

258251



PATENTE DE INVENCION

Your Case C-17744

258251

*Memoria Descriptiva*

sobre:

"Procedimiento para la obtención de nuevos fungicidas".

=====

*Solicitante:* PABST BREWING COMPANY, entidad norteamericana, residente en Merchandise Mart Plaza, Chicago, Estado de Illinois, Estados Unidos de America.

=====

Este invento se refiere a nuevos y útiles fungicidas (antihongos), a procedimientos para su preparación, y a empleos de estos productos.

5 Este invento se relaciona con dos fungicidas a los que se han dado nombres arbitrarios, phytoactin y phytoStreptin, respectivamente. Se relaciona también con la obtención de estos nuevos fungicidas por fermentación, con métodos para su recuperación de los caldos de fermentación, con procesos para su purificación, y métodos para la preparación de sus sales activas y complejas. Este invento como

10



258251

prende dentro de su alcance, estos nuevos fungicidas en forma diluida, como concentrados brutos y como preparaciones purificadas. Este invento comprende también nuevos usos para estos fungicidas.

5

P H Y T O A C T I N

El phytoactin es un polipéptido sin grupo terminal amínico libre, como se indica a continuación por sus propiedades químicas y físicas. Constituye un tanino sólido y muy ligero y es soluble en metanol, etanol, isopropanol, n-butanol, cloroformo, acetona, metilisobutil, ketona, dioxano, tetrahidrofurano, formamida, cloruro de etileno y solución normal de hidróxido sódico. Es insoluble en eter de petróleo (30-60° C.), benceno y acetato de etilo, y ligeramente soluble en éter dietílico, solución normal de HCl y agua.

10

15

20

25

El phytoactin da un ensayo positivo con permanganato, y negativo con antrona, cloruro férrico y los ensayos de Molisch y ninhidrin. No proporciona color alguno con ácido sulfúrico concentrado y frío. Se precipita de las soluciones metanólicas acuosas por el sulfato amónico, cloruro cálcico, cloruro cúprico, acetato de plomo, cloruro mercuríco, cloruro sódico, cloruro de zinc, ácidos pícrico, salicílico, fosfotúngstico y tricloroacético, naranja de metilo y sal de Reinecke.

30

El phytoactin proporciona también un ensayo positivo con el biuret, y ensayos negativos por los procedimientos de Millon, Liebermann Buchrad, Maltol, Pauly, Ehrlich (dimetilaminobenzaldehido), y Sakaguchi.

La naturaleza de polipéptido de este antibió-

2  
258251



5

tico, se reveló por hidrólisis con HCl 6N. El hidrolizado, ahora ninhidrin positivo, se analizó utilizando técnicas bidimensionales de cromatografía con papel. La presencia de por lo menos ocho componentes ninhidrin positivos, quedó demostrada; de ellos se identificaron los aminoácidos valina, alfa-alamina, prolina, leucina, (o isoleucina), arginina, glicina y serina.

10

El phytoactin (en solución metanólica) es estable para el calor y no se altera después de calentarse siete días a 40° C. o 3 horas a 65° C. Es dializable a través de membrana de celofana (metanol acuoso al 30%). No es digerido por la pepsina, tripsina, proteasa bacterial del Bacillus subtilis purificada por el método Pabst, o proteasa fungal del Aspergillus oryzae purificada por el mismo método. El phytoactin acusa una

15

energica absorción extrema en las regiones inferiores del ultravioleta, sin máximos acusados en la región de 230 - 410 mμ. Las determinaciones se realizaron en metanol (100 ug/ml.) con un espectrofotómetro Beckman DU.

20

El phytoactin presenta un número de bandas de absorción característica en la región infra-roja, cuando se halla disuelto en cloroformo, las mas significativas de las cuales se encuentran en las frecuencias siguientes (expresadas en micrones): 2,92, 3,04, 3,38, 3,43, 3,48, 5,72, 6,03, 6,54, 6,87, 7,06, 7,23, 7,56, 7,72, 7,80, 8,05, 8,24, 8,68, 9,39, 9,43, 10,07, 10,30, 10,72, 10,80, y 11,00. El espectro se obtuvo en un espectrofotómetro para infra-rojos Perkin-Elmer, modelo 21 de doble rayo, nº de serie 760 (ganancia 5,0, repuesta 1,0, velocidad 5,0, supresión 3,0).

25

30

258251



5 Con objeto de eliminar la absorción del cloro-  
 roformo disolvente, el espectro de absorción infra-ro-  
 ja del phytoactin, se obtuvo también en una bolita de  
 bromuro de potasio, en un espectrofotómetro Baird, Mo-  
 delo 455 I.R. Existe un cambio relativamente reduci-  
 do con respecto a la determinación en solución cloro-  
 fórmica. El phytoactin muestra bandas enérgicas de ab-  
 sorción en las posiciones siguiente, características  
 del enlace péptido, expresadas en micrones y, entre pa-  
 10 réntesis, en número de ondas en recíproco de centíme-  
 tros: 2,77 - 3,07 (3600 - 3250), 3,33 - 3,42 (3000 -  
 2925), 5,87 - 6,24 ( 1700 - 1600), y 6,42 - 6,70 (1560  
 - 1490). Otras bandas acusadas de absorción se presen-  
 tan a 6,0 - 6,07 (1670 - 1640), 6,83 - 6,90 (1470 -  
 15 1450), 7,20 - 7,35 (1390 - 1360), 1,57 - 7,93 (1320 -  
 1260), y 9,25 - 9,43 (1080 - 1060) (muy débil).

20 El phytoactin es ópticamente activo: levorro-  
 tativo ( $\alpha$ )<sub>D</sub><sup>25</sup> = 86° (C = 1, metanol). Se obtuvieron  
 los siguiente datos de titulación electrométrica (ti-  
 tulación iniciada desde la fase ácida):

<u>Disolvente</u>	<u>pK</u>	<u>Peso equivalente</u>	<u>Notas</u>
Agua	2,4	400 a 500 mols/gramo	sin grupo amino libre
Metanol 70%	3,4	3000 mols/gramo	sin grupo amino libre

25 El phytoactin presenta un punto de fusión in-  
 definido que empieza a unos 150° C. y funde con descom-  
 posición aparente. Los márgenes de fusión se determi-  
 naron en un tubo capilar cerrado en un baño de aceite  
 como sigue: 154 - 162° C., 148 - 168° C. y 148 - 171° C.

El análisis elemental del phytoactil propor-

258251



TABLA I: Datos cromatográficos para el phytoactin

<u>Sistema</u>	<u>R<sub>F</sub></u>	<u>Notas</u>	<u>Tiempo Duración Horas</u>
n-butanol saturado de agua	0,96	Mancha bien definida	16
n-butanol-ácido acético-agua(2-1-1)	0,94	" " "	16
n-butanol-piridina-agua (1-0,6-1)	0,97	" " "	16
cloruro amónico acuoso 3%	0,02	" " "	4
acetona acuosa 50%	(0,52 0,94)	residuos Mancha bien definida	6
benceno-ácido acético-agua (2-2-1, fase orgánica)	0,18	residuos	16
butanol terc.-ácido acético- agua(74-3-25)	0,89	Mancha bien definida	28

Los datos cromatográficos para el phytoactin son compatibles con la solubilidad desusada de este compuesto polipéptido, en disolventes de la serie grasa, tales como acetona, metilisobutilketona, y cloroformo.

