



337453

MEMORIA DESCRIPTIVA

que se presenta para unir a la solicitud
de

PATENTE DE INVENCION

formulada el 2 de Marzo de 1.967, con el nº 337.453

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE-MER, establecimiento público francés, establecido en 24, rue Bayard, Paris, Francia, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UNA NUEVA SUSTANCIA FUNGICIDA Y BACTERICIDA"

La presente invención se refiere a la obtención de un producto bactericida y fungicida, que consta de una nueva sustancia extraída de una planta rosácea, y particularmente de sus hojas. Esta planta es conocida particularmente por la denominación:

Prunus lusitanica (Linneo)

o Cerasus lusitanica (L) (Miller)

Para los requerimientos de la invención, pueden utilizarse igualmente variedades de esta planta, que tiene la referencia que se da a continuación en el Índice Kewen



sis Plantarum Phanerogamarum: "Prunus lusitanica Gueidenst. ex Ledeb. Fl. Ross. ii, 9=P. laurocerasus lusitanica, Linn. Sp. Pl. 473 Europe austr.", Fascículo III, págs. 636, 1894. Esta planta se encuentra especialmente en Portugal.

5 La invención ha demostrado que los extractos de la planta en cuestión con disolventes inorgánicos u orgánicos presentaban una acción fungistática y bactericida. Es-
 10 tos disolventes son, por ejemplo, el agua, el tricloroeti-
 15 leno, benceno, éter de petróleo, éter etílico, cloroformo o etanol, entre otros. Por extracción con estos disol-
 20 ventes, una cierta cantidad de sustancia activa pasa en
 25 disolución de la planta a los disolventes citados, en can-
 30 tidad variable según las condiciones de extracción, y esen-
 35 cialmente según la naturaleza del disolvente.

40 Como ilustración, se han comparado de manera cuali-
 45 tativa las acciones ejercidas por diversos extractos en
 50 hongos fitopatógenos. Con este fin, se ha trabajado según
 55 un método utilizado en bacteriología para los ensayos de
 60 antagonismo. Se han humedecido respectivamente pastillas
 65 de papel con los extractos examinados, y han sido coloca-
 70 dos en cajas de Petri, sembrados en su masa con los hon-
 75 gos fitopatógenos. Entre los disolventes ensayados, son
 80 el agua y el tricloroetileno los que han proporcionado los
 85 extractos más activos. Los extractos en vapor de agua y en
 90 tricloroetileno han causado, efectivamente, las zonas de
 95 inhibición más importantes, al mismo tiempo que se obser-
 100 vó igualmente en el conjunto de la caja de Petri un efecto
 105 fungicida. Los extractos en benceno, en éter de petróleo
 110 y en éter etílico ejercen, en el orden indicado, una no-
 115 table acción de inhibición, de intensidad variable.



Según un modo ventajoso de obtención de la sustancia de la invención, se muelen las hojas secadas al aire, hasta la obtención de un polvo fino y homogéneo, se mezcla dicho polvo vegetal con agua, se agita dicha mezcla, se deja macerar durante un tiempo prolongado, después del cual se le somete a un arrastre por vapor de agua o a una destilación. Preferiblemente, la mezcla comprende aproximadamente 8 partes del polvo vegetal y 100 partes de agua. El tiempo de maceración es, ventajosamente, del orden de 48 horas.

A continuación se darán, como ilustración los datos sobre las condiciones de extracción con tricloroetileno, así como por destilación o arrastre con vapor de agua.

EJEMPLO 1- Extracción en tricloroetileno.

