

415591



415591

F.C. 16-XII-75

memoria descriptiva

Int. Cl. ² C12D

CLASE DE REGISTRO	Una Patente de Invención, por veinte años en España.
NOMBRE Y NACIONALIDAD DEL SOLICITANTE	SANKYO COMPANY LIMITED. - sociedad japonesa -
RESIDENCIA Y DOMICILIO	TOKYO, (Japón) 1-6, 3-Chome, Nihonbashi-Hon-cho, Chuo-ku.
<input type="checkbox"/> OBJETO	"Procedimiento para la obtención de sustancias antibióticas B-41-A, B-41-A ₂ , B-41-A ₃ , B-41-A ₄ , B-41-B ₁ , B-41-B ₂ , B-41-C ₁ y B-41-C ₂ ".
INVENTORES	Atsushi AOKI, Rikiya FUKUDA, Toshio NAKAYABU, Keijiro ISHIBASHI y Chiyoko TAKEICHI, Mitsuo ISHIDA, japoneses.
PRIORIDAD	Solicitud patente japonesa No. 57058/1972 del 8 de junio de 1972.

415591



- 1.-

1

El presente invento se refiere al procedimiento de obtención de nuevas sustancias antibióticas B-41 cultivando, en un medio, una cepa productora de B-41, perteneciente al género *Streptomyces* y después recuperando el B-41 resultante desde la sustancia cultivada y concierne a una composición insecticida y acaricida conteniendo nuevas sustancias antibióticas B-41 como un ingrediente activo.

5

10

Hasta ahora se han usado muchos compuestos orgánicos como preparaciones insecticidas y acaricidas. Entre las sustancias antibióticas, sin embargo, sólo pocas sustancias han sido conocidas que tengan efectos insecticidas y acaricidas. Además, todavía no se han puesto en uso práctico.

15

20

Como resultado de extensos estudios, se ha encontrado que una nueva sustancia antibiótica B-41, que es producida por una cepa de B-41 - 146, una nueva cepa perteneciente al género de *Streptomyces*, no sólo tiene una actividad acaricida, mucho más elevada, que los compuestos orgánicos, que tienen actividades acaricidas, sino que también es eficaz para el control de insectos nocivos para la agricultura y la horticultura, tales como pulgones, larvas de insectos del orden de lepidópteros, etc.

25

La sustancia antibiótica B-41 que es el ingrediente activo de la composición insecticida y acaricida, según el presente invento, pudo ser separada en nueve clases de sustancias; A₁, A₂, A₃, A₄, B₁, B₂, B₃, C₁, y C₂.

30

Las propiedades físico-químicas de estas sustancias, son como se ilustra en la tabla siguientes.

415591



- 5.-

1 Los dibujos anexos muestran espectros de absorción
ultravioleta, absorción infrarroja y de resonancia magnéti-
ca nuclear de la sustancia antibiótica B-41, en que las fi-
5 guras 1 a 9 muestran respectivamente los espectros de absor-
ción ultravioleta de A₁, A₂, A₃, A₄, B₁, B₂, B₃, C₁, y C₂ de
de la sustancia antibiótica B-41; las figuras 10 a 18 mues-
tran respectivamente los espectros infrarrojos de absorción
de A₁, A₂, A₃, A₄, B₁, B₂, B₃, C₁ y C₂ de la sustancia an-
10 tibiótica B-41; y las figuras 19 a 27 muestran respectiva-
mente espectros de resonancia magnética nuclear de A₁, A₂,
A₃, A₄, B₁, B₂, B₃, C₁ y C₂ de la sustancia antibiótica
B-41.

Además, en la tabla expuesta más abajo, se indican
15 los valores R_f de las arriba mencionadas sustancias, según
se midieron de acuerdo con cromatografía de capa delgada _
usando una película de mancha cromatográfica de capa delga-
da conteniendo un reactivo de fluorescencia (disponible de
Tokyo Kasei Kogyo Co Ltd: Marca "SPOTFILM-fluorescent").
20 La detección fué hecha de acuerdo con la intensidad de la
fluorescencia emitida cuando cada sustancia fué irradiada
con rayos ultravioleta de 2536 Å.

25

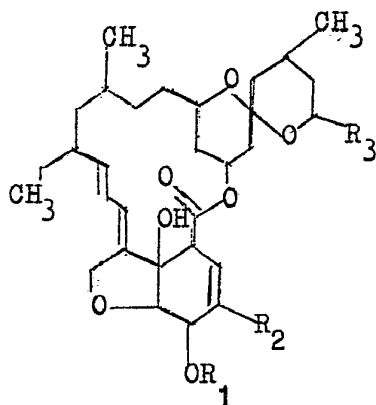
30

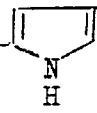
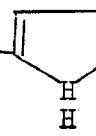
415591

-6 JUN 1971

- 7.-

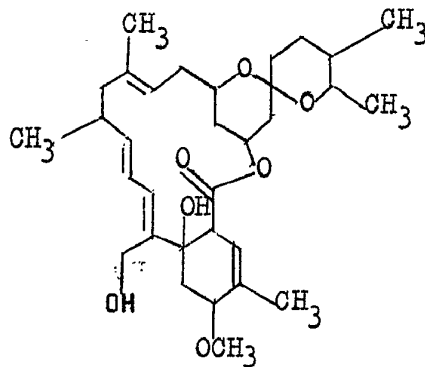
De las arriba mencionadas propiedades fisico-químicas, particularmente los elevados espectros de resolución de masa, y de los resultados de análisis de rayos X se ha explicado que A₃, A₄, B₂, B₃, C₁ y C₂ de B-41 tienen la siguiente forma estructural plana.



	<u>R₁</u>	<u>R₂</u>	<u>R₃</u>
A ₃	H	CH ₃	CH ₃
A ₄	H	CH ₃	C ₂ H ₅
B ₂	CH ₃	CH ₃	CH ₃
B ₃	CH ₃	CH ₃	C ₂ H ₅
C ₁	H	-CH ₂ OOC- 	CH ₃
C ₂	H	-CH ₂ OOC- 	C ₂ H ₅

Análogamente se ha explicado que A₁ del producto B-41 tiene la siguiente fórmula estructural plana

30



10 Las estructuras de A₂ y B₁ de B-41, no están claras. De la fragmentación de los espectros de masa, sin embargo, se infiere que son similares en estructura química a las

15 arriba mencionadas sustancias A₁, A₃, A₄, B₂, B₃, C₁ y C₂. Como no existen sustancias antibióticas conocidas, que tengan las arriba citadas estructuras químicas y propiedades físico-químicas, se ha llegado a la conclusión de que el B-41 del presente invento es una nueva sustancia antibiótica.

20 La cepa B-41-146 del género Streptomyces, que produce la sustancia antibiótica B-41, tiene las propiedades micológicas mencionadas abajo.

20 1) Características morfológicas:

Sobre la mayoría de los medios de laboratorio se desarrollaron largos micelios aéreos desde un fino micelio ramificado de substrato y se formaron espiras con espirales o lazos.

25 No se observaron fragmentaciones del micelio en fase temprana.

Esporas verrugosas más o menos cortas, 0.6-0.9 x 1.1-1.5/μ formadas en cadenas con 10 - 50 conidias.

30

415591



-:9.-

1

Extrusiones verrugosas relativamente cortas, en las superficies de las esporas.

No se observaron esporangios/^yesclerotias.

5

2) Características de cultivo en varios medios:

i) Agar de sucrosa-nitrato:

Buen crecimiento, substrato de micelio incoloro; reverse castaño pálido; micelio aéreo escaso, semi-transparente, coriáceo; pigmento soluble castaño pálido.

10

ii) Agar de glucosa asparagina:

Crecimiento abundante; substrato de micelio incoloro; reverse castaño pálido; micelio aéreo abundante, color gris; pigmento soluble, castaño pálido.

15

iii) Agar de glicerol-asparagina:

Crecimiento abundante; substrato de micelio incoloro; reverse, castaño pálido; micelio aéreo blanco, y en declive, se formaron muchos puntos de color castaño grisáceo claro en fondo blanco; pigmento soluble, gris amarillento.

20

iv) Agar de sales inorgánicas-almidón:

Crecimiento abundante, substrato de micelio incoloro; reverse, gris amarillento; micelio aéreo gris y en declive, se formaron muchos puntos amarillentos pálidos en fondo gris; pigmento soluble, gris oliva claro.

25

v) Agar de tirosina:

30

- 1 Abundante crecimiento: substrato de micelio,
castaño amarillo grisáceo; reverso castaño;
micelio aéreo gris, y en declive se formaron
puntos grises amarillentos algunas veces en _
5 fondo gris; pigmento soluble castaño claro.
- vi) Agar nutritivo:
Crecimiento pobre; substrato de micelio inco-
loro; reverso castaño pálido; micelio aéreo
escaso, blanco; no se produjo pigmento soluble.
- 10 vii) Agar de extracto de levadura-extracto de malta:
Crecimiento abundante; substrato de micelio,
castaño amarillo grisáceo; reverso castaño _
amarillento; micelio aéreo abundante, gris y
15 en declive, se formaron muchos puntos amari-
llos pálidos en fondo gris; pigmento soluble
amarillo.
- viii) Agar de harina de avena:
Crecimiento abundante; substrato de micelio
20 incoloro; reverso gris oliva; micelio aéreo
gris y en declive, se formaron puntos amari-
llos pálidos; pigmento soluble, oliva pálido.
- 3) Características fisiológicas:
- i) Alcance de temperatura de crecimiento:
25 18° - 37° C.
Temperatura óptima de crecimiento: 25° - 30° C.
- ii) Liquefacción de gelatina: lenta pero fuertemen-
te positiva.
- 30 iii) Hidrólisis de almidón: fuertemente positiva.