5 El phytoactin es especialmente eficaz contra los hongos. Tiene también propiedades antibacterianas. En la Tabla II se indica su espectro "in vitro" contra una serie de hongos y bacterias. Estos ensayos se realizaron en tubos inclinados utilizando como medio agar con distintas concentraciones del antibiótico, en las

10 proporciones de 0,01 a 197 microgramos por centímetro cubico. Para todos los cultivos de hongos, se utilizó agar con dextrosa de patata. Para la Candida albicans y los cultivos bacterianos, se utilizó agar con semilla

15 de Penassay. Para los dermatofitos Epidermophyton floccosum, Microsporum gypseum y Tricophyton mentagrophytes, se utilizó agar con maltosa Sabouraud.

- 7 - 58251



Los medios a base de agar se inocularon con los respectivos organismos de ensayo y se incubaron a 28° C., hasta que el tubo de control, que no contenía antibiótico, acusó un buen crecimiento (aproximadamente 2-4 días para los cultivos de hongos y 1 día para C. albicans y los cultivos bacterianos). Se observó la concentración de inhibición de phytoactin para cada uno de estos organismos. El periodo de incubación se continuó luego durante 4 días y se realizaron dos lecturas adicionales de inhibición, a los 2 días y a los 4 días respectivamente (después de la lectura inicial). Un cultivo Endoconidiophora fagacearum (Ceratocystis fagacearum), el agente causativo del agostamiento del roble, se incubó durante un periodo adicional de 4 semanas, sin cambio en el nivel inhibitorio del phytoactin (0,3 ug por c.c.). Los intentos realizados para aislar el E. fagacearum (C. fagacearum) de los niveles inhibidos, resultaron infructuosos. Otro cultivo, ceratostomella ulmi (ceratosystis ulmi), agente causativo de la enfermedad del álamo Holandes, se incubó también durante 4 semanas adicionales sin ningún cambio en el nivel inhibitorio del phytoactin (0,8 ug. por c.c.). Resultaron infructuosos los intentos realizados para aislar el C. ulmi de los niveles inhibidos.

258251



TABLA II: Espectro antimicrobiano del phytoactin "in vitro"

		Cultivo inhibido a la concentración indicada ( $\mu\text{g./c.c.}$ )		
	<u>Cultivo</u>	Después del crecimiento inicial.	2 días después	4 días después
5	<u>Alternaria dianthi</u>	0.8	2.4	7.3
	<u>Alternaria solani</u>	0.8	0.8	0.8
	<u>Botrytis gladiolorum</u>	2.4	2.4	2.4
10	<u>Botrytis cinerea</u>	0.8	2.4	2.4
	<u>Ceratostomella ulmi</u> ( <u>Ceratocystis ulmi</u> )	0.8	0.8	0.8
	<u>Collectotrichum circinans</u>	0.8	0.8	0.8
	<u>Diplodia zeae</u>	0.8	2.4	7.3
15	<u>Endoconidiophora fagacearum</u> ( <u>Ceratocystis fagacearum</u> )	0.3	0.3	0.3
	<u>Endoconidiophora fimbriata</u> ( <u>Ceratocystis fimbriata</u> )	0.8	0.8	0.8
	<u>Endothia parastica</u>	0.8	0.8	2.4
20	<u>Fusarium oxy. f. dianthi</u> 5A	2.4	2.4-197*	2.4-197*
	<u>Fusarium oxy f. gladioli</u>	0.8	7.3	2.4-197*
	<u>Fusarium roseum</u>	2.4	7.3	7.3
	<u>Gibberella zeae</u>	7.3	22-197*	197***
	<u>Glomerella cingulata</u>	0.3	0.8	0.8
25	<u>Helminthosporium sativum</u>	0.8	0.8	0.8
	<u>Helminthosporium victoria</u>	0.8	0.8	0.8
	<u>Macrophominia phaseoli</u>	2.4	2.4	2.4
	<u>Phytophthora cinnomomi</u>	7.3	22-197*	22-197*
	<u>Pythium sp. No. 389</u>	2.4	22	22
30	<u>Rhizoctonia solani</u>	2.4	2.4	2.4
	<u>Sclerotina fructicola</u>	0.8	0.8	0.8



258251  
 TABLA II: Espectro antimicrobiano del phytoactin "in vitro"  
 (continuación)

		Cultivo inhibido a la concentración indicada ( $\mu\text{g./c.c.}$ )		
	Cultivo	Después del crecimiento inicial.	2 días después	4 días después
5	<u>Ustilago sphaerogena</u>	2.4	2.4	2.4
	<u>Verticillium albo-atrum</u>	0.8	2.4	2.4
	<u>Candida albicans</u>	2.4	2.4	2.4
10	<u>Epidermophyton floccosum</u>	0.8	0.8	2.4
	<u>Microsporum gypseum</u>	2.4	2.4	2.4
	<u>Trichophyton mentagrophytes</u>	0.8	0.8	0.8
	<u>Bacillus cereus</u>	7.3	22	22
	<u>Bacillus cereus</u> var. <u>mycoides</u>	7.3	22	22
15	<u>Bacillus Megatherium</u>	7.3	7.3	7.3
	<u>Bacillus subtilis</u>	22	22	22
	<u>Escherichia coli</u>	>197***	>197	>197
	<u>Micrococcus flavus</u>	2.4	2.4	2.4
	<u>Micrococcus pyogenes</u> var. <u>aureus</u>	7.3	22	22
20	<u>Mycobacterium tuberculosis</u> No. 607	>197***	>197	>197
	<u>Sarcina lutea</u>	7.3	22	22
	<u>Fomes igniarius</u> var. <u>populinus</u>	<0.03	0.03	0.03
	<u>Fomes igniarius</u>	0.03	0.09	0.09
25	<u>Fomes everhartii</u>	0.27	0.27	0.27
	<u>Poria Obligua</u>	0.09	0.27	0.27
	<u>Polyporus glomeratus</u>	0.03	0.09	0.27

\* Inhibición parcial del cultivo

30 \*\* Lectura de inhibición realizada cuando el tubo de control acusa un buen crecimiento, corrientemente 2-4 días.

\*\*\*Inhibición nula a este nivel.

258251



5 En estudios realizados en invernáculos, el phytoactin ha demostrado ser un fungicida eficaz para el control de enfermedades de las plantas, tales como el tizón prematuro y tardío del tomate, la roya de las judías y el tizón de la hoja del trigo; estas enfermedades son producidas, respectivamente, por: Alternaria solani (Ell. & Mort.) Jones & Grout, Phytophthora infestans (Mont.) de Bary, Uromyces phasebli (Pers.) Wint. y Puccinia rubigo-vera (DC.) Wint.

