

P-36.357
S 5341-Z 2154 227/6/Km.

345346

Memoria descriptiva

12 DIC. 1967



para solicitar PATENTE DE INVENCION

por 20 años

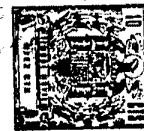
a nombre de CESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE VED

entidad / de nacionalidad checoeslovaca

con domicilio en Národní tr. 3, Praga, Checoeslovaquia

por: "UN METODO DE AISLAR UN NUEVO ANTIBIOTICO FUNGICIDA"
(Clase Internacional C12d)

5 JUN



5

El presente invento concierne a un método de aislar un nuevo antibiótico fungicida a partir de un medio de fermentación, o posiblemente también a partir de un micelio filtrado del basidiomiceto *Oudemansiella mucida* (Sohrad ex Fr. Höhn), producido por el método de la Patente checoslovaca (P V 7592-65). El antibiótico fungicida conocido no ha sido todavía aislado en forma pura.

10

El método de aislar un nuevo antibiótico fungicida de acuerdo con el presente invento está caracterizado porque el medio de fermentación, o micelio, es extraído con un disolvente orgánico, tal como un alcohol alifático con 1 a 5 átomos de carbono, un éster de ácido acético con este alcohol, hidrocarburos alifáticos o cicloalifáticos con 6 a 10 átomos de carbono, hidrocarburos alifáticos clorados con 1 a 2 átomos de carbono, hidrocarburos aromáticos con 6 a 7 átomos de carbono, o cetonas alifáticas con 3 a 7 átomos de carbono, o posiblemente un compuesto de los disolventes indicados, después de lo cual se destila el extracto crudo, preferiblemente en vacío, y se purifica de los residuos de disolvente, y el antibiótico puro es producido entonces a partir del concentrado por medio de cromatografía sobre Al_2O_3 o gel de sílice.

15

20

25

Otra característica de este método es que el antibiótico puro se produce a partir del concentrado por medio de una re-destilación o destilación repetida.

30

Una característica adicional de este método es que el antibiótico puro se obtiene a partir de un concentrado aplicando la combinación de una re-destila-

345346

- 2 -

21.5.68



ción y una separación por cromatografía. El aislamiento del nuevo antibiótico fungicida a partir de un medio de crecimiento por fermentación, en el que está contenido parcialmente (aproximadamente en 1/5) en una solución y en el que, sin embargo, está unido en su mayor parte al micelio, se realiza en principio de acuerdo con el presente invento preparando primero un concentrado que se obtiene a partir del filtrado, que resulta después de la filtración del micelio, por una extracción múltiple en un extractor en contracorriente, utilizando un disolvente inmiscible con agua apropiado, sin ningún ajuste previo del pH. Como disolventes se pueden aplicar, por ejemplo, acetato de butilo, cloroformo, butanol, etc. La sustancia activa se puede obtener mejor a partir del micelio filtrado, que ha sido secado por medio de los métodos comunmente conocidos de extracciones repetidas con un disolvente orgánico, para cuyo fin se pueden aplicar ésteres, éteres, hidrocarburos clorados, alcoholes inferiores, o posiblemente hidrocarburos aromáticos. La extracción se puede llevar a cabo mezclando simplemente y filtrando con succión, o mejor a una temperatura más alta en un extractor apropiado. La extracción con disolventes miscibles con agua se puede realizar también a partir del micelio húmedo. La extracción con disolventes inmiscibles con agua a una temperatura más alta puede ser combinada ventajosamente con una previa deshidratación del micelio húmedo con destilación azeotrópica. Si el extracto obtenido en uno de los procedimientos antes descritos es evaporado a vacío se obtiene un producto oleoso coloreado de pardo usualmente, que



contiene aproximadamente 15 a 20% de la sustancia activa.

