácido giberélico, es de importancia práctica considerable. Los experimentos en los que los cultivos de césped se trataron con ácido giberélico, han confirmado que pueden obtenerse en condiciones corrientes, aumentos análogos en la materia seca.
- 25.

- En un ensayo realizado con pastos se comprobó que la aplicación de ácido giberélico (1-4 onzas/acre)
- 30.

242875



5. como pulverización acuosa, ocasionaba un aumento en el rendimiento de materia seca cortada, en la primera cosecha. (ver la tabla VII siguiente). Se aplicaron 0, 1, 2, 3 y 4 onzas de ácido giberélico por acre, junto con 0, 3 y 6 quintales de abono[¶] por acre, a parcelas de 1/600 acre, el 13 de abril de 1954, y las parcelas se segaron el 11 de mayo de 1954.

TABLA VII

Rendimiento medio de materia seca del pasto (quintales/acre)

10.

Acido giberélico (onzas/acre)

Abono (quintales/acre)	0	1	2	3	4
0	10.03	16.41	18.39	19.16	18.72
3	14.75	19.87	22.16	21.65	21.85
6	18.29	21.72	21.81	22.42	23.27

15.

¶ El abono contenía 12% de N; 12% de P₂O₅ total (11,9% de solubilidad en agua) y 15% de K₂O.

20.

Aunque se obtuvieron aumentos apreciables en materia seca, sin aplicación de abono, las plantas del cespéd eran amarillas y mecánicamente débiles. Sin embargo las plantas de las parcelas con abono y ácido giberélico (el primero en la proporción de 6 quintales por acre) eran de aspecto normal.

25.

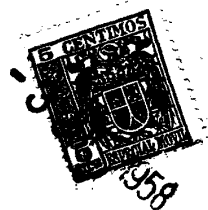
En general se ha comprobado que para obtener los resultados más beneficiosos de las propiedades de fomento del crecimiento mediante el ácido giberélico, éste ha de estar acompañado por el tratamiento con cantidades adicionales de principios nutritivos para

242875



- las plantas, especialmente nitrógeno, que puede derivarse de un abono combinado, como anteriormente, o de un origen de nitrógeno tal como urea, sulfato amónico y nitrato amónico. Una proporción adecuada de aplicación de nitrógeno que reduce apreciablemente o impide la amarillez del follaje al estimular el crecimiento, es de 40 a 80 libras de nitrógeno por acre. Una combinación preferida es aquella en la que la relación de componente activo a nitrógeno es de 1:320 a 1:640.
- 5.
10. Uno de los aspectos más importantes de este invento en relación con la producción aumentada de cesped, es que la aplicación de ácido giberélico o de un derivado activo al terreno a principios de primavera, otoño o invierno hará que el cesped crezca en condiciones de baja intensidad de luz y baja temperatura, o sea en condiciones en las que el cesped no puede estimularse para su crecimiento, por el solo suministro de un abono. Como resultado, es posible ampliar la estación de crecimiento del cesped obteniendo así un pasto adelantado para el ganado o la posibilidad de una siega anticipada para la conservación o ensilado. La aplicación simultánea de abono, conduce desde luego al empleo más adelantado del abono en el desarrollo anticipado.
- 15.
- 20.
25. El ácido giberélico o un derivado activo del mismo, puede aplicarse en seco, o sea en forma de polvo, mezclado con un diluyente que puede ser inerte, tal como arcilla, tierra de bataneros, tierra de infusorios o cal, o que puede contener un alimento para las plantas, tal como abono mezclado o sulfato o nitrato amónicos.
30. Como variante, puede aplicarse como pulverización

242875



dispersándose en agua en tal caso el componente activo. La dispersión acuosa puede contener además principios nutritivos para las plantas, tales como urea o una sal amónica.

5. Con preferencia, el componente activo se aplica de tal modo que su efecto principal se lleve a cabo por absorción a través de las hojas, más que a través de las raíces, ya que en esta última circunstancia, puede disminuir el grado de desarrollo de las raíces.
10. Con preferencia, por tanto, se aplica como pulverización y con mayor preferencia, como pulverización a volumen reducido, tal como a razón de 10 o 20 galones de pulverización por acre, con objeto de distribuir dos onzas/acre de ácido giberélico o el equivalente de derivado activo.
15. Un método conveniente para preparar una dispersión acuosa de ácido giberélico o de un derivado activo es disolver el ácido o el derivado en un disolvente miscible con el agua y verter la solución en el agua, con agitación.
20. Aunque se han descrito procedimientos para aislar ácido giberélico puro de cultivos de *Giberella fujikuroi*, por ser necesario el material puro para los análisis químicos y la identificación general del ácido, es evidente que para los usos agrícolas no será necesario aislar el ácido puro, siendo adecuado un concentrado bruto para el tratamiento de las plantas o el suelo en el que estas se cultivan o han de cultivarse.
- 25.