10 El phytoactin se forma durante el cultivo de un microorganismo de la familia de los Streptomycetaceae, específicamente, una variedad de la especie Streptomyces Hygroscopicus. Un cultivo de una variedad de microorganismo que se aisló de terreno de los Estados Unidos y produce phytoactin, se ha depositado en la colección de cultivos del Servicio de Investigación Agronómica del Departamento de Agricultura de los EE.UU., División Septentrional de Utilización, Investigación y Desarrollo, Peoria, Illinois, U.S.A., y al cultivo se le ha asignado el nº NRRL 2752 en la colección de cultivos. La variedad se denomina en esta Memoria Streptomyces hygroscopicus NRRL 2752, o sencillamente NRRL 2752. Las características de este organismo son las indicadas en la descripción siguiente:

25 Streptomyces hygroscopicus NRRL 2752

El organismo NRRL 2752 produce esporoforos espirales, y las esporas que varían de ligeramente ovaladas a esféricas, miden de 1 a 1,5 micras de diámetro. Las características de crecimiento del organismo se observaron siguiendo la incubación en los medios de diag-

30

258251



- 5 nóstico o ensayo, a continuación indicados, durante 23 días a 28°C. y se tomó nota de todas las modificaciones en las características de crecimiento que se presentaron después de 23 días y hasta 44 días a 28°C. Las características de crecimiento siguientes son las que se observaron; los colores del micelio aereo se describen de acuerdo con Normas de Color y Nomenclatura de colores de Ridgeway - (Washington, D.C., 1.912)
- 10 Esparraguina-glucosa- extracto de carne agar      Crecimiento excelente con micelio aereo de color neutro pálido a gris neutro pálido. Al cabo de 14 días se formaron zonas negras, que se hicieron jugosas después de 30 días. Reverso amarillo ligeramente oscuro, y pigmento soluble ligeramente oscuro.
- 15 Agar Bennett's -      Crecimiento excelente con micelio vegetativo y jugoso. Reverso amarillo ligeramente oscuro y pigmento soluble ligeramente oscuro.
- 20 Caldo de maiz agar - (Waksman)      Crecimiento moderado con micelio vegetativo incoloro y jugoso. Reverso amarillo oscuro ligeramente, con pigmento soluble ligeramente oscuro.
- 25 Agar Czapek (Difco) -      Crecimiento excelente con micelio aereo de color variable entre gris pálido a neutro. Formación de superficies negras después de 23 días que no se trans-
- 30

2 COPY



258251

- formaban en jugosas después de 23 días ni en húmedas después de 44 días. Reverso amarillo claro y pigmento soluble marrón claro,
- 5 Gelatina (Waksman) - Sin liquidar a los 9 días; liquidada a los 16 días.
- "Leche tornasol" - Anillo blanco de crecimiento con ligera coagulación. 25% de peptonización después de 7 días; 60% después de 14 días; 70% después de 23 días; 90% después de 30 días y 100% después de 44 días. pH de la leche 6,55 después de 23 días.
- 10 "Caldo nitrato" (Difco)-Reducido.
- 15 Harina de cebada-extrac-Crecimiento moderado con pelusilla to de levadura agar de color rata pálido a gris claro en el micelio aereo. Superficies negras en formación después de los 23 días que a los 30 días se transformaron en húmedas.
- 20 Dextrosa de patata agar-Crecimiento de excelente con micelio aereo de color neutro pálido a gris, superficies negras en formación después de 30 días, que no se transformaban en húmedas después de 44 días. Reverso amarillo y pigmento soluble ligeramente marrón.
- 25 Cilindro de patata - Crecimiento escaso con micelio vegetativo parduzco. La punta al secarse variaba entre el blanco y
- 30

25825



gris claro.

5 Almidón agar (Difco) - Crecimiento moderado con micelio acereo con pelusilla gris pálido. Superficies negras en formación después de 14 días, que aparecían jugosas a los 23 días. Reverso amarillo oscuro ligeramente y pigmento soluble marrón claro.

10 Extracto de levadura agar (Waksman) - Crecimiento excelente con micelio vegetativo incoloro y pocas superficies blancas. Reverso amarillo-marrón claro, y pigmento soluble marrón claro.

15 Los resultados anteriores comprendieron las superficies oscuras características del S. higroscopicus, que se presentaron en la esparraguina-glucosa-extracto de carne agar, agar Czapek, harina de cebada-extracto de levadura agar, dextrosa de patata agar y almidón agar. El organismo producía también el micelio aereo de color gris en una serie de medios, y las características hifas compactas portadoras de esporas, se produjeron en medios de agar tales como la esparraguina-glucosa, extracto de carne agar, la dextrosa de patata agar y la harina de cebada-extracto de levadura agar.

25

#### Phytostreptin

El phytostreptin es un polipeptido que tiene un grupo amino libre evidente, como se indica mas adelante por sus propiedades químicas y físicas. Constituye un tanino sólido muy ligero y es soluble en agua, en solución normal de hidróxido sódico (forma gel por reposo), metanol, etanol,

30

258251



isopropanol, n-butanol, cloroformo, acetona, metilisobutil-  
ketona, dioxano, tetrahidrofurano, formamida y cloruro de  
etileno. Es ligeramente soluble en éter dietílico y en ácido  
clorhídrico normal, e insoluble en éter de petróleo (30° -  
5 60°C.), benceno y acetato de etilo.

El phytostreptin dá ensayos positivos con perman-  
ganato y biuret, y ensayos negativos con antrona, cloruro  
férico, Molisch, ninhydrin, Millón, Liebermann Buchard,  
maltol, Pauly, Ehrlich (dimetilaminobenzaldehido), Sakaguchi  
10 y Fehling. No proporciona coloración alguna con el ácido  
sulfúrico concentrado en frío. Se precipita de la solución  
acuosa por el sulfato amónico, cloruro cálcico, cloruro bá-  
rico, cloruro cúprico, cloruro sódico, cloruro de cinc, ácido  
pírico, ácido fosfotungstico, ácido tricloroacético, naran-  
15 ja de metilo y sal de Reinecke.

La naturaleza polipeptida de este antibiótico, se  
reveló por hidrólisis con ácido clorhídrico 6N. El hidroli-  
zado, ya ninhydrin-positivo, se analizó utilizando técnicas  
bi-dimensionales de cromatografía en papel. La presencia  
20 de por lo menos ocho componentes ninhydrin-positivos, se  
descubrió y se identificaron entre ellos los amino-ácidos  
valina, alfa-alanina, prolina, leucina (o isoleucina), argi-  
nina, clicina y serina.

El phytostreptin es termoestable; no se presenta  
25 pérdida de actividad cuando se somete a reflujo a 65°C. du-  
rante 6 horas una solución metanólica, o cuando soluciones  
al 30% en metanol acuoso, ajustadas para pH 3, 7 y 10, se  
calientan a 85°C. durante 30 minutos. Puede deslizarse a  
través de una membrana de celofán (solución acuosa). No es  
30 digerido por la pepsina, tripsina, por la proteasa Pabst



258251

purificada de la bacteria Bacillus subtilis ni por la proteasa Babst purificada del hongo Aspergillus oryzae.

5 El phytostreptin presenta una absorción final energética en las regiones inferiores del ultravioleta, sin máximos significativos en la región 230-410  $\mu$ . Las determinaciones se hicieron en metanol (110  $\mu$ g/ml.) con un Espectrofotometro Beckman DU.

10 El phytostreptin presenta una serie de bandas de absorción características, en la región infra-roja, cuando se disuelve en cloroformo; las mas significativas de ellas se encuentran en las frecuencias siguientes (expresadas en micras): 2,93, 3,08, 3,20, 3,33, 3,45, 3,52, 4,12, 5,71, 5,74, 6,05, 6,15, 6,56, 6,70, 6,95, 7,12, 7,60, 7,76, 7,86, 8,12, 8,86, 9,05, 9,42, 10,06, 10,34, 10,80, 11,00, 11,46, 11,70 y 13,30.  
15 El espectro se obtuvo en un espectrofotómetro de doble haz infra-rojo Perkin-Elmer Modelo 21, nº de serie 760 (ganancia 5,0, respuesta 1,0, velocidad 6,0 y supresión 3,0).