5 Se han desarrollado varios métodos para producir sustancias puras apropiadas para utilización ulterior (también se puede utilizar ya el concentrado). El concentrado obtenido por medio de la extracción puede ser purificado de una cierta parte de los componentes inertes, por ejemplo disolviendo en cloroformo y diluyendo la solución con éter de petróleo. Mediante un procedimiento de sedimentación, se separa un aceite oscuro y viscoso que entonces, después de una sedimentación adicional, solidificada después de la separación. Toda la sustancia activa permanece en solución. De manera similar, la purificación parcial de los extractos crudos puede efectuarse agitando en aproximadamente 15% en volumen de agua mientras que la suspensión obtenida después de 15 18 horas de sedimentar resulta casi completamente solidificada a la temperatura normal. Filtrando con succión la sustancia inactiva separada, se produce un concentrado ya considerablemente puro, usualmente sólo ligeramente coloreado de amarillento.

20 Se puede producir una sustancia activa prácticamente pura directamente a partir del concentrado crudo por la aplicación de cromatografía sobre óxido de aluminio, o gel de sílice, u otros adsorbentes. El cromatograma es revelado utilizando un disolvente apropiado, tal como éter de petróleo, benceno, éter, cloroformo, o posiblemente compuestos de estos disolventes. El procedimiento de cromatografía puede ser vigilado simplemente observando la columna o los eluatos a la luz ultravioleta. -



Los compuestos activos manifiestan, a diferencia de -
 los compuestos inactivos que lo acompañan, una fluorescencia oscura específica (extinción). Una comprobación de la cromatografía puede realizarse fácilmente mediante una cromatografía en capas delgadas con una detección en la luz ultravioleta, mediante nitrato de plata amoniacal que proporciona una zona reductora oscura. -
 La purificación por cromatografía puede ser repetida -
 posiblemente. Si la cromatografía se realiza correctamente y la sustancia activa es separada de los componentes inertes, la respectiva fracción puede ser transformada en el antibiótico cristalino, después de una evaporación cuidadosa del disolvente.

Finalmente, se ha encontrado que, en un vacío suficiente, el concentrado crudo puede ser destilado -
 sin perder su actividad biológica. A una presión de --
 0,01 a 0,005 mm de Hg puede destilarse aproximadamente el 75% del concentrado crudo. Después de una posible -
 re-destilación, el destilado obtenido puede ser cristalizado directamente inoculándolo con un antibiótico puro.

Seguidamente se indican las constantes del antibiótico puro. El antibiótico puro es una sustancia --
 cristalina blanca de carácter neutro, que tiene un punto de fusión de 51 a 53°C, soluble en la mayor parte de los disolventes orgánicos, ligeramente soluble en agua. La actividad óptica, medida en benceno, es de + 33° --
 (c=10) a 546 mu. Cuando es expuesto a la luz ultravioleta o de infrarrojos, despliega un espectro característico. En los dibujos anejos, la Fig. 1 muestra el espectro



de infrarrojos del antibiótico puro en MeOH(alcohol metilico). La figura 2 muestra el espectro de ultravioleta del antibiótico puro en KBr. La fig. 3 muestra un cromatograma del extracto concentrado o espesado crudo del -
 5 nicelio filtrado sobre una capa delgada de Al₂O₃ en el sistema de éter de petróleo-éter-ácido acético que tiene unas proporciones de 90 : 10 . l. En la fig. 3a, los números indican: 1=iniciación, 2=parte frontal, 3= sustancia activa. En la fig. 3b los números indican: 1=ini-
 10 ciación, 2=parte frontal, 3=zona de inhibición en la autobiografía de Sacharomyces cerevisias. La sustancia - contiene carbono, hidrógeno y oxígeno. El peso molecular, tal como se muestra por espectografía de masas, es de 258. El resultado del análisis elemental, que es de
 15 73,92% de C, 7,26% de H y 18,82% de O, corresponde lo más apropiadamente a la composición C₁₆H₁₈O₃.

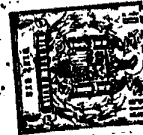
El antibiótico es considerablemente estable, puede ser destilado en alto vacío y su actividad no va-
 20 ría incluso por un almacenamiento de larga duración a la temperatura de 4 a 30°C.

