



15

308177

P A T E N T E D E I N T R O D U C C I O N

por D I E Z años

en España a favor de HOVIONE SOCIEDAD INDUSTRIAL Y
COMERCIAL DE PRODUCTOS QUIMICOS LIMITADA, entidad
portuguesa, residente en Lisboa, Travessa Do Fe--
rreiro, a Lapa nº 1 cuya patente se refiere a:
"NUEVO PROCEDIMIENTO ECONOMICO DE FERMENTACION Y -
PURIFICACION DE LAS TETRACICLINAS".

=====

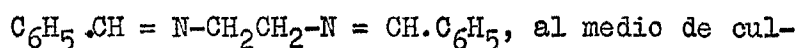
M E M O R I A D E S C R I P T I V A

El presente invento se refiere a la pre-
paración y aislamiento de varias tetraciclinas ta-
les como tetraciclina, oxitetraciclina, clorotetra-
ciclina y demetilcloretetraciclina, por medio de nue-
vos complejos dibenciletilenodiiminicos -alcalino-
terrosos de las tetraciclinas respectivas.



5.-

En el ámbito del presente invento, los nuevos complejos se forman por adición de dibencililenodiimina (denominación corriente) o más correctamente N,N'- dibencilidenoetilenodiimina, designada más adelante por " Δ -DBED" de fórmula



al medio de cultivo durante la fermentación o al caldo ya fermentado, en presencia de iones metálicos alcalino-terrosos, y precipitados tras una separación del micelio con un pH entre 8 y 9,5. De los complejos obtenidos así se libera entonces la respectiva tetraciclina ajustando el pH a su punto isoeléctrico por acidificación.

10.-

15.-

El presente invento presenta ventajas industriales importantes: procedimiento de aislamiento de pocas fases, ausencia del uso de disolventes orgánicos, uso de productos de aislamiento de bajo coste y rendimiento elevado.

20.-

Cuando se añade Δ -DBED al medio de cultivo durante la fermentación, el rendimiento de ésta, es decir la actividad antibiótica conferida al medio durante la fermentación, aumenta aproximadamente del 5 al 20 %, según las condiciones de la cepa usada, en comparación con las fermentaciones paralelas sin la adición de

25.-

Δ -DBED.

El presente procedimiento es similar en su uso y en los resultados obtenidos al "pro



cedimiento DBED" descrito en las solicitudes de patente portuguesas Núms. 37.424, 38.518 y 38.529, pero es más económico debido al precio más bajo de la Δ -DBED y a los rendimientos de aislamiento un poco más elevados.

5.- La cantidad de Δ -DBED añadida al caldo es de por lo menos medio mol por cada mol de antibiótico, para tetraciclina, oxitetraciclina y clorotetraciclina. En el caso de la demetil-tetraciclina, es preferible usar por cada mol un mol y medio de Δ -DBED.

10.- Para obtener rendimientos máximos se añaden durante la fermentación 10 a 1.000 mgs. de Δ -DBED por litro de caldo en diferentes proporciones y al caldo acidificado y filtrado se une, a pH 5, la cantidad necesaria de Δ -DBED tras de hacer previamente la proporción antes citada calculada sobre la cantidad de antibiótico formado durante la fermentación. El ámbito del presente procedimiento de invención alcanza también el aislamiento de las tetraciclinas por medio de complejos de Δ -DBED cuando se hace éste únicamente en la fase del caldo ya filtrado.

15.- En el presente procedimiento puede usarse cualquier microorganismo productor de tetraciclinas como el *Streptomyces alboflavus*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces flavus*, *Streptomy-*

20.-

25.-

308177



- 4 -

ces flaveolus, Streptomyces rimosus, Streptomyces viridifaciens, Streptomyces sayamaensis, - Streptomyces psammoticus, Streptomyces lusitanus, Streptomyces varsoviensis, incluyendo los mutantes de los mismos.