415591



- 11.-

1
5
10
15
20
25
30

- iv) Coagulación de leche desnatada: positiva _
(28° C). Peptonización de leche desnatada:
positiva /28° C).
- v) Formación de melamina: negativa.
- vi) Reducción de nitrato: positiva.
- vii) Utilización de varias fuentes de carbono (Agar
de Pridham y Gottlieb)
Grado de utilización
+ + + Rafinosa
+ + D-glucosa, D-fructosa, sucrosa, L-
ramnosa, I-inositol, D-manitol.
+ L-Arabinosa. D-xylosa.

Por las arriba citadas características esta cepa
está muy próximamente relacionada con *Streptomyces chatta*
noogenesis (International Journal of Systematic Bacteriology,
Vol. 18, Nº 2, página 97 (1968), pero difiere de la cepa _
B-41-146 como sigue:

- (1) La cepa B-41-146 formó abundantemente espiras,
mientras que *S. chattanoogenesis* se ramificó monopodialmente.
- (2) La superficie de esporas de la cepa B-41-146
es verrugosa mientras que la de *S. chattanoogenesis* es espino
sa.
- (3) En agar de levadura-extracto de malta y agar
de sal inorgánica-almidón, la cepa B-41-146 formó puntos _
amarillos pálidos en fondo gris, pero *S. chattanoogenesis* no
los formó.
- (4) La cepa B-41-146 asimila L-arabinosa, D-xilosa
e I-inositol, mientras que *S. chattanoogenesis* no asimila es-

415591

-6



- 12.-

1

tas fuentes de carbono.

5

En vista de las cuatro diferencias arriba mencionadas, en las propiedades micológicas, se juzgó que la cepa B-41-146 ha sido nueva especie del género *Streptomyces*. La cepa B-41-146 ha sido depositada en el Instituto de Investigación de Tecnología Industrial de microorganismos, agencia de ciencia y tecnología industrial en Japón, con el número de presentación Bikokenkinki No. 1.438.

10

15

Como es bien conocido, los actinomicetos tienden a causar mutación en el mundo natural y por aplicación de operaciones artificiales, tales como por ejemplo irradiación ultravioleta, irradiación de radiación, tratamiento químico, etc. El mismo es el caso con la cepa B-41-146 del presente invento. La cepa B-41-146, a la que se hace referencia en el presente invento, incluye todos estos mutantes. Es decir, en el presente invento todas las cepas, que producen la sustancia antibiótica B-41 y que no son claramente distinguibles de la cepa B-41-146 y mutantes de la misma, se incluyen en la cepa B-41-146.

20

25

En el procedimiento del presente invento, la sustancia antibiótica B-41 es obtenida cultivando la cepa B-41-146 en un medio apropiado y después recuperando la sustancia resultante desde el medio. La cepa puede ser cultivada de acuerdo con el cultivo estacionario pero en el caso de que se desee producir la sustancia antibiótica en grandes cantidades, se prefiere mejor cultivar la cepa de acuerdo con el cultivo líquido con aireación y agitación.

30

Como medios de cultivo pueden usarse todos aque

415591



- 13.-

1 llos, que se emplean ordinariamente para el cultivo de cepas
pertenecientes al género Streptomyces. Los ejemplos de _
fuentes adecuadas de carbón incluyen almidón, dextrina, glu
cosa, maltosa, licor residual de maíz y melazaâ y los ejem_
5 plos de fuentes adecuadas de nitrógeno incluyen extracto de
carne, peptona, extracto de levadura, harina de soja, caseí-
na, sulfato de amonio y nitrato de amonio. Si fuera neces-
ario, puede añadirse potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre,
zinc, manganeso, cobalto y sales inorgánicas semejantes o _
10 elementos menores.

Para la recuperación de la sustancia antibiótica
B-41 del caldo, se ha adoptado un procedimiento convencional,
tal como la extracción con un disolvente orgánico en presen-
cia o ausencia de un agente adsorbente o auxiliar. En este
15 caso, las células pueden ser separadas por filtración desde
el caldo y después extraídas con un disolvente orgánico, tal
como metanol o acetona, o el caldo puede someterse directa-
mente a extracción con disolvente orgánico, tal como cloro_
formo, etil acetato, benceno, n-hexano o ciclohexano.

20 Para la purificación de un B-41 crudo aceitoso, _
obtenido separando el disolvente del extracto, se ha adopta-
do un conocido procedimiento de purificación, tal como croma-
tografía de columna o extracción con disolvente.

25 El presente invento está ilustrado en detalle más
abajo con referencia a ejemplos, pero huelga decir que el _
alcance del invento no está limitado a los ejemplos.

30 En los ejemplos, la actividad del caldo fué evalua-
da de acuerdo con la inmersión de gorgojos de araña de dos _
manchas. Es decir, hojas de alubia de riñón, parasitizadas

415591



- 14.-

1 con gorgojos de araña de dos manchas, fueron sumergidas du-
rante un minuto en un extracto de acetona al 70% del caldo
o en una dilución acuosa del mismo y después se secaron al
aire, y se midió la actividad acaricida después de 24 horas
5 para determinar la actividad.

EJEMPLO 1.-

30 litros de un medio de cultivo líquido (pH de
alrededor de 7.2) conteniendo 2,0% de glucosa, 1,0% de hari-
na de soja y 0,2% de cloruro sódico se cargaron en un fermen-
10 tador de cubeta de 50 litros y después se esterilizaron por
calor. La cepa B-41-146 fué inoculada en dicho medio y some-
tida a cultivo de agitación aeróbica, bajo condiciones, ta-
les como una temperatura de 28º C, una aereación de 8 litros
15 /minuto y una agitación de 250 r.p.m. Cuando se continuó el
cultivo durante 120 horas, el caldo llegó a exhibir un color
amarillo brillante. En esta fase, se interrumpió el cultivo
y se examinó la actividad. Como resultado una dilución de
300 veces del caldo mostró una actividad acaricida de 100%.
20 Subsiguientemente, las células fueron separadas por filtra-
ción desde el caldo y se extrajeron con acetona y después la
acetona fué separada por destilación para obtener 44 g. de
una sustancia de color castaño. Esta sustancia fué extraída
con hexano caliente y después el hexano fué separado por des-
25 tilación. El residuo fué disuelto en una pequeña cantidad
de metanol y la solución resultante fué dejada reposar por
la noche a -20º C. para depositar precipitados que entonces
fueron separados. Después de ello, el metanol fué separado
por destilación para obtener 35 g. de una sustancia aceitosa

30

415591

-6



- 15.-

1 de color castaño. La sustancia aceitosa, así obtenida, fué
sometida a cromatografía de columna de alúmina y fué eluida
con cloroformo, recogiendo fracciones eficaces de acuerdo
con la actividad acaricida y después se concentró el cloro-
5 formo. Esta operación fué repetida varias veces para obte-
ner 8,2 g. de una sustancia cruda. La actividad acaricida
de la sustancia cruda, fué de 100% cuando se usó en una con-
centración de 2 /ug/ml.

10 La sustancia cruda fué hecha pasar a través de una
columna empaquetada con "Sephadex LH-20" (nombre de comer-
cio para un producto de Pharmacia Co.) y se eluyó con meta-
nol, por lo que se eluyeron en este orden A_2 , B_1 , B_2 , A_3 , y
 A_1 , que son los componentes principales de B-41. Sin embar-
15 go, estas sustancias se habían solapado entre sí y, por lo
tanto, fueron recuperadas separadamente en la forma de dos
grupos de $B_1 + A_2$ y $B_2 + A_1 + A_3$. El grupo $B_1 + A_2$ fué
sometido a cromatografía de columna de gel de sílice y des-
pués se eluyó con cloroformo-etil acetato para obtener 210 mg.
20 de B_1 y 115 mg. de A_2 y el grupo $B_2 + A_1 + A_3$ fué sometido
a cromatografía de columna de gel de sílice para obtener
200 mg. de B_2 y 30 mg. de B_3 , que fué similar a B_2 . Subs-
iguientemente el grupo restante $A_1 + A_3$ fué sometido a roma-
tografía de columna de alúmina para obtener 372 mg. de A_1 ,
25 42 mg. de A_3 y 15 mg. de A_4 , que fué similar a A_3 . Además,
la columna de alúmina, a través de la cual se había hecho
pasar la antecitada sustancia aceitosa de color castaño, fué
repetidamente sometida a elución con metanol y cromatografía
de columna de gel de sílice para obtener 78 mg. de C_1 de
30



1 B-41 y 52 mg. de C₂ de B-41.

5 Para la preparación de la composición insecticida y acaricida del presente invento, se diluyen una o varias de las sustancias así obtenidas A₁, A₂, A₃, A₄, B₁, B₂, B₃, C₁ y C₂ de B-41 con un soporte y, si fuera necesario, se incorporan con otros agentes auxiliares, por lo que dichas sustancias pueden formularse en una de las fórmulas de polvos, gránulos, gránulos finos, polvos humectables, concentrados emulgables, chorros de aceite, etc. Huelga decir que puede interrumpirse la purificación en una etapa opcional de purificación y la sustancia cruda resultante, que no haya sido completamente purificada, puede ser usada como ingrediente activo. En el caso de que se desee emplear dicha sustancia cruda tal como está como ingrediente activo, es suficiente que la sustancia cruda se purifique para alcanzar una actividad acaricida de 100% a la concentración de 5 partes por millón. En este caso, el contenido de B-41 en la sustancia cruda, es de alrededor de 50% y los restos son impurezas del caldo.