El antibiótico es activo contra un cierto número de hongos, incluyendo dermatofitos, fitomicetos, fungi imperfectio, hongos imperfectos y ascomicetos, pero es completamente inactivo contra las bacterias.

25 La concentración de inhibición mínima del antibiótico es un ensayo realizado por la técnica de difusión en agar ug/ml

Microorganismos	
Candida albicans	10
Candida tropicalis	10
30 Candida pseudotropicalis	10

345346



	<i>Candida parapsilopsis</i>	10
	<i>Candida zeilano</i>	10
	<i>Candida guillermondi</i>	10
	<i>Candida cruasei</i>	10
5	<i>Aspergillus niger</i>	10
	<i>Aspergillus cryzas</i>	10
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	10
	<i>Penicillium sp.</i>	100
	<i>Mucor sp.</i>	100
10	<i>Saccharomyces cerevisias</i>	1
	<i>Geotrichum ap.</i>	0
	<i>Trichophyton rubrum</i>	300
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	100
	<i>Trichophyton astero</i>	10
15	<i>Trichophyton rosaceum</i>	100
	<i>Microsporum canis</i>	300
	<i>Sporotrichum schenckii</i>	200
	<i>Coccidioides immitis</i>	100
	<i>Blastomyces dermatitis</i>	100
20	<i>Torula utilia</i>	100

25 La realización del ensayo: Discos de papel de filtro de un diámetro de 6 mm fueron impregnados con el antibiótico, fueron diluidos en una mezcla de alcohol etílico y éter (1:1) y, después de haberse evaporado el disolvente, fueron colocados sobre la superficie de un medio nutriente de agar, y fueron inoculados con el respectivo microorganismo de ensayo. Después de la incubación a una temperatura apropiada, se determinó o averiguó el aspecto de las zonas de inhibición.

- 7 - 345346



La toxicidad de una aplicación intraperitoneal de una suspensión al 1% en agua, para ratones, es de 250 mg/Kg de peso corporal, con una aplicación oral de 500 mg/Kg.

5 En una aplicación intramuscular o externa a conejos, no se ha encontrado una absorción del antibiótico en la circulación sanguínea. Sangre tomada en las horas 2ª y 5ª después de la aplicación del antibiótico, por medio de punción cardíaca, no ha mostrado ni siquiera un vestigio de la actividad antibiótica en el suero. 10 El ensayo se llevó a cabo mediante la técnica de difusión en agar con el microbio de ensayo *Sacharomyces cerevisiae* Sc-2/V. Con una aplicación en la piel y en el saco conjuntivo de conejos, el antibiótico probó no ser 15 irritante.

Por sus propiedades, el antibiótico está destinado para una aplicación externa, preferiblemente en forma de ungüentos y pulverizaciones.

20 El invento puede ser aplicado en la práctica de acuerdo con los siguientes ejemplos, sin estar limitado exclusivamente a estos ejemplos. Los Ejemplos 1 a 5 conciernen a la preparación del concentrado, los Ejemplos 6 a 8 a la producción del producto puro.

25 Ejemplo 1. - 2.400 litros de medio filtrado - fueron extraídos sin ajuste del pH con acetato de butilo en un extractor en contracorriente en la proporción de 1:5 y el extracto transcarante obtenido fué concentrado en un evaporador de película a una temperatura máxima de 60°C hasta un volumen de aproximadamente 40 l. Se realizó el tratamiento ulterior evaporando los residuos -- 30



del disolvente en un evaporador rotatorio de vacío: Este procedimiento produjo un total de 670 g de concentrado oleoso crudo del antibiótico.

5 Ejemplo 2.- Filtrando 2.400 l de medio de fermentación en un filtro rotatorio se obtuvo un total de 121 Kg de micelio húmedo, que fue secado en un secador de vacío a una temperatura máxima de 55°C. Este procedimiento produjo 23,5 Kg de micelio seco. Este fue después desmenuzado finamente y extraído mezclándolo 5 veces -

10 con 35 litros de cloroformo en el curso de 1 hora, y es seguido por filtración. Los extractos con cloroformo - reunidos fueron evaporados en un evaporador de vidrio - con circulación a una temperatura máxima de 30°C y los residuos del disolvente fueron evaporados en un evapora-

15 dor rotatorio de vidrio. El rendimiento fue de 2.139 g de concentrado oleoso crudo de la sustancia activa como antibiótico.