20 Con objeto de eliminar la absorción del cloroformo disolvente, el espectro de absorción infra-roja del phytostreptin, se obtuvo también en una bola de bromuro potásico, en un espectrofotómetro Baird Modelo 455 I.R. Existe un cambio relativamente pequeño con respecto a la determinación en solución clorofórmica. El phytostreptin presenta bandas  
25 energéticas de absorción, en las posiciones siguientes, características del enlace peptido, expresadas en micras y entre parentesis en número de ondas, en recíproco de centímetros: 2,77-3,07 (3.600-3.250), 3,33-3,42 (3.000-2.925), 5.872-6,24 (1.700-1.600) y 6,42-6,70 (1.560-1.490). Otras bandas de absorción significativas, se presentan a 6,0-6,07 (1.670-1.640)  
30 6.83-6,90 (1.470-1.450), 7,20-7,35 (1.390-1.360) (resalto),

258251



7,57-7,93 (1.320-1.260) y 8,77-9,43 (1.140-1.060).

El phytostreptin es opticamente activo; levorotativo  $[\alpha]_D^{26} - 81^\circ (C = 1, \text{metanol})$ . Los datos siguientes de titulaci3n electrom3trica, se obtuvieron empezando la titulaci3n en condiciones 3cidas.

5

Disolvente	pK	Peso equivalente	Notas
Agua	2,4	1.000 g/mol grupo	evidente carboxilo libre
	9,6	3.500 " "	" amino libre
70%	3,4	3.300 " "	" carboxilo libre
Metanol	9,4	3.300 " "	" amino libre

10

El phytostreptin tiene un punto de fusi3n indefinido, que empieza alrededor de 165°C. y funde con evidente descomposici3n. Se determinaron los m3rgenes de fusi3n en un tubo capilar cerrado en un ba1o de aceite encontr3ndose: 168-178°C., 166-172°C. y 166-173°C.

15

El an3lisis elemental del phytostreptin di3 los valores siguientes:

	<u>C</u>	<u>H</u>	<u>N</u>
	52,56	7,93	13,53
	52,44	7,66	13,26
	53,70	8,44	13,38
	<u>53,45</u>	<u>8,29</u>	<u>13,48</u>
Media	53,04	8,08	13,41

20

25

Se comprob3 que el nitr3geno am3dico era 1,5%.  
Ausencia de azufre y hal3geno.

30

El peso molecular del phytostreptin se ha comprobado que es 28.600 (mas o menos 10%) por la modificaci3n de Ehrenberg del m3todo de Archibald para la aproximaci3n al equilibrio de sedimentaci3n. Se realizaron dos determinaciones ultracentr3ficas, con pH 7,2, amortigua-



258251

5 dor "tris" 0,01 molar y con 0,05 de cloruro sódico molar añadido como electrolito de soporte. El phytostreptin obtenido como se ha descrito, satisfizo la primera exigencia para la homogeneidad ultracentrífuga en los experimentos de "velocidad ultracentrífuga". El material proporcionó solamente una zona de sedimentación que permaneció simétrica durante todos los experimentos.

10 El phytostreptin se examinó con cromatografía ascendente en papel, monodimensional, utilizando papel Whatman nº 1 y los sistemas disolventes indicados en la tabla III. Los cromatogramas obtenidos se secaron al aire a la temperatura ambiente y se bio-autografiaron en placas de agar sembradas con Glomerella cingulata.

TABLA III: Datos cromatográficos para el phytostreptin

	<u>Sistema</u>	<u>R<sub>f</sub></u>	<u>Notas</u>	<u>Tiempo ensayo horas.</u>
	Agua saturada con n-butanol	0,00	mancha bien definida	7
	n-butanol saturado con agua	0,91	" " "	16
20	n-butanol-ácido acético agua (2-1-1)	0,93	" " "	16
	n-butanol-piridina-agua (1-0,7-1)	0,92	" " "	16
	Cloruro amónico acuoso 3%	0,00	" " "	4
25	Acetona acuosa 50%	0,53	Restos	6
		0,93	Mancha bien definida	
	Butanol tert. ácido acético-agua (74-3-25)	0,91	" " "	28
	n-butanol-metanol-agua (4-1-2)	0,98	" " "	8
30	Benceno-metanol (4-1)	0,98	" " "	5



Los datos cromatográficos para phytostreptin son compatibles con la solubilidad desusada de este compuesto polipéptido en disolventes grasos tales como acetona, metilisobutilketona y cloroformo.

5 El phytostreptin forma sales de metal alcalino tales como la sal sódica con bases de metal alcalino y otras sales sencillas y complejas del phytostreptin, pueden prepararse con facilidad. Las sales de phytostreptin comprenden las sales de cobre, zinc, y manganeso, y las sales complejas melibdato, picrato, heliantato y reineckato. Estas sales son ligeramente solubles o solubles en agua, hidróxido 10 sódico normal y cloroformo. Son ligeramente solubles en ácido clorhídrico normal y solubles en metanol y acetona. Las sales son activas contra el organismo de ensayo Glomerella cingulata.

15 El phytastreptin es especialmente eficaz contra los hongos. Tiene también propiedades antibacterianas, Su espectro "invitro" contra una serie de hongos y bacterias se indica en la Tabla IV. Además, en un ensayo de prueba disco de papel-phaca de agar, empleando dextrosa de patata agar, 20 el phytostreptin desarrolló zonas de inhibición contra Ceratostomella ulmi (Ceratocystis ulmi, agente causativo de la enfermedad del olmo holandés, a 40 ug. por milímetro.

Los ensayos que figuran en la Tabla IV, se realizaron en tubos inclinados de agar utilizando medios de 25 agar que contenían distintas concentraciones de phytostreptin comprendidas entre 0,01 y 197 ug por ml. Se utilizaron los mismos procedimientos antes descritos para el phytoactin en relación con la Tabla II. Un cultivo 30 Endoconidiophora fagacearum (Ceratocystis fagacearum),



258251

agente causativo del agostamiento del roble, se incubó durante un periodo adicional de 4 semanas, sin cambio en el nivel inhibitorio del phytostreptin (0,3 µg. por mililitro). Fueron infructuosos los intentos de aislar el E. fagacearum (C. Fagacearum de los niveles inhibidos.

TABLA IV: Espectro antimicrobiano "in vitro" del Phytostreptin.