5.-

La Δ -DBED se añade al medio de cultivo a las 0, 36, 96, y 120 horas de fermentación en condiciones estériles. Se acidifica entonces el caldo fermentado hasta un pH de 0,5 a 1,8 con un

10.-

ácido como el sulfúrico, oxálico, pudiendo utilizarse no obstante otros ácidos. Se filtra entonces el caldo y se ajusta el pH a 5 con amoníaco en el caso de contener bastantes iones de metales alcalino-terrosos para formar el complejo de Δ -DBED, y en el caso contrario se ajusta el pH con un hidróxido de metal alcalino-terroso.

15.-

Después se une la cantidad de Δ -DBED necesaria hacer una cantidad total de por lo menos medio mol por mol de tetraciclina, oxitetraciclina y

20.-

clorotetraciclina presente y por lo menos un mol y medio por cada mol de demetilclortetraciclina. Tras de la agitación se continúa la adición de base hasta pH 8 - 9,5. Entonces se precipita el complejo de Δ -DBED.

25.-

El análisis de varios lotes permitió establecer que los complejos formados corresponden a las fórmulas:

308177



- 5 -

- 5.- Tetraciclina₈. Δ -DBED₃.Me₄ ; Oxitetraciclina₈. Δ -DBED₃.Me₄.16 H₂O; Clorotetraciclina₈. Δ -DBED₃.Me₆; Demetilclorotetraciclina₂. Δ -DBED₃.Me₃. en las que Me es un metal alcalino terroso. Tambien, de los complejos arriba citados, se pueden preparar o formar complejos de composición diferente de menor importancia.
- 10.- Después se filtra el complejo formado, se lava con agua y se suspende aún mojado en agua. Ajustando el pH al punto isoeléctrico de la tetraciclina respectiva, con ácido clorhídrico o sulfúrico, la base de tetraciclina correspondiente cristaliza en estado puro.
- 15.- Como los caldos utilizados contienen normalmente sales de calcio en gran cantidad y el caldo acidificado con ácido sulfúrico diluido contiene aún iones de calcio en exceso para la precipitación del complejo, la adición de un agente secuestrador, como el tetraacetato etileno-diamina, antes de la precipitación del complejo, produce rendimientos más elevados. Tambien la adición de productos antioxidantes al caldo acidificado permite obtener un producto de un grado de pureza más elevado. Como antioxidante se puede utilizar sulfoxilato de amonio formaldehído o cualquier otro agente de reducción suave.
- 20.-
- 25.-

308177



- 6. -

Las bases obtenidas son del grado de pureza exigido por las diversas farmacopeas y pueden usarse para fines medicinales o transformarse en sales de ácidos correspondientes por los métodos conocidos.

5.-

Las otras condiciones de fermentación son generalmente conocidas y los ejemplos de más adelante dan amplia ilustración para su ejecución.

10.-

Los complejos de Δ -DBED, aunque sirvan como medio de aislamiento de las respectivas tetraciclina, también pueden aplicarse directamente teniendo una actividad antibiótica in vitro e in vivo equivalente a su contenido de tetraciclina respectiva. También pueden usarse como complemento alimenticio para animales domésticos.

15.-

Los diversos complejos de Δ -DBED en estado puro tienen las siguientes características:

20.-

Δ -DBED₃.Ca₄. Tetraciclina₈: descomposición por encima de los 200° C; rotación específica: $[\alpha]_D^{25} -225$ (C, 1% en N/10 HCl). Espectro ultravioleta: λ máx. 222 ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 292); - - - - -
 λ máx 255/256 ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 403); λ máx. 355/357 ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 261).

25.-

Espectro infrarrojo teniendo las máximas siguientes en Nujol: 2,97 μ , 6,17 μ (vértice), 6,30 μ , 6,72 μ , 6,93 μ , 7,14 μ , 7,57 μ , 7,83 μ , 8,17 μ (vértice),



8,56 μ , 9,1 μ , 9,48 μ , 9,66 μ , 10,31 μ , 11,76 μ ,
12,18 μ .