Ejemplo 3.- 10 Kg de micelio húmedo fueron impregnados con tricloroetileno y, agitando, se eliminó -

20 el agua por destilación azeotrópica con un reflujo o devolución constante de la parte orgánica del destilado. - Después de secar, se realizó una extracción repetida del micelio deshidratado con tricloroetileno, similarmente -

25 al ejemplo 2 anterior. Mediante un procedimiento de concentración en vacío en un evaporador rotatorio con circulación se obtuvieron 1.072 g de concentrado oleoso crudo.

Ejemplo 4.- 8,5 Kg de micelio secado por medio de liofilización fueron extraídos con éter en el aparato de Soxhlet (cambiándose el disolvente aproximadamente 6

30 a 7 veces en la parte de extracción del aparato) y des--



pués de la destilación de éter, se obtuvo un rendimiento de 1.050 g de concentrado oleoso crudo.

5 Ejemplo 5.- 11,2 Kg de micelio húmedo obtenido filtrando el medio de fermentación, fueron suspendidos en 25 litros de metanol, se calentaron hasta 40°C - con agitación y después se filtraron con succión. El micelio filtrado con succión fue suspendido de nuevo adicionalmente en otros 25 litros de metanol, fue calentado, filtrado, y se repitió después 2 veces el procedimiento. Los filtrados metanólicos reunidos fueron concentrados en un evaporador de vacío con circulación y los residuos, que se separaron en dos capas, fueron extraídos 2 veces con 20 litros de éter de petróleo. Separando la capa de éter de petróleo y destilando el disolvente, se obtuvo un rendimiento de 1.135 g de concentrado oleoso del antibiótico.

10

15

 Ejemplo 6.- 160 g de concentrado oleoso en - 500 ml de éter de petróleo fueron colocados en una columna de 1,7 Kg de óxido de aluminio (akt-II), impregnados con éter de petróleo. Después de la impregnación en la columna se introdujeron 3.000 ml de éter de petróleo. Mediante este procedimiento, se alcanzó una separación suficiente de la sustancia activa como antibiótico a - partir del metabolito original, una parte del cual ya - había pasado al eluato (la sustancia despliega una fluorescencia azul y violeta). La detección de las zonas individuales se efectuó en la luz ultravioleta. La sustancia activa formó una capa de 30 cm de altura en el centro de la columna. El absorbente había sido separado a - presión de la columna y esta capa fue separada mecánica-

20

25

30



mente y eluída después de un secado previo con 3 l de -
cloroformo. Una concentración del extracto produjo final-
mente 32,5 g de aceite amarillo claro, muy viscoso en -
frío, que tenía una actividad de 4.325.000 unidades/g.

5 Mediante una cromatografía de comprobación en
una capa delgada en gel de sílice en el sistema de éter
de petróleo-éter-ácido acético de proporción 90:10:1, -
se encontró la presencia de cantidades muy pequeñas de
materiales acompañantes en el antibiótico obtenido. Por
10 una inoculación con un cristal del antibiótico puro, el
aceite obtenido en el procedimiento anterior se separó
por cristalización después de 3 días. Entonces fue im-
pregnado con éter de petróleo enfriado, se filtró con -
succión y se lavó a través de éter de petróleo enfriado
15 y se secó en vacío, el cual procedimiento produjo el -
antibiótico cristalino blanco con un punto de fusión de
49 a 51°C.

 Ejemplo 7.- Se logró el mismo resultado que -
en el Ejemplo 6, utilizando gel de sílice como absorben-
20 te y revelando un compuesto de éter de petróleo y éter -
en una proporción de 9:1, siendo de 20:1 la proporción -
del absorbente al antibiótico.