		Cultivo inhibido a la concentración indicada. (µg./m/.)	
		Después del crecimiento inicial**	
	<u>Cultivo</u>		
		2 días después	4 días después
	<u>Alternaria dianthi</u>	2.4	2.4
	<u>Alternaria solani</u>	0.8	0.8
15	<u>Botrytis gladiolorum</u>	0.8	2.4
	<u>Botrytis cinerea</u>	2.4	2.4
	<u>Colletotrichum circinans</u>	0.8	2.4
	<u>Diplodia zeae</u>	2.4	2.4
20	<u>Endoconidiophora fagacearum</u> 0.3 ( <u>Ceratocystis fagacearum</u> )	0.3	0.3
	<u>Endoconidiophora fimbriata</u> 0.8 ( <u>Ceratocystis fimbriata</u> )	0.8	0.8
	<u>Endothia parasitica</u>	0.8	2.4
	<u>Fusarium oxy. f. dianthi</u> 7.3 5A	7.3	7.3-197*
25	<u>Fusarium oxy f. gladioli</u>	2.4	2.4-197*
	<u>Fusarium roseum</u>	2.4	7.3
	<u>Gibberella zeae</u>	7.3	7.3-197* 22-197*
	<u>Glomerella cingulata</u>	0.3	0.8
	<u>Helminthosporium sativum</u>	0.8	2.4
30	<u>Helminthosporium victoria</u>	0.8	0.8



058251  
 TABLA IV: Espectro antimicrobiano "in vitro" del Phytostreptin. (continuacion)

Cultivo inhibido a la concentración indicada (  $\mu\text{g.}/\text{m}/.$  )

	Cultivo	Después del crecimiento inicial.**	2 días después	4 días después
5	<u>Macrophominia Phaseoli</u>	2.4	2.4	2.4
	<u>Phytophthora cinnamomi</u>	7.3	7.3-197*	7.3-197*
	<u>Pythium sp. No. 389</u>	7.3	22	22
10	<u>Sclerotinia fructícola</u>	0.8	0.8	2.4
	<u>Rhizoctonia solani</u>	2.4	2.4	2.4-197*
	<u>Verticillium albo-atrum</u>	0.8	2.4	2.4
	<u>Candida albicans</u>	2.4	2.4	2.4
	<u>Epidermophyton floccosum</u>	0.8	0.8	2.4
15	<u>Microsporum gypseum</u>	2.4	2.4	2.4
	<u>Trichophyton mentagrophytes</u>	0.8	2.4	2.4
	<u>Bacillus cereus</u>	7.3	22	22
	<u>Bacillus cereus var. mycoides</u>	7.3	22	22
	<u>Bacillus megatherium</u>	7.3	7.3	7.3
20	<u>Bacillus subtilis</u>	7.3	22	22
	<u>Escherichia coli</u>	>197***	>197	>197
	<u>Micrococcus flavus</u>	0.3	2.4	2.4
	<u>Micrococcus pyogenes var. aureus</u>	2.4	7.3	7.3
	<u>Mycobacterium tuberculosis No. 607</u>	>197***	>197	>197
25	<u>Sarcina lutea</u>	2.4	2.4	2.4
	<u>Fomes igniarius var. populinus</u>	0.03	0.09	0.09
	<u>Fomes igniarius</u>	0.09	0.27	0.81
	<u>Fomes everhartii</u>	0.09	0.27	0.27
	<u>Poria obligua</u>	2.4	2.4	2.4
30	<u>Polyporus glomeratus</u>	0.27	0.81	0.81

258251



- \* -Inhibición parcial del cultivo
- \* \* -Lecturas de inhibición realizadas cuando el tubo de control acusó buen desarrollo, corrientemente de 1 a 4 días;
- 5 \* \* \* -Sin inhibición a este nivel.

10 El phytostreptin y las sales anteriores sencillas y complejas han demostrado en estudios realizados en invernáculos, constituir un fungicida eficaz para el control de las enfermedades de las plantas tales como tizón prematuro y tardío del tomate, y roya de la judía. Estas enfermedades las causan respectivamente la Alternaria solani (Ell. & Mort.) Jones & Grout; Phytophthora infestans (Mont.) de Bary y Uromyces phaseoli (Pers.) Wint.

15 El phytoactin y el phytostreptin son muy parecidos entre sí en cuanto a sus características y propiedades; sin embargo se distinguen fácilmente por sus propiedades de solubilidad en agua, análisis elemental, peso molecular, porcentaje de nitrógeno amídico, espectro infra-rojo y titulación electrométrica. Ambos fungicidas (antihongos), son perfectamente distintos de los demás antibióticos, antibacterianos, fungicidas, anteriormente conocidos.

25 El phytostreptin se produce análogamente por cultivo de un miembro de la familia Streptomycetaceae, específicamente, una variedad de la especie Streptomyces Hygroscopicus. Un cultivo de una variedad de un microorganismo que se aisló de un terreno de los Estados Unidos y que produce phytostreptin, se ha depositado en la colección de cultivos antes citada, y se le ha

30



258251

asignado el número NRRL 2751. Las características de la variedad NRRL 2751, son muy parecidas a las de la variedad NRRL 2752. Existen sin embargo características morfológicas y bioquímicas que distinguen los dos organismos, especialmente una diferencia acusada en el grado de peptonización de la leche. En varios medios el NRRL 2752 forma micelio-aéreo mas oscuro. Una descripción del organismo NRRL 2751, es la que figura a continuación:

5

10

Streptomyces hygroscopicus NRRL 2751

El organismo NRRL 2751, produce esporoforos espirales, y las esporas, de forma que varia entre ligeramente ovalada a esférica, miden de 1 - 1,3 micras de diámetro. Las características de crecimiento del organismo se observaron siguiendo la incubación en los medios indicados, durante 23 días a 28° C., y se tomó nota de cualquier modificación en las características del crecimiento, que se presentó después de los 23 días y hasta 44 días a 28° C. Las características de crecimiento siguientes fueron las observadas y los colores del micelio aéreo se describen de acuerdo con Ridgeway, como en el caso anterior.

15

20

Esparraguina-glucosa-  
extracto de carne agar

Crecimiento excelente, con micelio aéreo gris y neutro. Reverso amarillo-marrón claro y pigmento soluble marrón claro.

25

Agar Bennett's

Crecimiento excelente con micelio vegetativo incoloro y seco. Reverso amarillo marrón claro y pigmento soluble marrón

30



258251

	claro.
5	Caldo de maíz empapado agar (Waksman) Crecimiento excelente con micelio vegetativo rugoso, incoloro y seco (húmedo después de 7 días). Micelio aéreo blanco y reducido formado después de 30 días. Reverso amarillo marrón claro con pigmento soluble marrón oscuro.
10	Agar Czapek (Difco) Crecimiento excelente con micelio aéreo de color variable entre gris pálido a pálido neutro. Superficies negras formadas después de 30 días, que no se humedecían después de 44 días. Reverso amarillo claro y pigmento soluble marrón claro.
15	Gelatina (Waksman) Licuado después de 9 días.
20	Leche tomasol Anillo de crecimiento de incoloro a blanco, sin coagulación. Sin peptonización después de 7 días, 100% después de 14 días. pH de la leche 6,6 después de 23 días.
	Caldo nitrato (Difco) Reducido.
25	Harina de avena- Crecimiento excelente con micelio
	Extracto de levadura agar/aéreo gris neutro. Superficies negras que se formaban después de 30 días y no se humedecían después de 44 días.
30	Dextrosa de patata agar Crecimiento excelente con micelio aéreo neutro claro a neutro gris.

258251



Reverso amarillo marrón y pigmento soluble marrón claro.

Pedazo de patata-

5

Crecimiento reducido con micelio vegetativo incoloro. Punta de secado de color variable entre blanco y gris claro. Superficies negras que se formaban en el extremo después de 44 días.

Almidón agar (Difco)-

10

Crecimiento excelente con micelio aereo color gris rata. Reverso amarillo marrón claro y pigmento soluble marrón claro.

Extracto de levadura -  
(Waksman)

15

Crecimiento excelente con micelio aereo color humo gris pálido. Superficies gris oscuro que se formaban después de 30 días y no se humedecían después de 44 días. Reverso amarillo marrón claro y pigmento soluble marrón claro.