Previamente se lavaron con agua cuidadosamente las hojas de "Prunus lusitanicus", y después se secaron. A continuación se cortaron en fragmentos pequeños y se machacaron en tricloroetileno, hasta la obtención de una pasta muy homogénea, que se filtró a través de papel lento a un matraz evaporador, y se enjuagó con tricloroetileno hasta que el líquido fué incoloro. Después se añadió al filtrado polvo de celulosa, y el filtrado se concentró bajo vacío en un evaporador giratorio, manteniéndose el baño maría a una temperatura de 35°C aproximadamente. La evaporación se interrumpió cuando el extracto quedó seco. El polvo así obtenido fué eluido con éter de petróleo (40-65°C) sobre una columna de polvo de celulosa. La primera fracción eluida por el disolvente contenía la sustancia activa, y era de color amarillo. La elución se inte-



5 rrumpió cuando el eluido se hizo incoloro. Después de la evaporación del disolvente, esta fracción pudo ser rehecha con aceite de vaselina o con agua. Se utilizó en estas dos formas en los ensayos biológicos que se describen más adelante.

EJEMPLO 2- Obtención de la sustancia por destilación o arrastre con vapor de agua.

10 Se muelen 40 g. de hojas de Prunus lusitanica secadas al aire. El polvo obtenido se agita en un mezclador con 450 mL. de agua, durante diez minutos. La pasta obtenida se vierte en un matraz de fondo redondo para destilarla o someterla a un arrastre con vapor de agua. Se deja macerar 48 horas aproximadamente. El destilado se recoge después en un recipiente, que se mantiene frío en un baño de hielo preferiblemente.

15 Para la destilación se coloca sobre el matraz, colocado en un calentador eléctrico para matraces de fondo redondo, una columna de puntas de Vigreux, orientada ésta, con ayuda de un empalme oblicuo, sobre un refrigerante recto. Los vapores condensados pasan, al final de la destilación, por un tubo acodado que se introduce en el recipiente receptor.

20 En el caso de arrastre por vapor, se une el generador de vapor (recipiente que contiene agua puesta en ebullición) al matraz que contiene la pasta en maceración, por medio de un tubo de caucho prolongado por un tubo de vidrio acodado que se sumerge hasta el fondo de este matraz. A este mismo recipiente se une, por medio de un empalme acodado, un refrigerante recto en el que se condensan los vapores que arrastran la sustancia activa, reco-



gida preferiblemente en un recipiente refrigerado, como anteriormente.

La caracterización propiamente dicha de la sustancia activa anti-mongos y bactericida ha sido realizada por cromatografía de capa fina.

Las placas para la cromatografía han sido obtenidas a partir de una mezcla de 100 ml. de una disolución 0.02M de acetato de sodio, y 50 g. de gel de sílice, disponible en el comercio con la denominación de "Kieselgel G". Estas placas han sido activadas durante una hora a 110°C.

Para demostrar la presencia de la sustancia activa, se han utilizado extractos en tricloroetileno muy concentrados (ejemplo 1), o disoluciones acuosas obtenidas por destilación o arrastre con vapor (ejemplo 2). Se depositó una mancha de la sustancia en las proximidades del borde inferior de la placa, después se humedeció el borde inferior de la placa con el disolvente elegido para la cromatografía. La vaporización de una disolución de dicloro (R) fluoresceína al 0.2% en etanol de 95% hizo aparecer sobre la placa, después de 30 minutos aproximadamente, y en luz ultravioleta, una mancha de color marrón violáceo sobre un fondo amarillo ligeramente fluorescente.

Los Rf de la sustancia así revelada, calculados para cuatro disolventes, se indican a continuación:

	Rf
(1) Eter sulfúrico	0.96
(2) Eter sulfúrico-tricloroetileno 1/2	0.56
(3) Cloroforno-ácido acético 95/0.5	0.22
(4) Benceno-amoniaco N/10 100/10	0.22

337453



Se observará que hay identidad total entre las características de las manchas obtenidas a partir del extracto en tricloroetileno y a partir del destilado.