20 El soporte, al que se hace referencia aquí, significa una sustancia sintética o natural inorgánica, que se agrega a un insecticida con el fin de hacer que su ingrediente activo alcance fácilmente los objetivos, tales como plantas, gorgojos, insectos nocivos, etc. o para facilitar el almacenaje, transporte o manipulación del ingrediente activo.

25 Ejemplos de soportes sólidos adecuados, incluyen sustancias inorgánicas, tales como arcilla, talco, tierra de diatomáceas, caolina, bentonita, carbonato de calcio y

415591



- 17.-

1 silicato cálcico sintético; resinas naturales y sintéticas, tales como resinas de cumarona, resinas alquídicas y cloruro de polivinilo; ceras, tales como la cera carnauba y cera de parafina; cáscaras de nueces y de cocos y harina de soja.

5 Los ejemplos de soportes líquidos, incluyen agua; alcoholes, tales como etanol, isopropanol y etileno glicol; glicol éteres, tales como etileno glicol, monofenil éter y dietileno glicol monoetil éter; cetonas, tales como acetona, metil isobutil cetona, ciclohexanona, acetofenona e isoforona, éteres tales como tetrahidrefurano y dioxano; hidrocarburos aromáticos, tales como benceno, tolueno, xileno y metil naftaleno; hidrocarburos clorados, tales como tricloroetileno y tetracloruro de carbono; fracciones de petróleo de puntos de ebullición medios y altos conteniendo, queroseno, aceites ligeros o hidrocarburos aromáticos.

10 Los ejemplos de impulsores adecuados, incluyen gases de furon, gases de petróleo hechos líquidos, metiléter y monómeros de cloruro de vinilo.

20 Para emulsionar, dispersar, humectar o esparcir se usa un agente superficie activo, que puede ser iónico o no iónico. Los ejemplos de adecuados agentes superficie activos aniónicos incluyen sales de sodio y calcio de ácido lignosulfónico, sales de sodio y potasio de ácido oléico, sal de sodio de ácido laurilsulfónico y sales de sodio y calcio de ácido dodecil-benceno sulfónico. Los ejemplos de adecuados agentes superficie activos acatiónicos incluyen aminas alifáticas superiores y condensadas de óxido de etileno de aminas alifáticas superiores. Los ejemplos de ade-

30

415591

6



- 18.-

1 cuados agentes superficie activos no iónicos incluyen glice-
ruros de ácidos grasos, ésteres de sucrosa de ácidos grasos,
condensados de óxido de etileno de alcoholes alifáticos su-
periores, condensados de óxido de etileno de ácidos grasos
5 superiores, condensados de óxido de etileno de alquil feno-
les y alquil naftoles y copolímeros de óxido de etileno con
óxido de propileno.

La composición insecticida y acaricida del presente
invento puede contener un agente coloide protector, tal
10 como gelatina, goma arábica, caseina, polivinil alcohol o
carboximetil celulosa, o un agente tixotrópico, tal como po-
lifosfato de sodio o bentonita. La composición del presente
invento puede contener además otro compuesto teniendo acti-
vidades insecticidas y acaricidas tal como, por ejemplo,
15 2-(1-metilpropil)-4,6-dinitrofenil- β , β -dimetil acrilato,
di-(p-clorofenil-ciclopropilcarbinol, N'-(2-metil-4-clorofe-
nil)-N,N-dimetilformamidina, 2,4,4',5-tetraclorodineilsulfo-
na, 1,1-bis (p-clorofenil)-2,2,2-tricloroetanol, O,O-dietyl-
S-(2-etiltio)etil fósforo-ditioato, O,O-dimetil-S-(N-metil-
20 N-formilcarbomoilmetil) fosforoditioato, 2-secundario-butyl-
fenil-N-metilcarbamato ó m-tolil-N-metilcarbamato o un acei-
te mineral, por los que se incrementan todavía más los efec-
tos de la composición y, en algunos casos, pueden esperarse
efectos sinérgicos. Huelga decir que la composición del pre-
25 sente invento puede ser usada en mezcla con cualesquiera de
los fungicidas, herbicidas, reguladores de crecimiento de
plantas, atrayentes, fertilizantes, etc.

Los efectos de las composiciones insecticidas y
acaricidas del presente invento se explicarán más abajo con
30

415591

6 JUN 1975

- 19.-

1 referencia a ejemplos de ensayo.

Ejemplo de ensayo 1:

5 Cada uno de los concentrados emulsionables conteniendo 20% de cada uno de A₁, A₂, A₃, A₄, B₁, B₂, B₃, C₁, y C₂ de B-41 que habían sido aislados de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, fué diluido a una concentración dada para preparar una solución química.

10 Hojas de alubia de riñón infestadas con gorgojos de araña de dos manchas fueron sumergidas durante un minuto en la arriba mencionada solución química y después se secaron al aire y se calculó la actividad acaricida (%) después de 24 horas. Los resultados obtenidos fueron como se exponen en la tabla siguiente.

15

20

25

30

415591

Fig. 6



30 25 20 15 10 5 1

Concen- tración (p.p.m.)	20	10	5	2.5	1.25	0.63	0.31	0.16	0.08	0.04
Fracción	100	100	100	19.9	0	100	100	100	100	0.04
A ₁	100	100	100	19.9	0	100	100	100	100	0.04
A ₂	100	100	100	67.6	0	100	100	100	100	15.2
A ₃	100	100	100	100	100	100	100	98.2	100	21.3
A ₄	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B ₁	98.1	81.5	69.2	20.0	0	100	100	100	100	100
B ₂	100	100	100	100	100	100	100	80.5	16.6	0
B ₃	100	100	100	100	100	100	100	74.1	18.3	0
C ₁	100	100	100	100	100	100	100	100	100	51.8
C ₂	100	100	100	100	100	100	100	100	100	97.3

Referencia 100 56.4 0
 x 1,1-Bis-(p-clorofenil)-2,2,2-tricloroetanol (nombre de comercio, "Kalthane")

415591



1
5
10
15
20
25
30

Ejemplo de ensayo 2.

Un concentrado emulsionable conteniendo 20% de un B-41 crudo, que había sido obtenido purificando 2 veces de acuerdo con cromatografía de columna de alúmina la sustancia aceitosa de color castaño preparada en el ejemplo 1, fué diluida a una concentración dada para preparar una solución química. Esta solución química fué rociada sobre hojas de manzano, infestadas con alrededor de 100 gorgojos rojos europeos y, 5 días después, se contó el número de gorgojos vivos. los resultados obtenidos fueron como los que se exponen en la tabla siguiente.

	<u>200 p.p.m.</u>	<u>100 p.p.m.</u>	<u>50 p.p.m.</u>
B-41 crudo	5/108	14/121	50/115
Referencia (Kelthane)	0/97	8/103	56/128
No tratado		88/102	

(El numerador muestra el número de gorgojos antes de rociar y el denominador muestra el número de gorgojos vivos al tiempo de la cuenta.)

Ejemplo de ensayo 3.

Cada uno de los concentrados emulsionables conteniendo 20% de cada uno de los B-41 crudos (que se había obtenido purificando de acuerdo con cromatografía de columna de gel de sílice la sustancia aceitosa de color castaño preparada en el Ejemplo 1), y una mezcla cruda de A₁ + A₂ + A₃ (que se había obtenido sometiendo dicho B-41 crudo a cromatografía de columna usando un disolvente mixto comprendiendo etil acetato y benceno (50:50) fué diluido a una concen-

415591

E6



- 22.-

1 tradición dada para preparar una solución química. Esta solu-
 ción química fué rociada sobre hojas de naranjo infestadas
 con gorgojos rojos cítricos y se calculó la actividad acarici-
 da (%) después de 24 horas. Los resultados obtenidos son _
 5 los expuestos en la tabla siguiente:

	<u>20 p.p.m.</u>	<u>10 p.p.m.</u>	<u>7 p.p.m.</u>	<u>3,3 p.p.m.</u>
B-41 crudo		100%		85,5%
A ₁ + A ₂ + A ₃ crudo				
10 en mezcla		100		100
Referencia (Kelthane)	90.9		30.8	

Ejemplo de ensayo 4.