 Ejemplo 8.- 500 g de concentrado oleoso produ-
cido por una extracción fueron destilados en un matraz -
25 de Hickmann a una presión de 0,01 mm de Hg calentado en
un baño de metal de Wood. En el margen de temperaturas -
de 70 a 187°C, se efectuó la destilación de un total de
231 g de aceite amarillo claro. Los máximos de la sustan-
cia activa como antibiótico se encontraban en las fraccio-
30 nes de 120 a 140°C. Se hubo de interrumpir la destilación



adicional en vista de la descomposición progresivamente
creciente de los residuos en el matraz de destilación. -
La fracción obtenida de la sustancia activa contenía to-
davía, de acuerdo con la comprobación efectuada por cro-
matografía, tal como se indica en el Ejemplo 6, una me-
5 nor cantidad de sustancias contaminantes. Por una desti-
lación repetida en alto vacío y recogiendo las fraccio-
nes de 128° hasta 132°C, se obtuvo un destilado puro de
color amarillo claro de la sustancia antibiótica prácti-
camente pura, que contenía sólo vestigios de sustancias
10 con fluorescencia azul. El rendimiento era de 54 g.

La presente solicitud que corresponde a la -
presentada en Checoslovaquia con fecha 18 de Enero de -
1.967 bajo el nº PV 437-67, se acoge a los beneficios -
15 del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad In-
dustrial.

20 - N O T A -

25 Los puntos de invención, propia y nueva, que
se presentan para que sean objeto de esta solicitud de
Patente de Invención en España por VEINTE años, son los
siguientes:

30 1.- Un método de aislar un nuevo antibiótico -



5 fungicida a partir de un medio de fermentación, o posiblemente también a partir de un micelio filtrado, caracterizado porque el medio de fermentación, o el micelio, es extraído con un disolvente orgánico, tal como un alcohol alifático con 1 a 5 átomos de carbono, un éster de ácido acético con este alcohol, hidrocarburos alifáticos o cicloalifáticos con 6 a 10 átomos de carbono, -
10 hidrocarburos alifáticos clorados con 1 a 2 átomos de carbono, hidrocarburos aromáticos con 1 a 2 átomos de carbono, o cetonas alifáticas con 3 a 7 átomos de carbono, o posiblemente un compuesto de los disolventes indicados, después de lo cual el extracto crudo es destilado, preferiblemente en vacío, y es purificado de los residuos del disolvente, y entonces se obtiene el antibiótico puro a partir del concentrado por medio de cromatografía sobre Al_2O_3 o gel de sílice.

15 2.- Un método de aislar de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el antibiótico puro es obtenido a partir del concentrado por re-destilación.

20 3.- Un método de aislar de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque el antibiótico puro es obtenido a partir del concentrado por una combinación de re-destilación y de separación por medio de cromatografía.

25 4.- Un método de aislar un nuevo antibiótico fungicida.

Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede, representado en los dibujos que se acompañan y para los fines que se han especificado.

30 La presente Memoria consta de catorce hojas -



escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid, 7 2 DIC. 1967

P.A.