Δ -DBED₃.Ca₄. Oxitettraciclina₈: descom-
posición a los 170 -172°C; rotación específica:

5.-

α /_D-180 (C,1 en N/10 HCl). Espectro ultraviole-
ta λ máx. 254 ($E_1^{1\%}$ cm 400); λ máx. 353 ($E_1^{1\%}$ cm 231).
Espectro infrarrojo teniendo las máximas siguien-
tes en Nujol: 3,01 μ , 6,12 μ , (vértice), 6,32 μ ,

10.-

6,71 μ , 6,93 μ , 7,17 μ , 7,66 μ , 7,9 μ , 8,07 μ ,
8,22 μ , 8,59 μ , 8,94 μ , 9,21 μ , 9,35 μ , 9,52 μ ,
9,72 μ , 9,92 μ , 10,35 μ , 10,67 μ , 11,66 μ ,
11,95 μ , 12,35 μ .

Δ -DBED₃.Ca₆. Clorotetraciclina₈: des-
composición iniciada a los 200°C; rotación específica

15.-

ca: α /_D-230 (C,1 en N/10 HCl). Espectro ultra-
violeta: λ máx. 232 ($E_1^{1\%}$ cm 375); λ máx. 255 ($E_1^{1\%}$ cm 376);
 λ máx. 370 ($E_1^{1\%}$ cm 178). Espectro infrarrojo tenien-
do las máximas siguientes en Nujol: 2,95 μ , - - -

20.-

6,12 μ (vértice), 6,62 μ , 6,35 μ (vértice), - - -
6,80 μ , (vértice) 6,95 μ , 7,15 μ (vértice), 7,62 μ ,
8,17 μ . (vértice), 8,30 μ , 8,60 μ , 8,92 μ , 9,57 μ ,
10,28 μ , 12,15 μ , 12,37 μ .

Δ -DBED₃.Ca₃. Demetilclorotetraciclina₂:
descomposición por encima de los 200°C; rotación

25.-

específica: α /_D-180 (C,1 en N/10 HCl). Espectro
ultravioleta: λ máx. 251 ($E_1^{1\%}$ cm 503);
 λ máx. 366/368 ($E_1^{1\%}$ cm 171). Espectro infrarrojo te-

308177



- 8 -

- 5.- niendo las máximas siguientes en Nujol: 3,0 μ ,
6,13 μ , 6,29 μ , 6,8 μ (vértice), 6,93 μ , 7,22 μ ,
7,41 μ , 7,76 μ , 8,07 μ , 8,33 μ , 8,61 μ , 8,86 μ ,
9,15 μ , 9,66 μ , 10,0 μ , 10,32 μ , 11,0 μ , 11,45 μ ,
12,19 μ , 13,32 μ .

A continuación los siguientes ejemplos para ilustración del presente invento, sin restringir no obstante su amplitud a los límites de los mismos:

10.- E J E M P L O S:

1) Todos los medios fueron preparados con agua decentada. Se inocula un fermentador de 6.000 litros útiles, conteniendo un medio con fórmula:

- | | | |
|------|--|-----------------------|
| 15.- | Agua de maceración de mijo 50% | 28 gr. |
| | Carbonato de calcio | 14 gr. |
| | Almidón | 38 gr. |
| | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 5,7 gr. |
| | NH_4Cl | 1,5 gr. |
| 20.- | $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0,05 gr. |
| | $\text{CeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,002 gr. |
| | ZnSO_4 | 0,05 gr. |
| | Harina de cacahuete | 25 gr. |
| | Aceite de manteca de cerdo | 35 gr. por li |
| | | tro de agua decentada |
| 25.- | pH 6,7 a 6,8 después de la esterilización. | |
| | con un inóculo de 150 lts. de Streptomyces viridi- | |