15 Cada uno de los concentrados emulsionables conte-
 niendo 20% en cada caso de una mezcla cruda de A₁ + B₁ de
 B-41 (que se había obtenido purificando tres veces de acuer-
 do con cromatografía de gel de sílice (n-hexano:acetona =
 70 : 30) la sustancia aceitosa de color castaño preparada _
 en el ejemplo 1) y una mezcla cruda de A₂ + A₃ + B₂ de B-41
 (que se habían obtenido de la misma manera que anteriormente)
 20 fueron diluidos a una concentración dada para preparar una
 solución química. Esta solución química fué rociada sobre
 coles chinas, infestadas con afidos verdes de melocotón y se
 calculó la mortandad (%) de los afidos después de 24 horas.
 Los resultados obtenidos fueron los expuestos en la tabla
 25 siguiente:

	<u>250 p.p.m</u>	<u>25 p.p.m</u>	<u>2,5 p.p.m.</u>
Mezcla cruda de A ₁ + B ₁	100%	92.3%	64.2%
Mezcla cruda de A ₂ + A ₃ + B ₂	100	89,8	52,8
Referencia xx)	100	73,1	33,1

30

415591

-6



- 23.-

1
5
10
15
20
25
30

xx) O,O-dimetil-O-(2,2-diclorovinil)fosfato.

Ejemplo de ensayo 5.

Huevos de taladrador de tallo de arroz, de la primera generación, fueron inoculados a plantas de arroz (variedad "Kinmaze" que se habían plantado en tiestos de 200 cm² y fueron incubados para permitir que las larvas invadieran los tallos). Subsiguientemente un polvo humectable, conteniendo 40% de un B-41 crudo, que se había obtenido purificando dos veces de acuerdo con cromatografía de columna de alúmina, la sustancia aceitosa de color castaño, preparada en el Ejemplo 1, fué diluido a una concentración dada y después rociado sobre las plantas en una proporción de 100 cc. por tiesto. 5 días después, los tallos fueron henchidos para examinar las larvas vivas y muertas y se calculó la mortandad (%) de las larvas. Los resultados obtenidos fueron los expuestos en la tabla siguiente:

	<u>100 p.p.m.</u>	<u>50 p.p.m.</u>
B-41 crudo	100%	79.4%
Referencia xxx)	82,1	25,5
xxx) O,O-dietil-O-(2-isopropil-4-metil-6-pirimidinil) fósforotioato.		

Como se ha visto en los ejemplos de ensayo 1 a 5, la sustancia antibiótica B-41 es excelente en actividad insecticida y acaricida y tiene efectos bastantes más prominentes particularmente sobre gorgojos, que los productos químicos convencionales.

Los procedimientos para preparar las composiciones

415591

-6

JUN 1970

- 24.-

1 insecticidas y acaricidas del presente invento, se ilustran
más abajo con referencia a ejemplos de preparación, en que
todas las partes son de peso.

Ejemplo de preparación, 1.

5 10 partes de un B-41 crudo, que se había obtenido
purificando dos veces, de acuerdo con cromatografía de co_
lumna de gel de sílice, la sustancia aceitosa de color cas-
taño preparada en el Ejemplo 1, fueron mezcladas homogénea-
mente con 5 partes de carbono blanco, 50 partes de talco y
10 35 partes de arcilla. La mezcla resultante fué pulverizada
tres veces por medio de un pulverizador del tipo de impacto
y se homogeneizaron de nuevo para obtener un polvo.

Ejemplo de preparación 2.

15 40 partes del mismo B-41 crudo, que en el Ejem-
plo de preparación 1 se mezclaron homogéneamente con 20 par-
tes de carbono blanco, 5 partes de dodecil-bencenosulfonato
de sodio, 2 partes de polivinil alcohol y 33 partes de arci-
lla. La mezcla resultante fué pulverizada 3 veces por me-
20 dio de un pulverizador del tipo de impacto y de nuevo se _
homogeneizaron para obtener un polvo humectable.

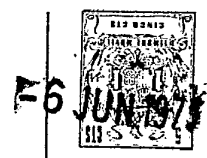
Ejemplo de preparación 3.

25 20 partes del mismo B-41 crudo, que en el Ejemplo
de preparación 1 se mezclaron homogeneamente con 7 partes
de polioxietileno nonilfenil éter, 3 partes de dodecilben-
cenosulfonato de calcio y 70 partes de xileno, y la mezcla
resultante fué filtrada para obtener un concentrado emulsi-
nable.

Ejemplo de preparación 4.

30

415591



1

10 partes del mismo B-41 crudo, que en el Ejemplo de preparación 1 fueron disueltas 10 partes de xileno. La solución resultante fué mezclada con 80 partes de aceite de máquina y después filtrada para obtener un rociado de aceite.

5

=====

N O T A .
- - - - -

10

La presente patente de invención consta de las siguientes reivindicaciones:

15

1.- Procedimiento para la obtención de sustancias antibióticas B-41-A, B-41-A₂, B-41-A₃, B-41-A₄, B-41-B₁, B-41-B₂, B-41-C₁ y B-41-C₂, caracterizado porque comprende las operaciones de cultivar una cepa productora de B-41 perteneciente al género Streptomyces en un medio de cultivo nutritivo conteniendo fuentes de carbono y de nitrógeno a una temperatura de 18 a 37°C. en condición estacionaria o aireada hasta que se haya acumulado en el mismo una potencia antibiótica sustancial, y después recuperar dichas sustancias antibióticas, bien sea individualmente o en la forma de mezclas, desde el caldo de fermentación de acuerdo con métodos de separación ordinarios, incluyendo extracción de disolvente orgánico y/o separación cromatográfica.

20

25

Procedimiento para la obtención de sustancias

Handwritten signature
30

415591

6 JUN 1973



- 26.-

1

antibióticas B-41-A, B-41-A₂, B-41-A₃, B-41-A₄, B-41-B₁,
B-41-B₂, B-41-C₁ y B-41-C₂.

5

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva y se ilustra en los planos anexos, cuyo texto consta de 26 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola de sus caras.

10

Madrid, a

- 6 JUN 1973

CARLOS ROEB
P. P.

Fdo.: Francisco del Pezo

15

20

25


30

415591.



415591

Fig. 1

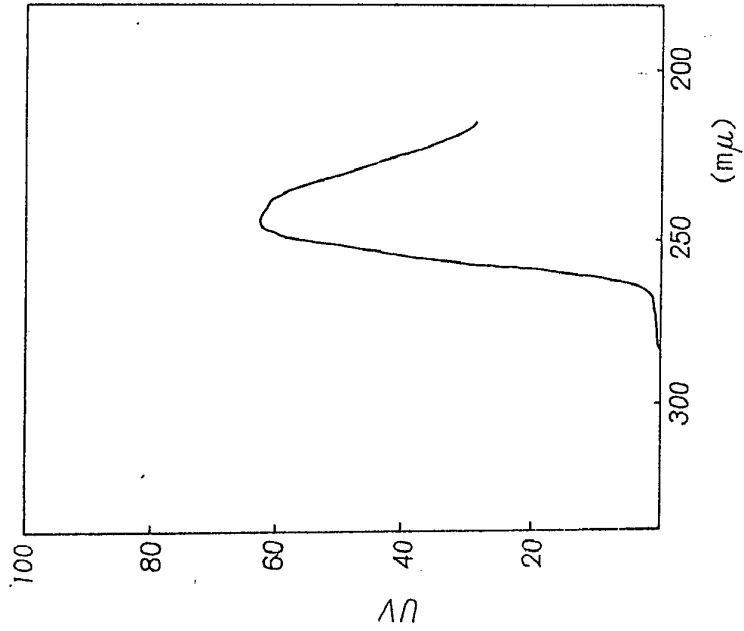
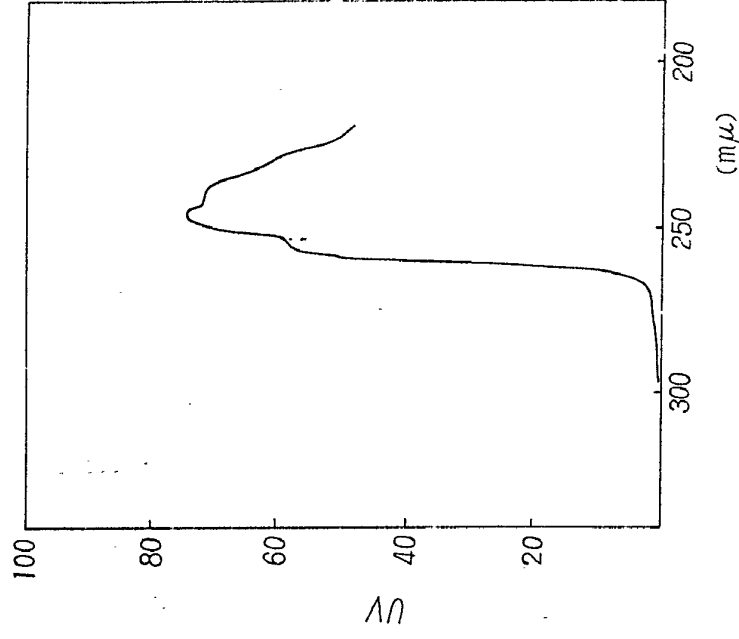