20

Los resultados anteriores comprendían las superficies oscuras características del S. hygroscopicus, que se presentaban en el agar Czapek, harina de avena-extracto de levadura agar, pedazo de patata y extracto de levadura agar. Además, el organismo presentó superficies negras húmedas en cortes de placas de almidón agar de un año de preparación, refrigeradas. El organismo produjo también el micelio aereo color gris, característico en varios medios, y las hifas portadoras de esporas compactas y características, se produjeron en medios a base de agar tales como esparraguina-glucosa-extracto de carne agar, patata-dextrosa-agar y harina de avena-extracto de levadura agar.

30



258251

Producción de antihongos por fermentación

5 Los fungicidas se obtienen haciendo fermentar un medio nutritivo con un microorganismo productor de phytoactin o phytostreptin, tal como el Streptomyces hygrocopicus NRRL 2.752 ó 2.751, respectivamente. Con preferencia se hace fermentar un medio nutritivo acuoso en condiciones de sumersión, aerobias y en agitación, hasta producirse una actividad fungicida apreciable. Los fungicidas pueden determinarse corrientemente por el método de ensayo en placa de agar, utilizando Glomerella cingulata o cándida albicans como organismo de prueba.

10 Los medios nutritivos adecuados para la producción del fungicida, comprenden un generador adecuado de carbono asimilable, con preferencia un generador de carbohidrato tal como glucosa, un generador de nitrógeno asimilable, tal como harina de soja, caldo de maiz, levadura y similares, y sales minerales que pueden estar presentes con los demás ingredientes, tal como caldo de maiz. El organismo a inocular se prepara haciendolo crecer en medio de agar tal como harina de avena o peptonextracto de levadura. Estos cultivos en agar pueden usarse a continuación para preparar grandes cantidades de inyección, sembrando frascos a sacudir que contengan medios tales como harina de soja y caldo de maiz. Estos frascos se sacuden en condiciones adecuadas para el crecimiento del organismo. Los cultivos de dichos frascos, pueden usarse a continuación para la preparación de grandes cantidades de inyección o, como variante, pueden utilizarse para la siembra de los fermentadores directamente. Durante la preparación del material a inocular y

258251



durante la ulterior fermentación, deben mantenerse las condiciones asepticas.

5 En la fermentación, el medio deseado se prepara y se ajusta su pH aproximadamente a 6,3 - 7,5, con preferencia entre 6,7 y 7,2. En el medio preferido se añade carbonato cálcico. El medio así preparado, se esteriliza caldeándolo a una temperatura elevada sometido a presión, o sea a unos 120° C. A continuación el medio se enfría a una temperatura de 24 á 36° C. 10 aproximadamente, con preferencia de 27 a 34° C. A continuación el medio estéril se inocula en condiciones asépticas con el producto a inocular preparado como antes se describe.

15 La fermentación prosigue luego a un temperatura tal como se ha indicado, con agitación y aireación, empleando aire estéril. El período de fermentación puede variar con los distintos medios y las diferentes condiciones de trabajo. El aire se suministra corrientemente a razón de 0,25 á 1,5 volúmenes de aire libre por 20 volumen de medio, por minuto. La fermentación se continúa durante un período de tiempo suficiente para lograr la producción óptima y con preferencia máxima de phytistreptin o phytoactin, según el caso. En general es suficiente un período de fermentación de 48 á 96 horas. 25 ras.

30 Los fungicidas pueden recuperarse por varios métodos o, como variante, todo el cultivo o todo el caldo, puede usarse como tal, o puede concentrarse o secarse por medios apropiados. Generalmente se prefiere recuperar el fungicida por precipitación o por extrac-

258251

2 MAY 1951



5 ción con disolvente de todo el cultivo o de todo el cal-  
do. En el método de recuperación por precipitación, se  
filtra o centrifuga corrientemente todo el cultivo a un  
pH de 7 á 8, y el filtrado se acidifica hasta un pH pre-  
ferido de 3 á 5 para precipitar el fungicida. El ácido  
preferido para esta etapa de precipitación, es el ácido  
clorhídrico, aunque también pueden usarse otros ácidos.  
Dado que el micelio del cultivo contiene cantidades apre-  
ciables de fungicida, como variante puede ajustarse todo  
10 el cultivo (sin filtración) a un pH de 3 á 5, para la  
fase de precipitación.

La actividad puede recuperarse del precipita-  
do o sedimento por extracción con un líquido orgánico  
adecuado en el que sea soluble, tal como etanol, metanol,  
15 isopropanol, butanol, acetona o metilisobutil ketona. La  
solución disolvente puede evaporarse a continuación en  
vacío y el residuo resultante extraerse de nuevo con di-  
solventes orgánicos. En el método de recuperación pre-  
ferible, el último residuo, después de evaporación, se  
20 extrae al máximo con metilisobutil ketona, y la solución  
disolvente se concentra a pequeño volumen, en vacío. El  
fungicida puede precipitarse a continuación por la adi-  
ción de 5 volúmenes de éter dietílico. El fungicida que  
permanece en el líquido madre de metilisobutil ketona-  
25 éter, puede recuperarse por concentración del líquido ma-  
dre a pequeño volumen en vacío, y añadiendo 5 volúmenes  
de éter de petróleo (30 - 60° C.) para precipitar la ac-  
tividad. Como variante, un extracto en disolvente de  
todo el cultivo, todo el caldo o sedimento activo precipi-  
30 tado, puede usarse como tal o después de concentración

258251



en vacío, sin ulterior purificación.

Control de enfermedades producidas por hongos.

5 La enfermedad debida a un hongo se controla  
o combate aplicando uno de los fungicidas de tal modo  
que establezca contacto con el hongo causal. Para ello  
el fungicida puede aplicarse a la zona en que el hongo  
se halla presente o puede presentarse. La aplicación  
puede realizarse a las semillas, a las plantas a prote-  
ger, y/o al terreno circundante. Se prefiere aplicar  
10 el fungicida sobre o en la proximidad de las plantas  
sometidas a control. Cuando se requieren huéspedes o  
vehículos distintos para la extensión del hongo, es po-  
sible en tal caso aplicar el fungicida a o cerca del  
huésped preciso. Estos comprenden las plantas herbáceas  
15 anuales y perennes, y las plantas y malezas de hojas an-  
chas.

Los métodos de tratamiento más comunmente em-  
pleados, comprenden, con preferencia, el tratamiento de  
semillas, la pulverización de germenés aletargados, la  
20 pulverización de hojas, la pulverización y la inyección  
de troncos. Puede también ser eficaz el tratamiento del  
suelo por canales, especialmente en el caso de plantas  
jóvenes y las raíces de estas pueden sumergirse en una  
solución del fungicida, antes de la plantación. Además,  
25 el empleo de polvos susceptibles de mojarse y de polvos  
secos, pueden ser también eficaces.