308177

A5



- 9 -

- faciens. Se añade al medio 1 gr./litro de Δ -DBED dividido en cuatro porciones iguales a las 0, 36, 72, y 98 horas de fermentación. La fermentación se efectúa a 28°C con una aireación de 2 l/1 por minuto. Pasadas 150 horas se obtienen 8,6 grs. por litro de tetraciclina. El medio se acidifica entonces hasta pH 1,5 con ácido sulfúrico al 25 %, filtrando con filtro rotativo y se extrae el m&celio con agua dos veces a pH 1,5. A los
- 5.- filtrados reunidos se unen entonces 18 Kgs. de "Versene" (etilenodiaminotetraacetato, agente secuestrador) y 12 Kgs. de Δ -DBED; después se aumenta el pH a 9,5 con una solución de amonio al 12%. Después de tres horas de agitación se
- 10.- filtra el precipitado que consiste esencialmente en un complejo impuro de Δ -DBED- tetraciclina cálcica, teniendo como fórmula
- 15.- Δ -DBED₃.Ca₄. Tetraciclina₉. El precipitado mojado se suspende en agua y se acidifica con ácido oxálico al 10% a pH 1,5 agitando la solución. Se filtra la solución obtenida y se ajusta el pH a 5,8 con una solución de hidróxido de sodio al 10%. Se precipita la tetraciclina base. El precipitado se filtra y se seca en vacío a 65°C.
- 20.- Rendimiento real calculado en actividad: 88%.
- 25.-

2) Se inculó un litro de medio esterilizado con la composición:

308177



- 10 -

- | | | |
|------|--|------------|
| | Agua de maceración de mijo
(corn steep liquor) 50% | 10. gr. |
| | Azúcar | 10 gr. |
| | CaCO | 1 gr. |
| | (NH ₄) ₂ HPO ₄ | 2 gr. |
| 5.- | KH ₂ PO ₄ | 2 gr. |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0,25 gr. |
| | Agua | 1000 cc. |
| | con 1 ml. de suspensión de esporas de Strepto-
myces alboflavus var.M-108-OX (CBS)e incubado a | |
| 10.- | 25°C en un agitador rotativo durante 36 horas.
Después se inoculó un fermentador piloto conte-
niendo un medio esterilizado de fórmula: | |
| | Agua decentada | 120 lts. |
| | Almidón | 6 Kgs.. |
| 15.- | Agua de maceración de mijo (50%) | 2,7 Kgs. |
| | CaCO ₃ | 0,72 Kgs. |
| | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,8 Kgs. |
| | NH ₄ Cl | 0,2 Kgs. |
| | CoCl ₂ | 0,180 Kgs. |
| 20.- | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0,6 Kgs. |
| | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 6 Kgs. |
| | FeSO ₄ | 0,180 Kgs. |
| | Aceite de tornasol | 0,2 Kgs. |
| 25.- | con el cultivo de 36 horas antes citado. Se aña-
den 400 mg/1 de Δ-DBED divididos en cuatro fra-
cciones a las 0, 36, 72, y 96 horas de fermenta-
ción. | |

308177



1965

- 11 -

Se ejecutó después la fermentación sumergida a 25°C con agitación y aireación estéril.

5.- Pasadas 150 horas, se interrumpió la fermentación, teniendo una concentración final de oxitetraciclina de 7,6 gr./litro.

10.- El caldo fermentado se acidifica con ácido sulfúrico al 25% hasta pH 1,5 y se filtra y se lava el micelio con agua. El filtrado reunido tiene un volumen de 240 litros. Se añaden entonces 2 gr/l de tetraacetato de etilenodiamina sódica (agente secuestrador). El pH se ajusta después a pH 6 con amoniaco al 12% y se añaden entonces 140 gr. de Δ -DBED y se aumenta el pH hasta pH 9,5 con amoniaco del 12%. Después de 3 horas de agitación, se filtra y se lava el precipitado formado hasta llegar al pH de las aguas de lavado a pH 7. Se suspende el precipitado mojado en agua y se acidifica con ácido oxálico al 10% a pH 1,5. Se cristaliza la base de oxitetraciclina pura. Después de la filtración y el lavado se seca el producto. Rendimiento real, 87%.