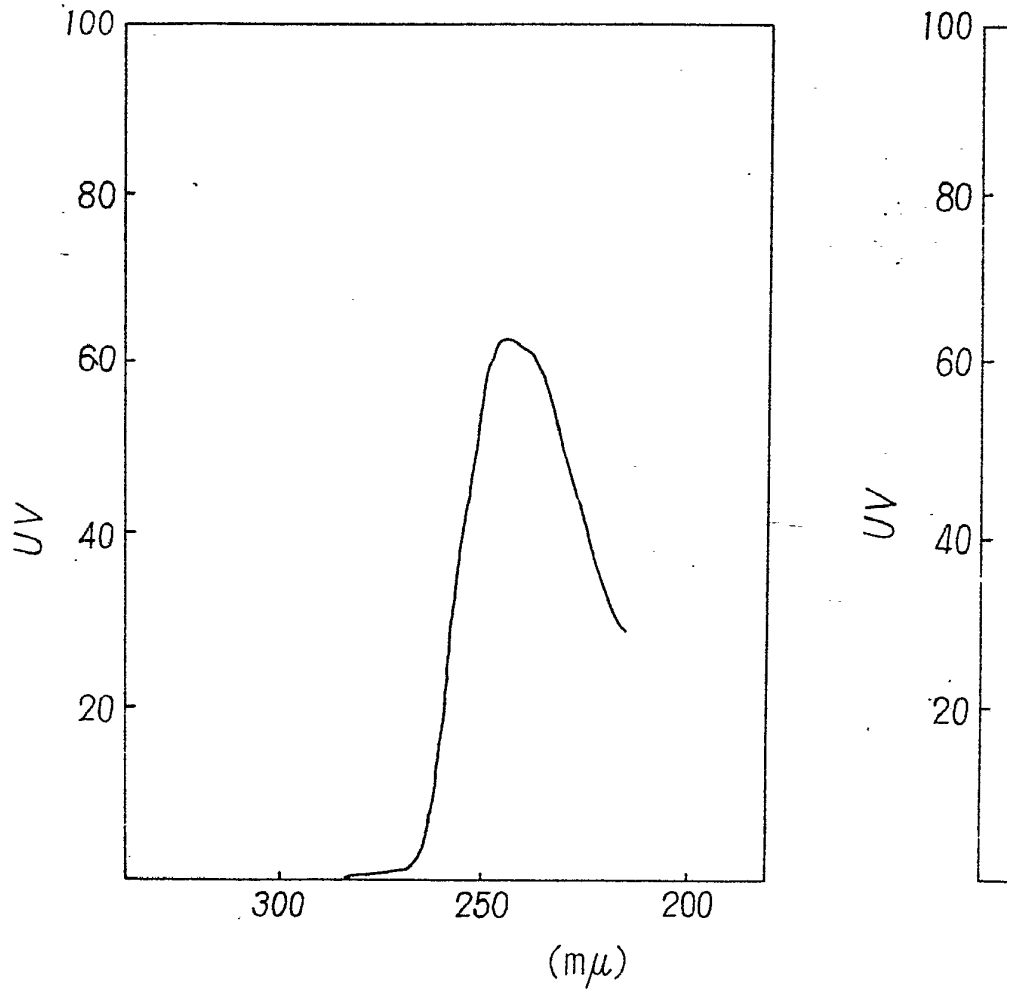
Fig. 2



ESCALA TABIABLE
CARLOS ROYB
P.P.

415591

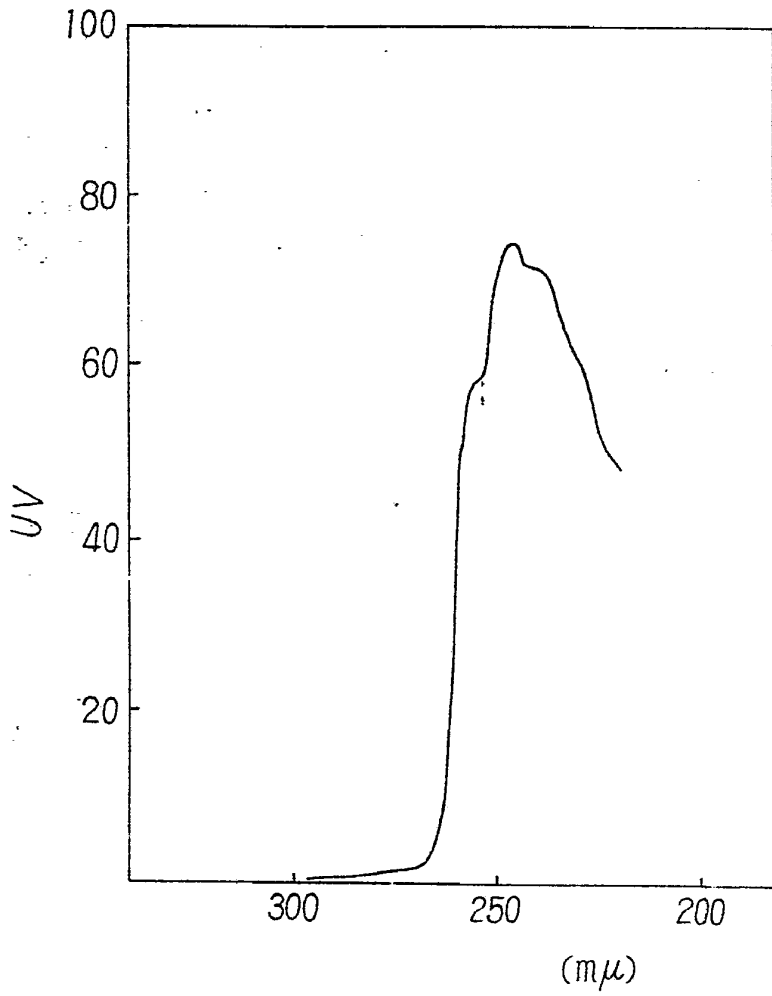
Fig. 1





415591

Fig. 2



ESCALA VARIABLE
CARLOS ROEB
P. P.



415591

415591

Fig. 3

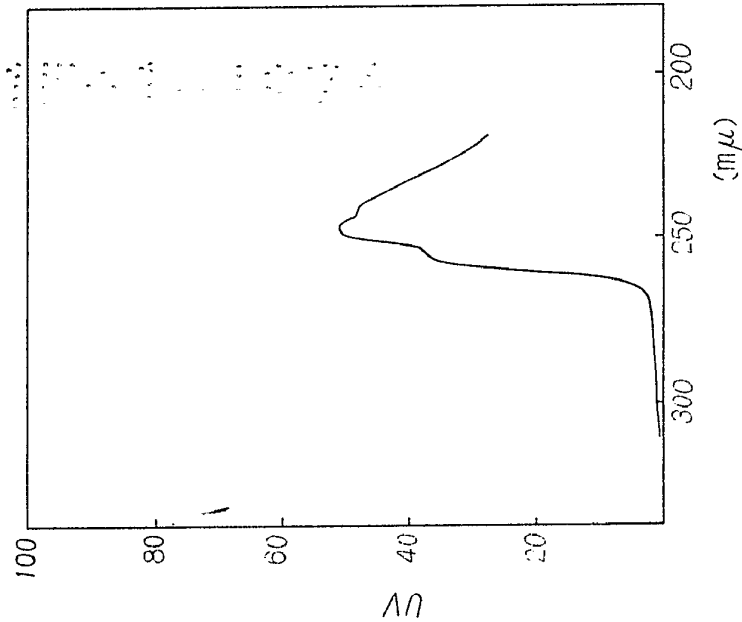
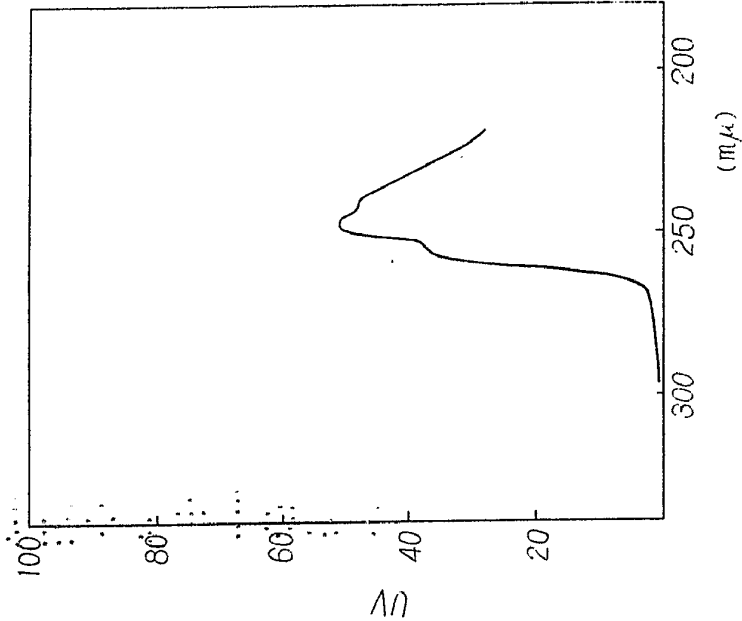