Alberto de Elorza

6-12-67/RTA.-

- 14 -

345346

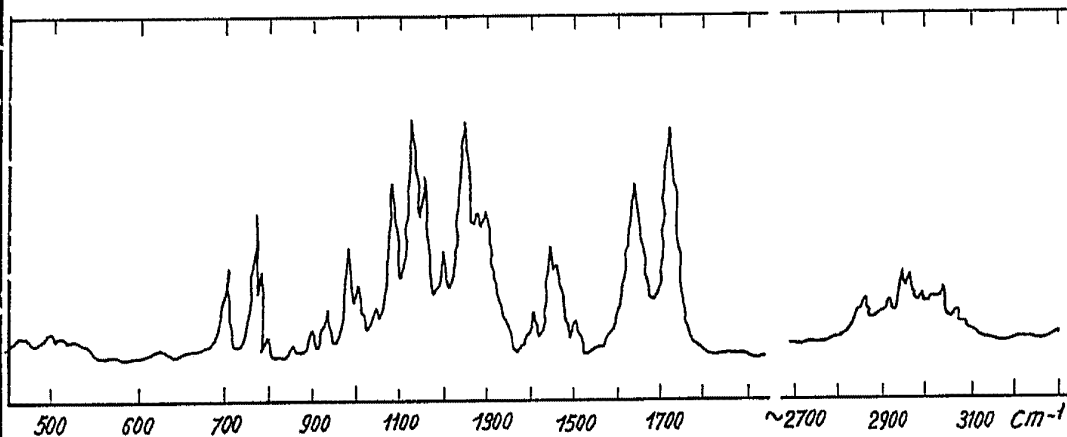


FIG. 1

345346

[Handwritten signature]