La concentración del fungicida en la solución  
de pulverización se elige adecuadamente entre los lími-  
tes de 5 á 2.000 partes por millón, con preferencia en-  
30 tre los límites de 100 á 400 partes por millón, y se a-

258251

20 MAY



5 plica a razón de 1 á 1.000 gallones por acre ( un gallón = 4,54 litros, un acre = 0,404 hectareas) según el tipo de enfermedad de tal modo que se apliquen de 0,1 á 8.000 g. de fungicida por acre en líquido acuoso, líquido orgánico acuoso y líquido orgánico para constituir las soluciones y otros tipos de dispersiones tales como emulsiones y suspensiones de polvos mojables. Como variante, puede ser conveniente una composición sólida según el tipo de aplicación. El fungicida se encuentra  
10 presente, con preferencia, en una concentración de alrededor de 0,1 % a 10 % en peso, junto con una substancia inerte con preferencia un diluyente de tipo agrícola prácticamente no-phytotoxico, tal como bentonita, tierra de diatomeas, tierra de infusorios, piedra pomez, etc. Como diluyente pueden emplearse solidos de fermentación. La composición sólida, puede pulverizarse sobre la plantas o superficies circundantes, del modo corriente. En las composiciones sólidas, para favorecer la aplicación, pueden incorporarse materias para la adherencia a las plantas y/o agentes de superficie activa.  
15  
20

25 En el tratamiento por pulverización del follaje, se prefiere además, así como otros varios métodos, que la composición contenga una pequeña proporción de un agente de superficie activa. La concentración de este agente es con preferencia del orden de 0,025 á 0,2% aproximadamente, en peso, para la aplicación al follaje.

30 La pulverización en jardines, invernáculos, plantales, campos, bosques y plantaciones se realiza con preferencia durante la estación de crecimiento. Co-

20 MAY 1960



258251

5

mo variante, puede ser conveniente, por ejemplo en el caso de arboles, aplicar el fungicida durante el período de estacionamiento del crecimiento. Se utilizan aparatos convencionales para la pulverización a ella y desde tierra.

10

15

20

En el tratamiento de pulverización del follaje, se recomienda la aplicación del fungicida al mismo en la época de salida. En el tratamiento de troncos se recomienda, por ejemplo en el caso de árboles infectados que tengan canchros o lesiones similares, que el fungicida se aplique en solución acuosa oleaginosa o en los dos disolventes en el punto en que se presentan las hendiduras que aparecen en la corteza alrededor de los bordes del cancro, o a la superficie cortada de los troncos descubiertos. Generalmente basta pulverizar alrededor del tercio inferior del árbol o menos, en el caso de arboles muy altos. Como variante, puede ser conveniente inyectar las soluciones fungicidas mediante una jeringa en el extremo separado del centro de los canchros o similares. La concentración de fungicidas para estos tratamientos es de 25 á 2.000 partes por millón, aproximadamente, con preferencia de 100 á 400 partes por millón.

25

30

Para el tratamiento del suelo mediante zanjas y para el tratamiento de las raíces por inmersión, se recomiendan dispersiones acuosas que contengan alrededor de 25 á 2.000 partes por millón, con preferencia de 100 á 400 partes por millón aproximadamente del fungicida. Como variante, puede aplicarse una preparación seca al suelo, que contenga de 0,01 á 10% del fungicida

258251



mezclado con un diluyente sólido convencional.

El phytostreptin es soluble en agua, y el phytoactin es ligeramente soluble en agua produciendo una solución coloidal homogénea. Los fungicidas, con preferencia, se proporcionan primero en forma de un concentrado en un disolvente orgánico miscible en agua que, con preferencia, contiene un agente de superficie activa. Las formas purificadas de los fungicidas son susceptibles de empleo o bien, por economía pueden utilizarse productos de fermentación en grado técnico o concentrados de los mismos. Estos productos técnicos pueden obtenerse en cualquier etapa de la recuperación del fungicida partiendo del producto de fermentación. Se prefiere que el producto se concentre suficientemente de tal modo que el contenido de fungicida sea superior a unos 25 mg/g. de sólidos. En este caso, es más preferible añadir un agente de superficie activa ya que los subproductos de fermentación asociados, se mantienen más fácilmente en dispersión. Además se ha observado una actividad superior con las combinaciones que contienen un agente de superficie activa. Los productos purificados y de tipo técnico, pueden utilizarse análogamente en las composiciones sólidas, mezclando íntimamente los productos secos, concentrados, o dispersiones diluídas de los mismos, con diluyentes y secando si es preciso.

El disolvente empleado para producir el concentrado fungicida, es con preferencia un alkanol inferior, tal como el metanol, etanol o, con mayor preferencia, el isopropanol. La concentración de fungicida en

20 MAY 1951



258251

5 el concentrado es con preferencia del orden de 10 á  
250 mg/ml., y el agente de superficie activa se halla  
presente con preferencia en una relación ponderal con  
el fungicida, del orden de aproximadamente 5 á 125:1  
10 El concentrado bien conteniendo, o bien mezclando an-  
tes con preferencia, con el agente de superficie ac-  
tiva se diluye con agua o líquido orgánico que se uti-  
lice en la concentración. La concentración preferida  
del agente de superficie activa en la solución aplica-  
da para tratamiento, es del orden de aproximadamente  
15 100 á 3.5000 partes por millón, o de 0,01 á 0,35 % en  
peso.

Al emplear fungicidas puros, los concentra-  
dos alkanolicos pueden diluirse con agua para las con-  
centraciones a usar. Las preparaciones de fungicidas  
de grado técnico, se diluyen, con preferencia, con va-  
rios volumenes adicionales del disolvente, antes de la  
dilución con agua, especialmente en el caso del phyto-  
actin, menos soluble en agua. Como variante, puede in-  
corporarse un agente de superficie activa, como antes  
se indica, sin necesidad de disolvente adicional para  
mantener la dispersión.

La tabla 5 siguiente, indica la preparación  
de soluciones claras representativas de fungicida en  
aceite combustible, que es uno de los productos prefe-  
ridos desde el punto de vista de penetración, baja phy-  
totoxicidas, evaporación reducida, coste bajo y dispo-  
nibilidad, aunque pueden emplearse otros líquidos or-  
gánicos adecuados, tal como por ejemplo glicol etilé-  
nico, eter monometílico, ciclohexanol y ciclohexanona.

258251



Las soluciones se preparan con dilución de los concentrados fungicidas indicados en isopropanol, primero con isopropanol y luego con aceite combustible. En estas composiciones, no figura ningún agente de superficie activa. Como variante las composiciones pueden contener un agente de superficie activa.

TABLA V: Composiciones fungicidas y diluciones

Concentración del fungicida en la solución de partida mg/ml. de isopropanol.	Cantidad de solución de partida ml.	Isopropanol adicional ml.	Aceite combustible añadido, ml.	Concentración final de fungicida partes por millón.
100	0.1	2	8	1000
50	0.1	1.5	8.5	500
25	0.1	1	9	250
12.5	0.1	0.5	9.5	125
100 <sup>a</sup>	0.1	3	7	1000

Fungicida grado técnico; 150 - 350 mg. de fungicida por gramo de sólidos.

10 Como ejemplo de la preparación de una composición con empleo de agente de superficie activa, se obtienen soluciones claras en aceite, con soluciones preparadas de los fungicidas que contengan una concentración de 100 mg/ml. del isopropanol, añadiendo a un volumen de la solución preparada de fungicida, 20 volúmenes de isopropanol, luego un volumen de agente de superficie activa y después 80 volúmenes de aceite combustible. La concentración final de fungicidas

15

258251



es de alrededor de 1.000 partes por millón, y puede reducirse por dilución con aceite combustible.