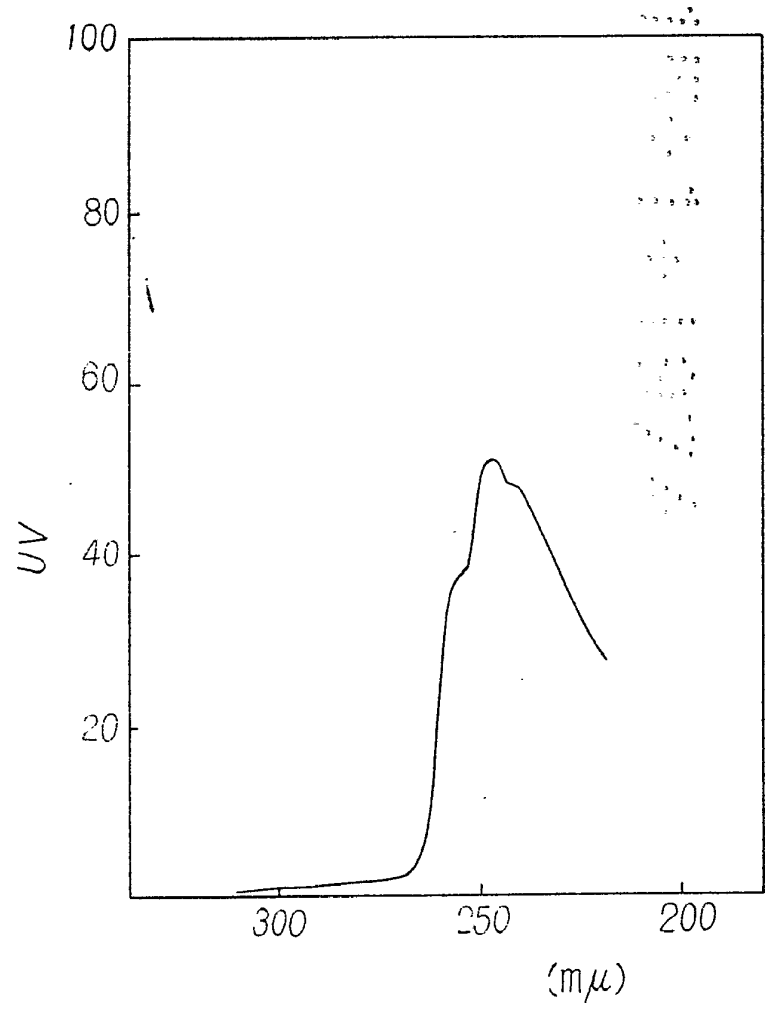
Fig. 4



ESCALA VARIABLE
CARLOS ROEY
P. R.

415591

Fig. 3

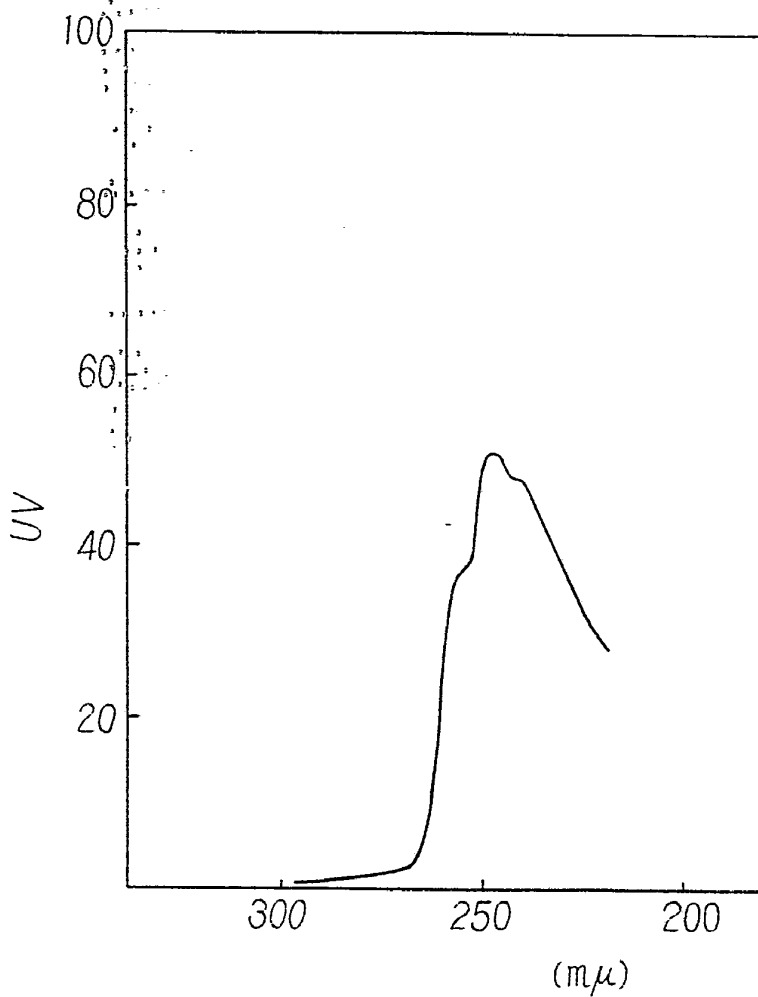


UV



415591

Fig. 4



ESCALA VARIABLE
CARLOS ROEB
P. P.

415591



415591

Fig. 5

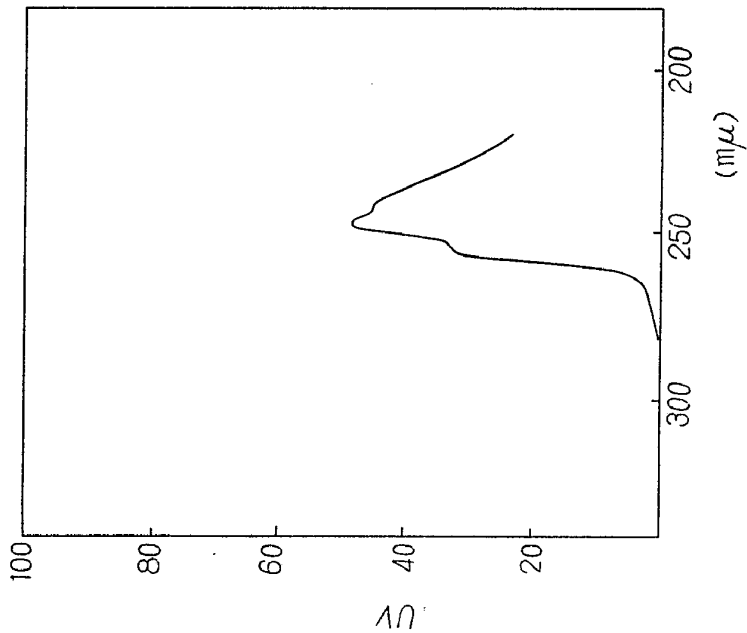
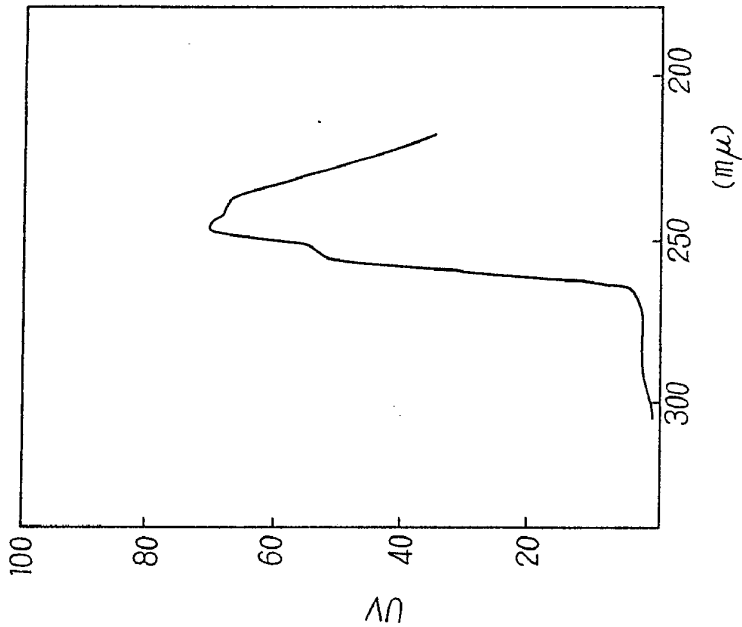