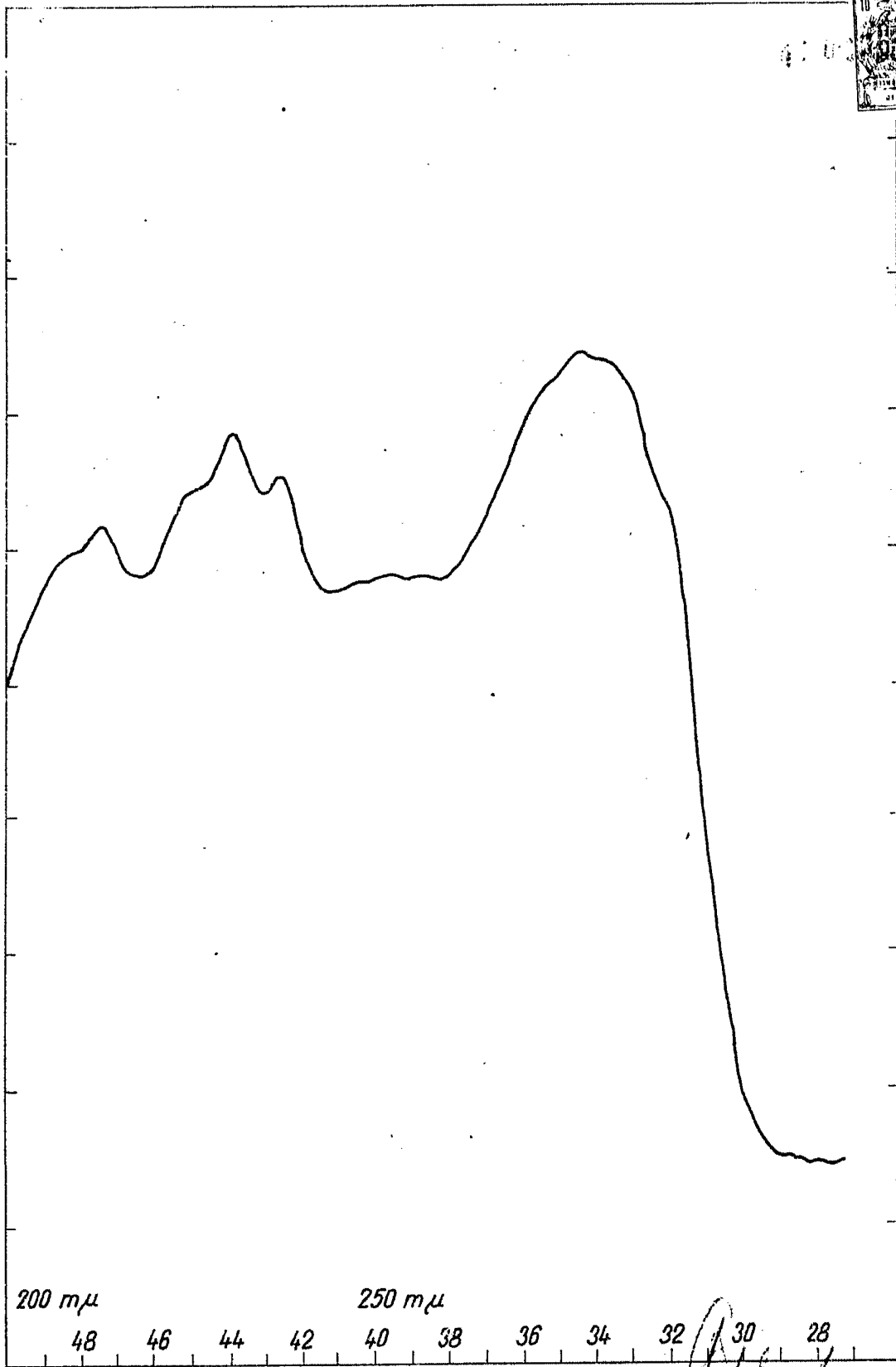


FIG. 2

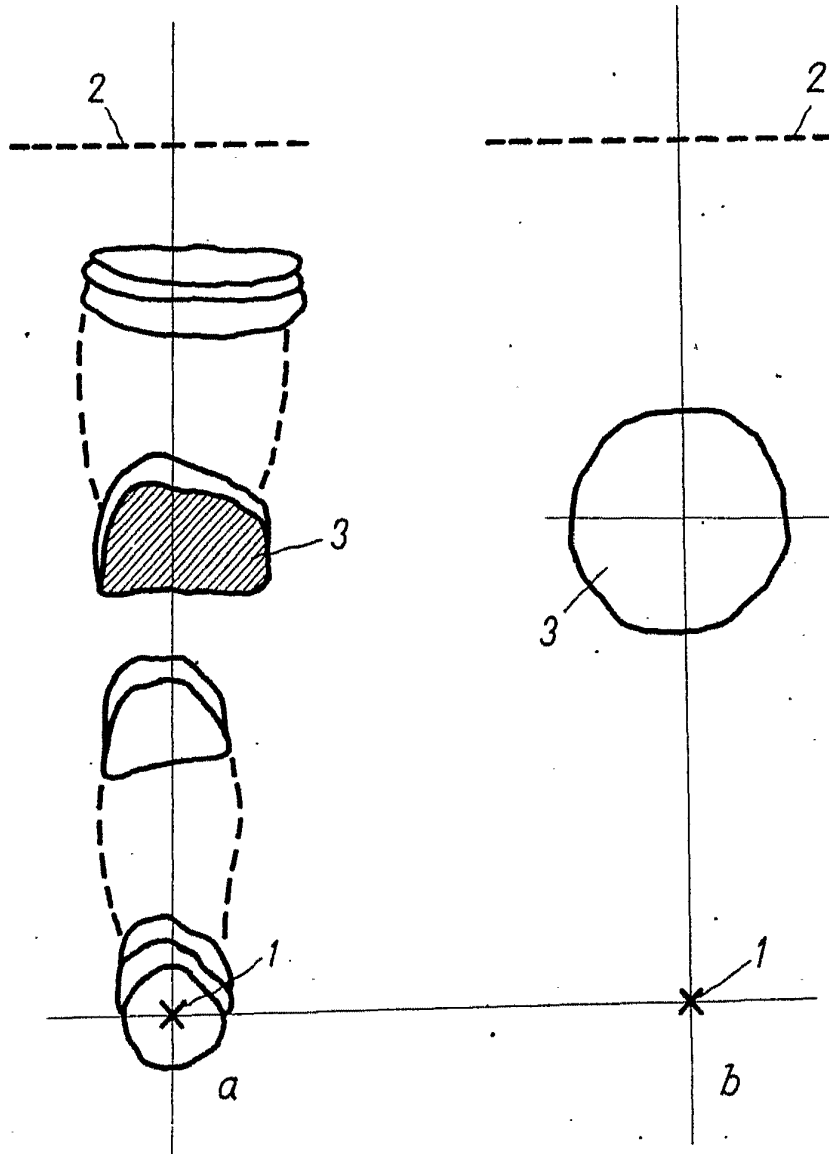


FIG. 3

Handwritten signature or initials in the bottom right corner.