5 Ha de indicarse que es lo más frecuente que la sustancia activa se encuentre precedida de una mancha, amarilla a la luz visible, y amarilla fluorescente con un borde azul a la luz ultravioleta, que, después del revelado en diclorofluoresceína, se muestra de color amarillo vivo, y es entonces muy fluorescente. Los valores Rf característicos de esta última mancha son los siguientes, para los cuatro disolventes que se acaban de citar:

	Rf
(1) éter sulfúrico	0'96
(2) éter sulfúrico-tricloroetileno 1/2	0'92
15 (3) cloroformo-ácido acético 95/0'5	0'91
(4) benceno-amoniaco N/10 100/10	0'86

20 Para las aplicaciones que se explican más adelante, se han utilizado, o bien la sustancia propiamente dicha, o sus disoluciones, es decir los extractos brutos preparados por tratamiento de las hojas de Prunus lusitanica con diversos disolventes, tales como el agua y el tricloroetileno en particular, o las disoluciones acuosas obtenidas por destilación o por arrastre con vapor de agua.

25 La actividad anti-hongos de la nueva sustancia explicada por la invención ha sido estudiada del modo siguiente:

30 Se ha utilizado, o bien un medio líquido denominado de Czapek-Dox, que tiene la composición que se da a continuación:

337453



	agua destilada	1000 ml.
	nitrate de sodio	2 g.
	cloruro de potasio	0'5 g.
	fosfato monopotásico	1 g.
5	sulfato de magnesio	0'5 g.
	sulfato ferroso	0'01 g.
	glucosa	30 g.

o también un medio sólido denominado de Sabouraud. Este último medio es un medio de ensayo con maltosa. Para prepararlo, se parte de 1000 ml. de agua destilada y de 10 g. de peptona, que se hacen hervir unos minutos. Se le añaden a continuación 20 g. de agar-agar y se deja en reposo en un autoclave a 115-120°C durante 45 minutos aproximadamente. Por otro lado, se prepara una disolución de 40 g. de maltosa bruta en una pequeña cantidad de agua destilada caliente, y se añade a la disolución de agar con peptona que se saca del autoclave. Después de la agitación del medio, éste último es esterilizado a 110°C durante 20 minutos aproximadamente, después de lo cual se deja enfriar, y se obtiene el medio sólido buscado.

Si se utiliza el medio líquido de Czapek-Dox antes citado, se mezcla la sustancia activa en forma de disolución con este medio, sin añadir ninguna sustancia antibacteriana antihiótica, ya que el extracto activo de la invención posee una actividad bactericida y bacteriostática. Si se emplea el medio sólido de Sabouraud descrito anteriormente, se hace fundir previamente el agar de dicho medio a una temperatura cercana a 50°C aproximadamente, y después se añade la sustancia activa en forma de disolución. En los dos casos se colocan los tubos de en-



5 sayo, de forma conocida, en una posición oblicua, y después se siembran los medios con ayuda de los agentes fungicidas estudiados, y se comparan con cultivos testigo o de control de dichos agentes. Hay que indicar, igualmente, que se puede trabajar en cajas de Petri.

10 Una serie de ensayos llevados a cabo de la forma precedente ha demostrado que, a una dosis de sustancia activa que corresponde a 16 mg de peso de material vegetal seco de partida por mililitro de medio de reacción, la sustancia según la invención, pura o en forma de extractos, inhibía totalmente el crecimiento de hongos filamentosos, y especialmente el de los parásitos siguientes:

Hongos fitopatógenos:

- 15 -*Colletotrichum coffeanum*,
- Pestalozzia coffeicola*,
- Marasmius perniciosus*,
- Fusarium xylarioides*,
- Helminthosporium oryzae*,
- Botrytis cinerea*,
- 20 -*Phytophthora palmivora*.

25 El examen sistemático de la actividad fungicida de la sustancia activa de la invención ha sido efectuado por medio de ensayos de pulverización de disoluciones acuosas del extracto activo. Estos ensayos han permitido demostrar una actividad contra el oidio del trigo causado por el *Erysiphe graminis*, y contra la roya de la alubia, causada por el *Uromyces appendiculatus*.