15.- 3) Se procede como el ejemplo 2) pero se inocula el medio con Streptomyces rimosus. El caldo, después de 142 horas, contiene 6,3 grs./litro. Rendimiento final 89%.

20.- 4) Se inoculan 300 lts. de un medio de

25.-

308177

- 12 -



cultivo estéril con la composición:

	Agua de maceración de mijo (50%)	28 grs.
	CaCO ₃	12 grs
	Almidón	38 gr.
5.-	NH ₄ Cl	1,5 gr.
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	0,05 gr.
	ZnCl ₂	0,02 gr.
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,005 gr.
	Harina de cacahuete	25 gr.
10.-	Aceite de manteca de cerdo	25 gr.
	Agua	1.000 cc.

pH 6,7 después de la esterilización.

con una suspensión de esporas de *Streptomyces lusitanus* 101-A (CBS) y se añade al medio 1200 -

- 15.- mgs/l de Δ -DBED divididos en cuatro fracciones a las 0, 36, 72 y 96 horas. La fermentación se efectuó a 27° C bajo agitación con una aireación estéril aumentando gradualmente de 1,5 l/l por minuto hasta 4,0 l/l por minuto. Al final de -
- 20.- 150 horas, la actividad en clorotetraciclina es de 12,4 grs. Se acidifica entonces el caldo con ácido sulfúrico al 25 % a pH 0,5 y se filtra. -
- 25.- Después se aumenta el pH hasta 5 con amoníaco al 12 % y se incorpora al filtrado más 600 grs. de Δ -DBED, 1,5 gr./l de tetraacetato de etileno-diamina y 0,3 gr./l de sulfito de sodio. Aumentando el pH hasta 8,7 se precipita el comple-



- jo de Δ -DBED. Después de una agitación de dos horas se filtra el precipitado, se lava con agua y se escurre bien. Se añade el precipitado aún mojado a 12lts. de dimetilformamida y se precipita el complejo por adición de 36 lts. de agua, ajustando el pH a 8,5. Se filtra el precipitado, se lava con agua hasta que el pH de ésta se hace neutro y se seca el producto. Se obtiene el complejo de Δ -DBED de clorotetraciclina, conteniendo de acuerdo con los análisis el 79,5 % de clorotetraciclina expresada como base anhidra, el 4,89 % de calcio, el 14,81 % de Δ -DBED, y el 1,1 % de agua. Su actividad antibiótica in vitro es de 863 mcg/mg. expresada en hidrocloreto de clorotetraciclina. Rendimiento real: 88,1%.
- 5) Se inoculan 300 litros de medio con fórmula igual a la especificada en el ejemplo 4) con una suspensión de esporas de la capa de *Streptomyces aureofaciens* productora de la demetilclorotetraciclina. Se añaden al medio 100 mg/1 de Δ -DBED y 200-200 mg./1 también de Δ -DBED después de 56 y 112 horas de fermentación. Después de 130 horas de fermentación se obtienen 2,8 gr./1 de demetilclorotetraciclina. Se añaden entonces 170 grs. de Δ -DBED al filtrado acidificado y se procede como en el ejemplo 4). El producto final tiene una composición de: -
- 5.-
- 10.-
- 15.-
- 20.-
- 25.-



52,8 % de demetilclorotetraciclina, como base anhidra, 38,4 % de Δ -DBED, 6,72 % de calcio y 2,43 % de agua, correspondiendo a la fórmula de: Demetilclorotetraciclina₂. Δ -DBED₃.Ca₃ en estado anhidro. Rendimiento 79 %.