N O T A

30. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica,



242875

debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y

5. por lo que se solicita Patente de Introducción por 10 años en España: "Procedimiento de obtención de ácido giberélico y sus derivados"; caracterizándose por lo siguiente:

10. 1^a.- Procedimiento de obtención de ácido giberélico y sus derivados, caracterizado por permitir la obtención de derivados funcionales de dicho ácido, que son sales y esteres del mismo, que poseen actividad fomentadora del crecimiento de las plantas.

15. 2^a.- Procedimiento de obtención de ácido giberélico y sus derivados, caracterizado por permitir la obtención de ácido giberélico acilado, en el que el grupo acilo es acetilo, butirilo o benzoilo.

20. 3^a.- Procedimiento de obtención de ácido giberélico y sus derivados, caracterizado por permitir la preparación de esteres alquílicos de ácido giberélico, en los que el grupo alquilo contiene hasta 8 átomos de carbono.

25. 4^a.- Procedimiento de obtención de ácido giberélico y sus derivados, caracterizado por permitir la preparación de sales de ácido giberélico.

5^a.- Procedimiento de obtención de ácido giberélico y sus derivados, caracterizado por permitir la preparación de sales de ácido giberélico, de metal alcalino o alcalino terreo.

30. 6^a.- Procedimiento de obtención de ácido

- 3 JUL. 1958



242875

giberélico y sus derivados, caracterizado por permitir la preparación de un caldo de cultivo de *Giberella fujikuroi*, que contenga ácido giberélico.

5. 7^a.- Procedimiento de obtención de ácido giberélico y sus derivados, caracterizado por comprender el cultivar una variedad activa de *Giberella fujikuroi*, en un medio acuoso, y el continuar el cultivo después de cesar el crecimiento activo.
10. 8^a.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 7^a, caracterizado porque la relación del origen de carbono al origen de nitrógeno en el medio acuoso es superior o inferior a la relación en la que se utilizan en el cultivo del hongo, de modo que uno u otro se halla en exceso al terminar el crecimiento activo.
15. 9^a.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 8^a, caracterizado por estar en exceso el origen de carbono.
20. 10^a.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 9^a, caracterizado porque el caldo nutritivo contiene de 0,2 a 0,3% de nitrato amónico (u origen equivalente de nitrógeno) y de 10 a 30% de monohidrato de glucosa (u origen equivalente de carbono).
25. 11^a.- Procedimiento, según lo especificado en cualquiera de las reivindicaciones 7^a a 10^a, caracterizado porque el cultivo se filtra, y el filtrado se extrae con un adsorbente.
30. 12^a.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 11^a, caracterizado porque el adsorbente es el carbón vegetal activado.
- 13^a.- Procedimiento de obtención de ácido



242875

giberélico y sus derivados, caracterizado por permitir la preparación de una composición para fomentar el desarrollo de las plantas y que contiene un compuesto según lo especificado en cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª, y un diluyente.

5.

14ª.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 13ª, caracterizado porque el diluyente es inerte.

10.

15ª.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 13ª, caracterizado porque el compuesto se dispersa en agua como diluyente.

15.

16ª.- Procedimiento de obtención de ácido giberélico y sus derivados, caracterizado por permitir la preparación de una composición según lo especificado en la reivindicación 15ª, en la que el compuesto se disuelve primero en un disolvente miscible en agua, y la solución se dispersa luego en agua.

20.

17ª.- Procedimiento de obtención de ácido giberélicos y sus derivados, caracterizado por permitir la preparación de una solución en un disolvente miscible en agua, de un compuesto según lo especificado en cualquiera de las reivindicaciones 1ª a 5ª.

25.

18ª.- Procedimiento de obtención de ácido giberélico y sus derivados, caracterizado por permitir la preparación de una composición según lo especificado en la reivindicación 13ª, en la que el diluyente comprende un origen de nitrógeno para las plantas a tratar.