30 Además, la sustancia de la invención ejerce una acción total de inhibición en la dosis de 9 mg/ml., con respecto a peso en seco de material vegetal de partida,



sobre los agentes patógenos de las micosis humanas, y especialmente sobre

Epilcoccum floccosum

Microsporium canis

5 *Triconophyton agrophytes*

Aspergillus fumigatus

Absidia corymbifera

Histoplasma capsulatum

10 Del mismo modo, a una dosis superior que corresponde a 28 mg/ml. de material vegetal seco de partida, se conserva la inhibición del desarrollo de levaduras, y especialmente de la del *Candida albicans*.

15 En los ensayos con animales vivos, la acción de la sustancia activa de la invención sobre la tiña del conejo de Indias y sobre la candidiasis del prepucio del conejo de Indias es muy rápida.

20 Por otro lado, la sustancia presenta una acción antibacteriana muy extensa. Se han efectuado ensayos, como ejemplo, con cuatro bacterias que se utilizan corrientemente para la dosificación de los antibióticos y en la investigación de sustancias activas contra las bacterias patógenas, es decir dos bacterias gram positivas y dos bacterias gram negativas.

25 Hay inhibición total del desarrollo, en medio sólido de Sabouraud y en medio líquido de Panassay, de la especie *Klebsiella*, cepa del Instituto Pasteur N° 53.153, en dosis de 23 mg/ml.; del *Bacillus subtilis*, cepa del Instituto Pasteur N° 5.262; de la *Sarcina lutea*, cepa N° 5.345 del Instituto Pasteur, y del *Escherichia coli*, cepa N° 54.127
30 del Instituto Pasteur, en dosis de 36 mg/ml de peso de ma



terial vegetal seco de partida.

La presente solicitud que corresponde a la presenta-
da en Francia, con fecha 3 de Marzo de 1.966, bajo el nú-
mero PV 51.943, se acoge a los beneficios del artículo 51
del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

Los puntos de invención propia y nueva que se pre-
sentan para que sean objeto de la presente solicitud de
Patente de Invención en España, por VEINTE años, son los
siguientes.

1.- Un procedimiento para la obtención de una nueva
sustancia fungicida y bactericida, caracterizado por so-
meter la planta rosácea "Prunus lusitánica", y en parti-
cular a sus hojas, a una extracción por disolventes orgá-
nicos o inorgánicos, pudiendo ser especialmente estos di-
solventes el agua, el tricloroetileno, el benceno, el éter
de petróleo, el éter etílico, el cloroformo o el etanol.

2.- Un procedimiento según la reivindicación 1,
caracterizado por poner en contacto íntimo con agua a no-
jas previamente secadas y molidas finamente de "Prunus
lusitánica", y someter la mezcla acuosa así obtenida a
una destilación o a un arrastre con vapor de agua.

3.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1
y 2, caracterizado por mezclar aproximadamente 8 partes
del polvo vegetal molido con 100 partes de agua.

4.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1



a 3, caracterizado por dejar macerar la mezcla durante aproximadamente 48 horas, antes de someterla al arrastre con vapor de agua o a la destilación.

5
10
5.- Un procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por poner en contacto íntimo con tricloroetileno, hojas de "Prunus lusitanica" previamente lavadas con agua y finamente molidas, filtrar la pasta de hojas así obtenida enjuagándola con tricloroetileno hasta que el filtrado se hace sensiblemente incoloro, y concentrar el filtrado bajo vacío, después de la adición de polvo de celulosa, hasta la obtención de un extracto seco.

15
6.- Un procedimiento según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por eluir el extracto seco con éter de petróleo sobre una columna de polvo de celulosa, conteniendo la primera fracción eluída la sustancia activa buscada, después de lo cual, llegado el caso, se forma de nuevo la fracción citada con agua o un aceite.

20
7.- Un procedimiento para la obtención de una nueva sustancia fungicida y bactericida.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines especificados.

Esta Memoria consta de once hojas, escritas a máquina por una sola de sus caras.

11 ABR 1967

Madrid,

P. A.

Alberto de Ezabuz
[Handwritten signature]

337453