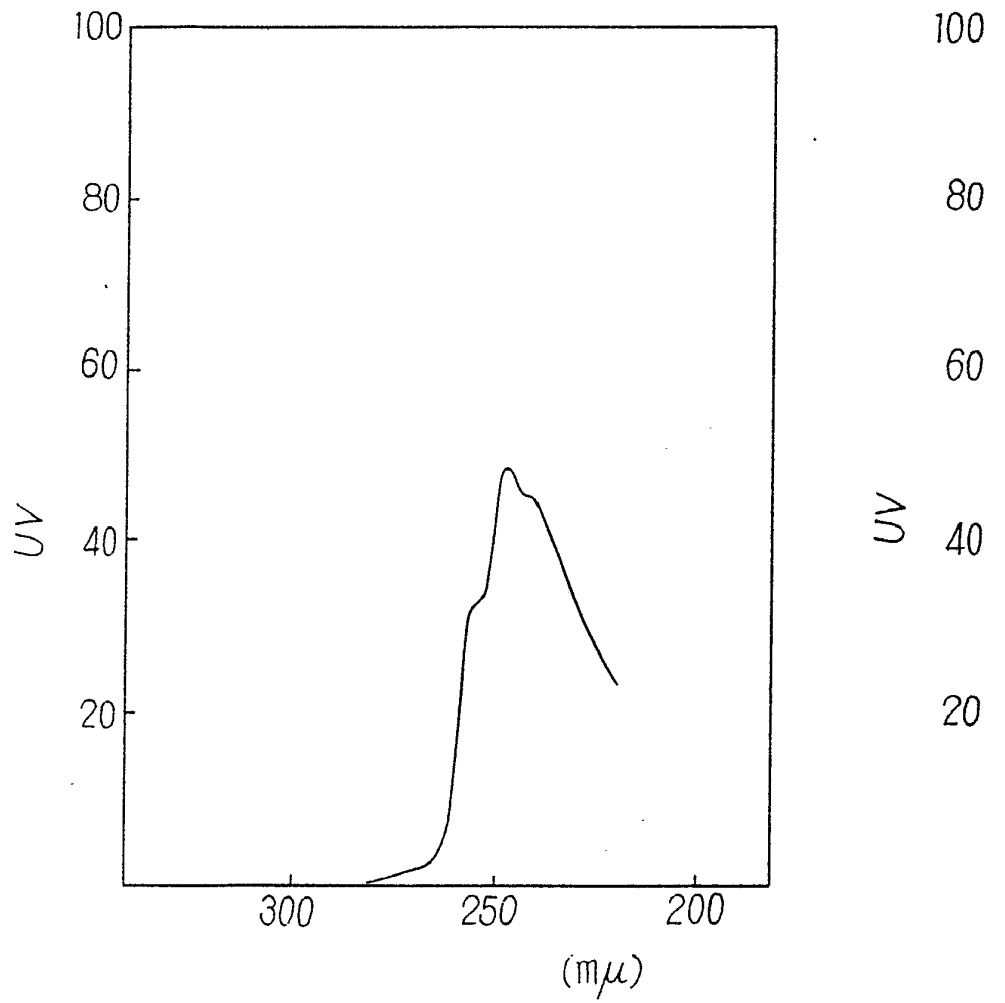
Fig. 6



ESQUELA VARRIBLE
 CARLOS ROEB
 P.P.P.

415591

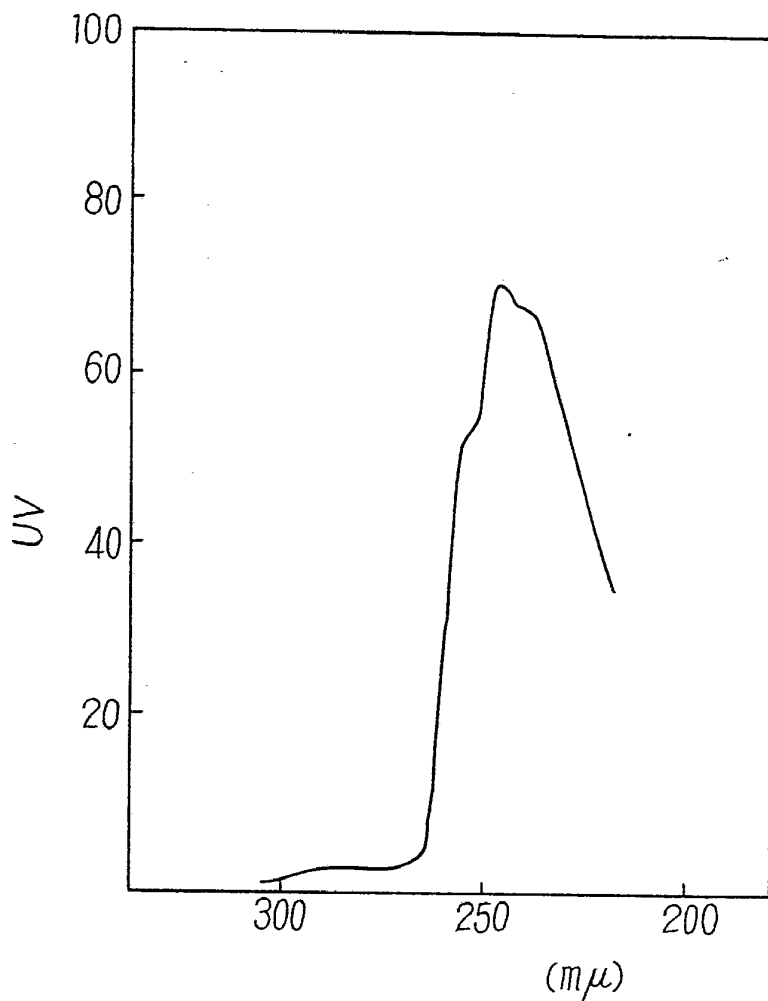
Fig. 5





415591

Fig. 6



ESCALA VARIABLE
CARLOS ROEB
P.P.

Fdo.: Francisco del Pozo

415591



Fig. 7

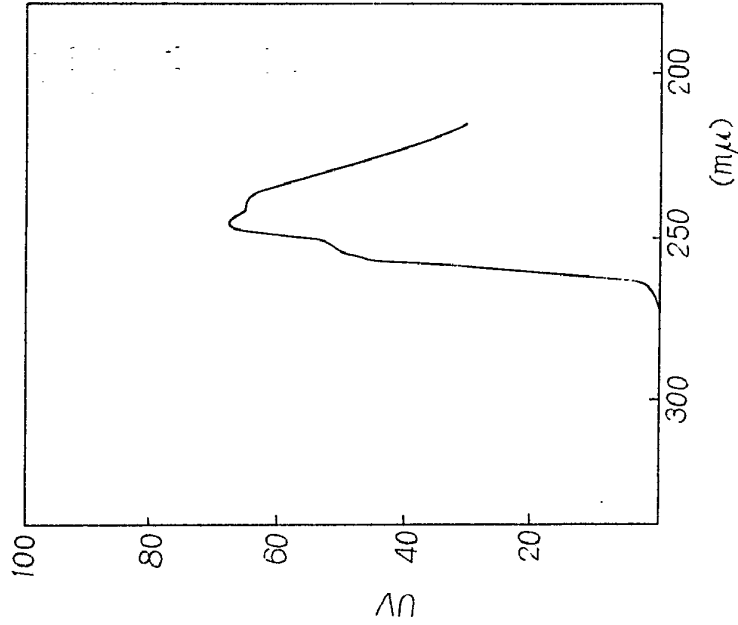
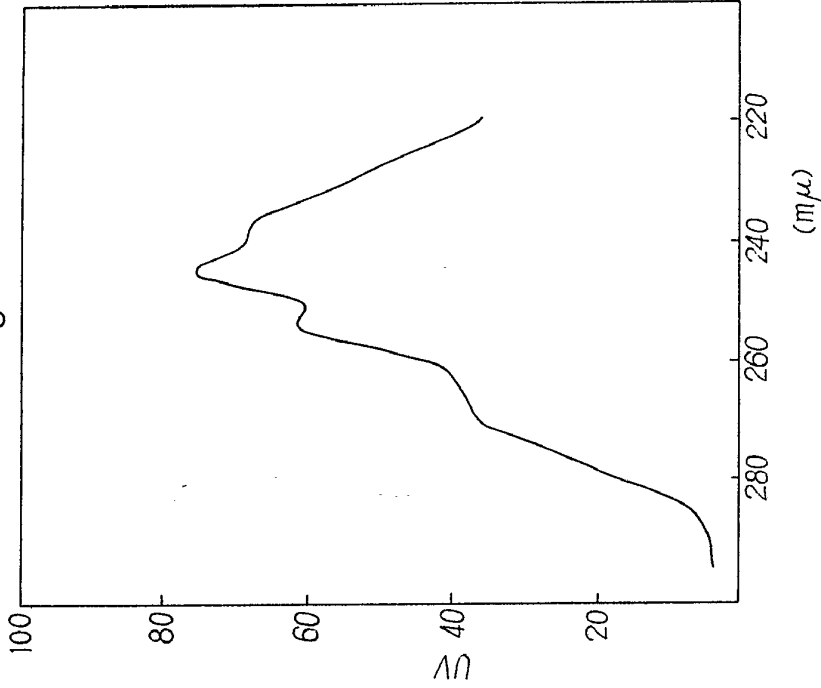