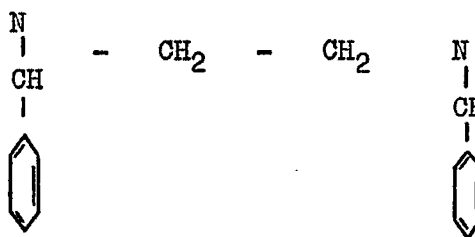
5.-

REIVINDICACIONES:

1) "Nuevo procedimiento económico de fermentación y purificación de las tetraciclinas", de rendimiento elevado, caracterizado por el hecho de fermentarse, de manera sumergida aerobia, un medio de cultivo acuoso conteniendo una fuente de carbono y sodio asimilable, sales minerales, incluyendo sales de metales alcalino-terrosos y N,N' dibencilétilenodiimina de fórmula:

10.-

15.-



20.-

por cualquier especie de Streptomyces, incluyendo sus mutantes espontáneas y artificiales, productor de un miembro del grupo de las tetraciclinas, a una temperatura comprendida entre 22 y 36° C, y de efectuar el aislamiento del agente antibiótico bajo forma de complejo molecular dibencilétilenodiiminico alcalino terroso metal. con liberación posterior eventual del -

25.-



mismo, la correspondiente tetraciclina, bajo la forma de sal ácido o de base.

- 5.- 2) "Nuevo procedimiento económico de fermentación y purificación de las tetraciclinas" según la reivindicación 1) caracterizado por el hecho de ser carbonato de calcio la sal de metal alcalino terrosa.
- 10.- 3) "Nuevo procedimiento económico de fermentación y purificación de las tetraciclinas", conforme a la reivindicación 1), caracterizado por el hecho de adicionarse la dibenciletilenodiimina al medio de cultivo en varias fracciones, antes y durante la fermentación, estando la cantidad comprendida entre 10 y 100 mg/l y también al final de la fermentación, siendo la cantidad total adicionada por lo menos medio mol de N,N'-dibenciletilenodiimina por cada mol de antibiótico del grupo de tetraciclinas formado durante la fermentación.
- 15.-
- 20.- 4) "Nuevo procedimiento económico de fermentación y purificación de las tetraciclinas", según la reivindicación 1), caracterizado por el hecho de realizarse la fermentación por cepas de *Streptomyces alboflavus*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces flavus*, *Streptomyces flaveolus*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces viridifaciens*, *Streptomyces sayamaensis*, *Streptomyces psammoti-*
- 25.-

308177

- 16 -



- cus, *Streptomyces varsoviensis*, o por sus mutaciones espontáneas o artificiales.
- 5) "Nuevo procedimiento económico de fermentación y purificación de las tetraciclinas", conforme a la reivindicación 1), caracterizado por el hecho de que del caldo fermentado, acidificado y filtrado, se precipita nuevos complejos moleculares dibencil-etilenodiiminico-alcalino terroso metálicos y ajustándose el pH entre 8 y 9,5.
- 5.-
- 10.-
- 6) "Nuevo procedimiento económico de fermentación y purificación de las tetraciclinas", según la reivindicación 1), caracterizado por el hecho de obtenerse la base libre de la tetraciclina respectiva ajustándose el pH al punto isoeléctrico, en medio acuoso, del complejo molecular de la tetraciclina en cuestión.
- 15.-
- 7) "Nuevo procedimiento económico de fermentación y purificación de las tetraciclinas", según la reivindicación 1), caracterizado por el hecho de ser obtenida la sal de las tetraciclinas correspondientes ajustándose el pH de una suspensión-solución del complejo molecular N,N' -dibencil-etilenodiiminico alcalino terroso metálico de 0,3 a 2,0 en disolvente orgánico adecuado, con metanol, isopropanol, butanol, 2-etoxietanol, acetona, dietiléter o sus mezclas.
- 20.-
- 25.-