30.

19ª.- Procedimiento de obtención de ácido giberélico y sus derivados, caracterizado por permitir la preparación de una composición según lo especificado

242875



en la reivindicación 18ª, en la que el diluyente comprende un abono mezclado.

5. 20ª.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 18ª, caracterizado porque el origen de nitrógeno es la urea.

21ª.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 18ª, caracterizado porque el origen de nitrógeno es una sal amónica.

10. 22ª.- Procedimiento, según lo especificado en la reivindicación 15ª, y en la 20 o 21, caracterizado porque el origen de nitrógeno se disuelve en el agua.

15. 23ª.- Procedimiento, según lo especificado en cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, caracterizado por permitir la preparación de una composición para fomentar el desarrollo de las plantas en la que el compuesto activo y el origen de nitrógeno están presentes en proporción tal que la relación de compuesto activo a nitrógeno es de 1:320 a 1:640.

20. 24ª.- Procedimiento de obtención de ácido giberélico y sus derivados; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente memoria que consta de treinta y dos hojas escritas a máquina por una sola cara.

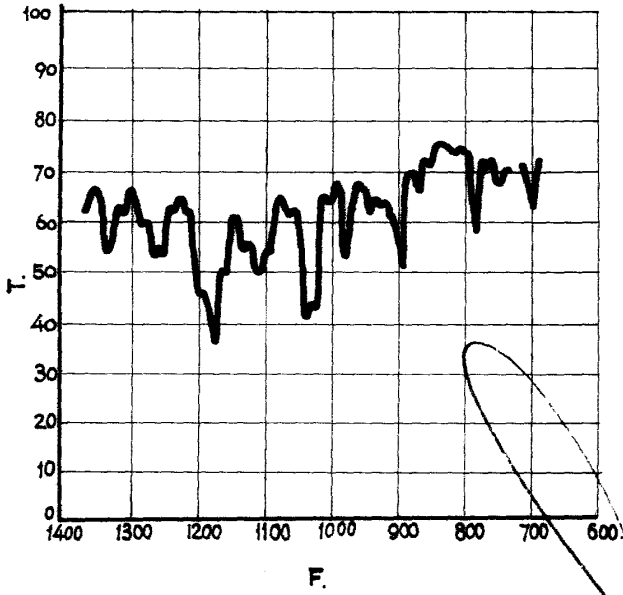
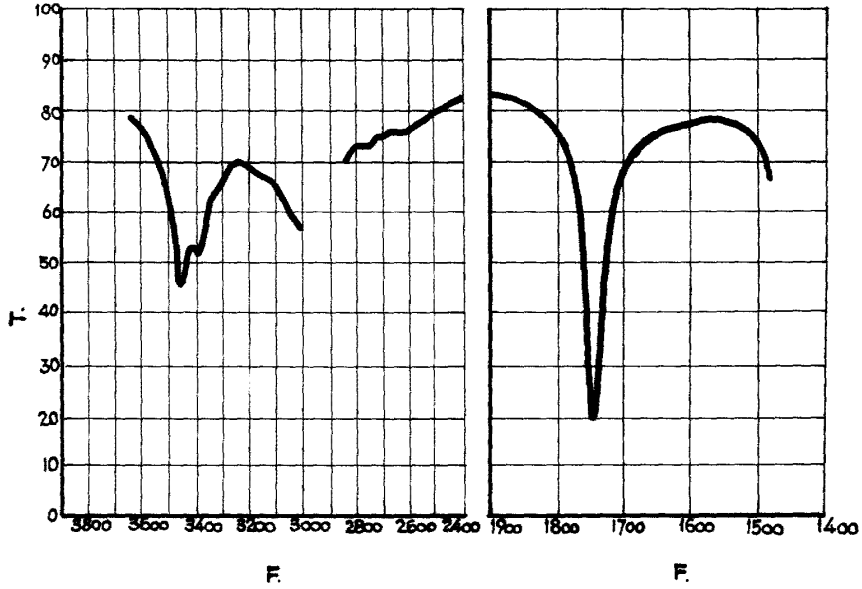
Madrid,

- 3 JUL. 1958

IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED.

J. GONZÁLEZ ARIAS Y MODET

242875-3 JUL



MADRID, DE 3 JUL. 1958 1958
IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED. ✓
P. P.

COM. AGEN Y MODEI