5 El agente de superficie activa, puede ser, por ejemplo, un alcohol polieter alkilarílico, insoluble en agua y soluble en aceite (por ejemplo Triton X-45) un fenoxi-polietoxi etanol, iso-octílico no iónico, tal como el producto de reacción de octil fenol con 10 mols de óxido de etileno (por ejemplo Tritón X-100), un alcohol polieter alkil arílico no-iónico, 10 dispersable en agua (por ejemplo Tritón X-155), etanol nonílico fenoxi-polioxi-etilénico, no iónico, (por ejemplo Igepal CO-430, Igepal CO-530, y Arctic Syntex 036), o un oleato-laurato no-iónico de polioxi-etileno-sorbitol (por ejemplo Atlox 1.045 A).

15 Como se verá, este invento resulta especialmente útil para impedir, controlar y destruir enfermedades producidas por hongos en distintos tipos de árboles y otras plantas susceptibles a estas enfermedades. Por ejemplo, en ensayos realizados en pino blanco 20 occidental en los bosques nacionales de los Estados Unidos, se aplicó phytoactin como pulverización foliar y para el tratamiento de pulverización de troncos, con un 100 % aproximadamente de efectividad para destruir el ataque y los canchales a las ramas y retoños de dichos árboles (Cronartium ribicola). Se aplicaron a 25 razón de unos 20 galones por acre dispersiones acuosas que contenían de 100 á 800 partes por millón de phytoactin y 0,1% de agente de superficie activa (Triton X-155). Se comprobó que el phytostreptin era también eficaz, en ensayos análogos, con una actividad 30

258251

20 MAY



ligeramente inferior a la del phytoactin, de tal modo que éste último es actualmente el fungicida preferido para esta enfermedad, y para las demás producidas por Cronartium fungi, por ejemplo C. fusiforme,  
5 C. cerebrum, C. harknessii, C. coleosporioides, Peridermium cerebroides, C. filamentosum, C. comptonia,  
C. comandras, C. occidentale, C. strobilinum y C. conigenum.

En otro ejemplo, este invento se usó en un  
10 bosque para el tratamiento de robles experimentalmente inoculados con la enfermedad de estos árboles (Ceratocystis fagacearum). La aplicación de composiciones de este invento por pulverización de follaje, canales en el suelo, inyección de ramas o de troncos,  
15 resultó útil en el retardo o prevención de la enfermedad. Análogamente, la aplicación de las composiciones de este invento para el tratamiento de olmos o álamos negros con la enfermedad (Ceratocystis ulmi), resultó útil para impedir la enfermedad.

Este invento es útil también para el tratamiento de otras enfermedades producidas por hongos en los árboles, así como para muchas otras enfermedades de otras plantas a ellas sensibles. Por ejemplo las composiciones de este invento son útiles para impedir  
20 controlar y destruir el tizón pulverulento de las manzanas (Podosphaera leucotricha), la enfermedad producida en las manzanas por (Venturia inaequalis), la roya de las manzanas (Gymnosporangium juniperi virginianae), las manchas en las manzanas (Gloeodes pomigena),  
25 máculas en las manzanas (Leptothyrium pomi), tizón  
30

- 30 25825<sup>2</sup> MAY



pulvarulento de las peras, (Podosphaera leucotricha),  
roya marrón del albaricoque (Monilinia fructicola) y  
manchas en las hojas del café americano (Mycena citri-  
cola) así como es útil también para prevenir, contro-  
5 lar y desenraizar el tizón pulverulento de los vegeta-  
les susceptibles de ser atacados por él, por ejemplo  
rosas, flox, zinnias, habas, pepino, calabazas y tri-  
go. Además, la composición de este invento ha resulta-  
do útil para controlar otras importantes enfermedades  
10 producidas por los hongos tales como la roya del anti-  
rrino (Puccinia antirrhini), la roya de las judías (U-  
romyces phaseoli) la roya del trigo (Puccinia graminis  
tritici, P. rubigo-vera tritici), así como otros muchos  
tipos de enfermedades debidas a los hongos que atacan  
15 plantas susceptibles de contraerlas, tal como por ejem-  
plo la roña de los crisantemos (Ascochyta sp.) y las  
manchas grises de las hojas (Botrytis cinerea), las man-  
chas grises de las Hojas de los gladiolos (B. gladio-  
lorum), el tizon prematuro del tomate (Alternaria sola-  
20 ni) el tizón tardío (Phytophthora infestans), las man-  
chas en las hojas (Septoria lycopersici) y las manchas  
grises en las hojas (Stemphylium solani) la roya pre-  
matura del apio (Cercospora apii) y la roya tardía (Sep-  
toria apii-graveolentis), lunares del cespéd (Pellicula-  
25 ria filamentosa), manchas duras (Sclerotinia homeocar-  
pa) y manchas y ronchas en las hojas (Helminthosporium  
spp.)

La cantidad de fungicida empleado puede va-  
riar según el tipo de vegetación y el modo de aplica-  
30 ción. Por ejemplo, al pulverizar pinos desde el aire,

2  
258251



5 se utilizan corrientemente de 10 a 20 galones por acre (4 a 30 g. de fungicida por acre) de solución de pulverización de los tipos antes descritos. Para la pulverización de manzanos es corriente emplear de 500 a 800 galones de solución de pulverización por acre.

10 Este invento, por tanto, proporciona las nuevas sustancias phytoactin y phytostreptin y nuevos usos para las mismas en una gran variedad de aplicaciones. El invento resulta especialmente importante al proporcionar una solución única para el difícil problema de controlar las enfermedades de las plantas causadas por los hongos que durante años, ha destruido una gran cantidad de cultivos ornamentales, cosechas agrícolas, plantaciones y bosques, con la pérdida de recursos naturales y de grandes cantidades de dinero. Por primera vez, los silvicultivadores pueden disponer de un arma eficaz contra los destrozos de los hongos, susceptible de aplicarse desde el aire, eliminando la necesidad del tratamiento desde tierra de las zonas infectadas sobre una base únicamente parcial y que requiere una mano de obra, unos materiales y un equipo excesivos.

15

20

258251 20 MAR



N O T A

- Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente
5. indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental, siendo lo que constituye la esencia del referido invento y por lo que se solicita Patente de Invención por 20 años en España: "Procedimiento para la obtención de nuevos
10. fungicidas"; caracterizándose por lo siguiente:
- 1º.- Procedimiento para la obtención de nuevos fungicidas, caracterizado por comprender la fermentación de un medio nutritivo con una variedad de "Streptomyces Hygroscopicus", que produce fitoactina -que es un
15. polipéptido que no tiene grupo amino terminal- hasta que se produce actividad antifúngida apreciable.
- 2º.- Procedimiento para la obtención de nuevos fungicidas, caracterizado por comprender la fermentación de un medio nutritivo con una variedad de "Streptomyces
20. Hygroscopicus" que produce fitostreptina - que es un polipéptido que tiene un grupo amino libre evidente- hasta que se produce actividad antifúngida apreciable.
- 3º.- Procedimiento, según lo especificado en las reivindicaciones anteriores, caracterizado por combinarse con la fitoactina o con la fitostreptina y sus sales,
25. una pequeña cantidad de un agente de superficie activa.
- 4º.- Procedimiento para la obtención de nuevos fungicidas; tal y como queda sustancialmente descrito en

25825 20 MAY. 1960



la presente memoria que consta de treinta y nueve hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 20 de mayo de 1960.

PABST BREWING COMPANY.

J. GOMEZ ACEBO Y MODET  
P. R.