- 5.- 8) El complejo molecular de clorotetraciclina dibenciletilenodiimínica cálcica cuando se prepara según el procedimiento de la reivindicación 1), caracterizado por el espectro ultravioleta que tiene λ máx. 232 ($E_1^{1\%}$ cm 375); λ máx. 255 ($E_1^{1\%}$ cm 376); λ máx. 370 ($E_1^{1\%}$ cm 178), y por tener el espectro infrarrojo las máximas siguientes en Nujol: 2,95 μ ; 6,12 μ (vértice), 6,26 μ , 6,35 μ (vértice), 6,80 μ (vértice), 6,95 μ , 7,15 μ (vértice), 7,62 μ , 8,17 μ (vértice), 8,30 μ , 8,60 μ , 9,92 μ , 9,57 μ , 10,28 μ , 12,15 μ , 12,37 μ .
- 10.- 9) El complejo molecular de tetraciclina dibenciletilenodiimínica cálcico cuando se prepara según el procedimiento de la reivindicación 1), caracterizado por tener el espectro ultravioleta: λ máx. 222 ($E_1^{1\%}$ cm 292); λ máx. 255/256 ($E_1^{1\%}$ cm 403); λ máx. 355/357 ($E_1^{1\%}$ cm 261); y por tener el espectro infrarrojo las máximas siguientes en Nujol: 2,97 μ , 6,17 μ (vértice), 6,30 μ , 6,72 μ , 6,93 μ , 7,14 μ , 7,87 μ , 7,83 μ , 8,17 μ (vértice), 8,56 μ , 9,1 μ , 9,48 μ , 9,66 μ , 10,31 μ , 10,55 μ , 11,76 μ , 12,18 μ .
- 15.- 10) El complejo molecular de tetraciclina dibenciletilenodiimínica cálcica cuando se prepara según el procedimiento de la reivindicación 1), caracterizado por tener el es-
- 20.-
- 25.-



5.- pectro ultravioleta: λ máx 254 ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 400); - -
 λ máx. 353 ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 231); y por tener el espectro
infrarrojo las máximas siguientes en Nujol: 3,01 μ ,
6,12 μ (vértice), 6,22 μ (vértice), 6,32 μ , - -
6,71 μ , 6,93 μ , 7,17 μ , 7,66 μ , 7,9 μ , 8,07 μ ,
8,22 μ , 8,59 μ , 8,94 μ , 9,21 μ , 9,35 μ , 9,52 μ ,
9,72 μ , 9,92 μ , 10,35 μ , 10,67 μ , 11,66 μ , -
11,95 μ , 12,35 μ .

10.- 11) El complejo molecular de demetilcloro-
rotetraciclina dibenciletilenidimidínica cálcica
cuando se prepara según el procedimiento de la
reivindicación 1), caracterizado por el hecho
de tener el espectro ultravioleta: - - - - μ -
 λ máx, 251 ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 503); λ máx. 366/368 ($E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ 171);
15.- y tener el espectro infrarrojo las máximas si-
guientes en Nujol: 3,0 μ , 6,13 μ , 6,29 μ , - -
6,8 μ (vértice), 6,93 μ , 7,22 μ , 7,41 μ , 7,76 μ ,
8,07 μ , 8,33 μ , 8,61 μ , 8,86 μ , 9,15 μ , 9,66 μ ,
10,0 μ , 10,32 μ , 11,0 μ , 11,45 μ , 12,19 μ , 13,32 μ ,

20.- 12) "NUEVO PROCEDIMIENTO ECONOMICO DE
FERMENTACION Y PURIFICACION DE LAS TETRACICLINAS".

Todo ello según se describe y reivindi-

308177



- 19 -

ca en la presente Memoria que consta de diecinueve
ve. hojas escritas a maquina por una sola de
sus caras.

Madrid, 15 de Enero de 1.965