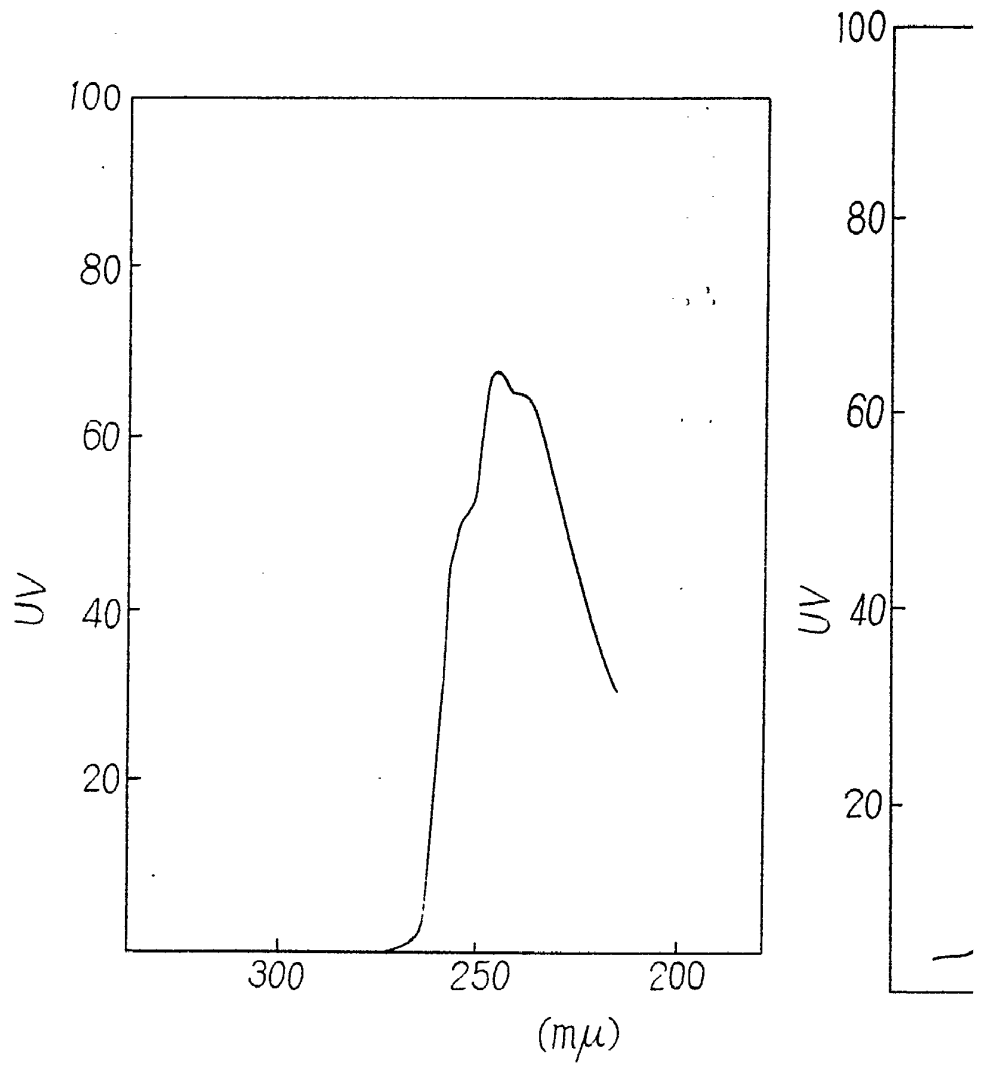
Fig. 8



ESCALA VARIABLE
CARLOS RO
P.B.

415591

Fig. 7



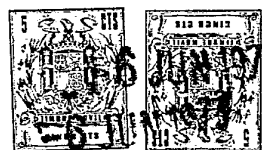
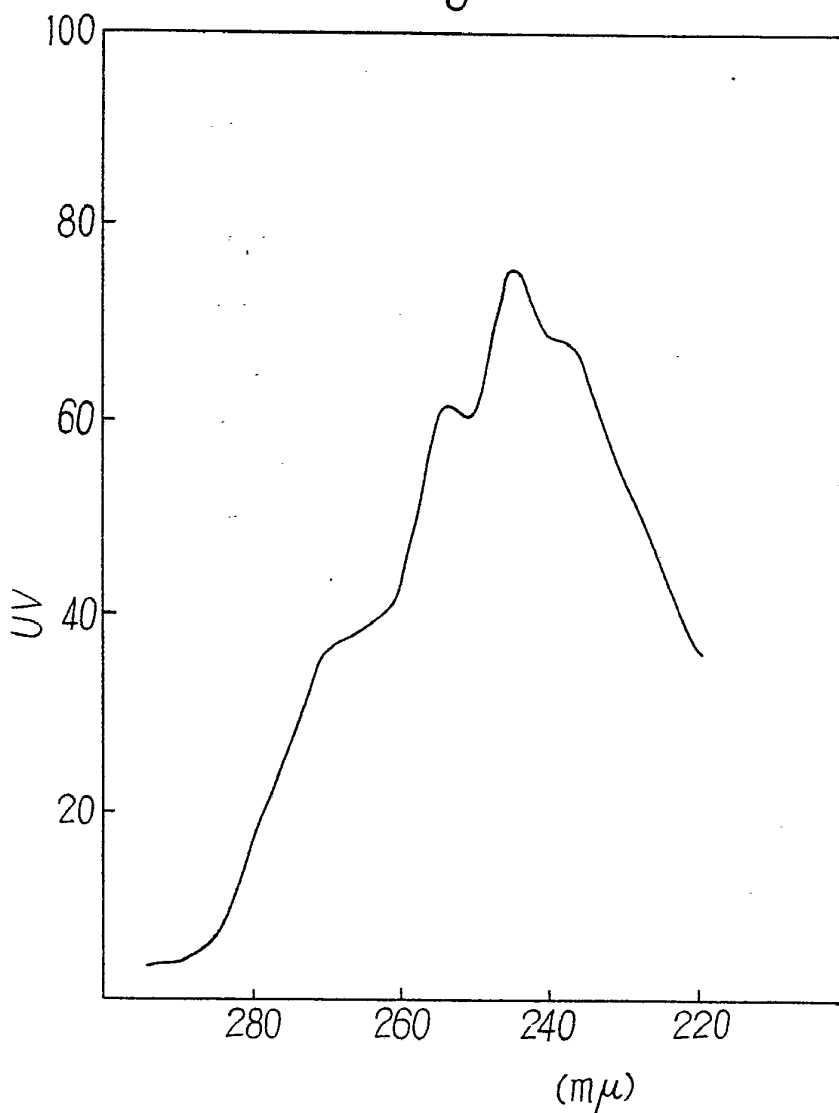


Fig. 8

415591

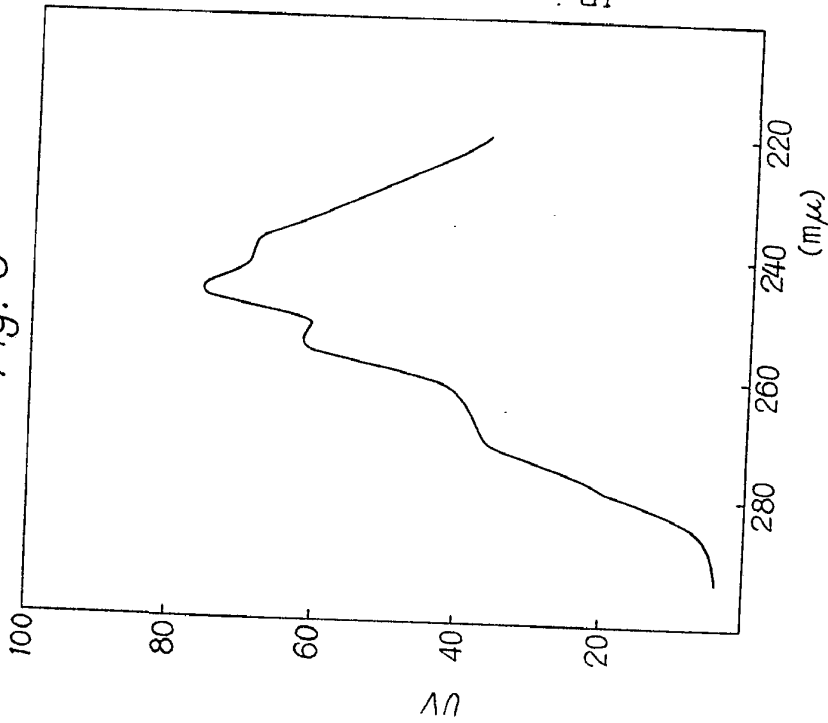


ESCALA VARIABLE
CARLOS ROE
P. P.



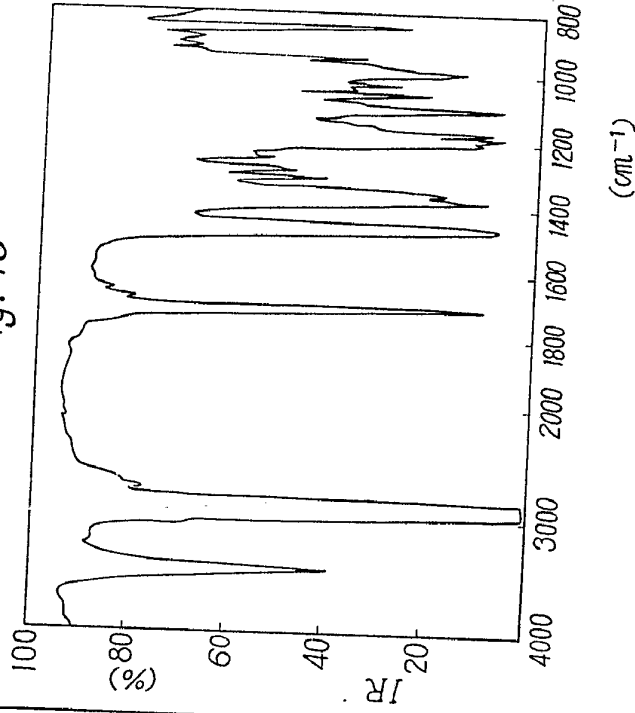
415591

Fig. 9



415591

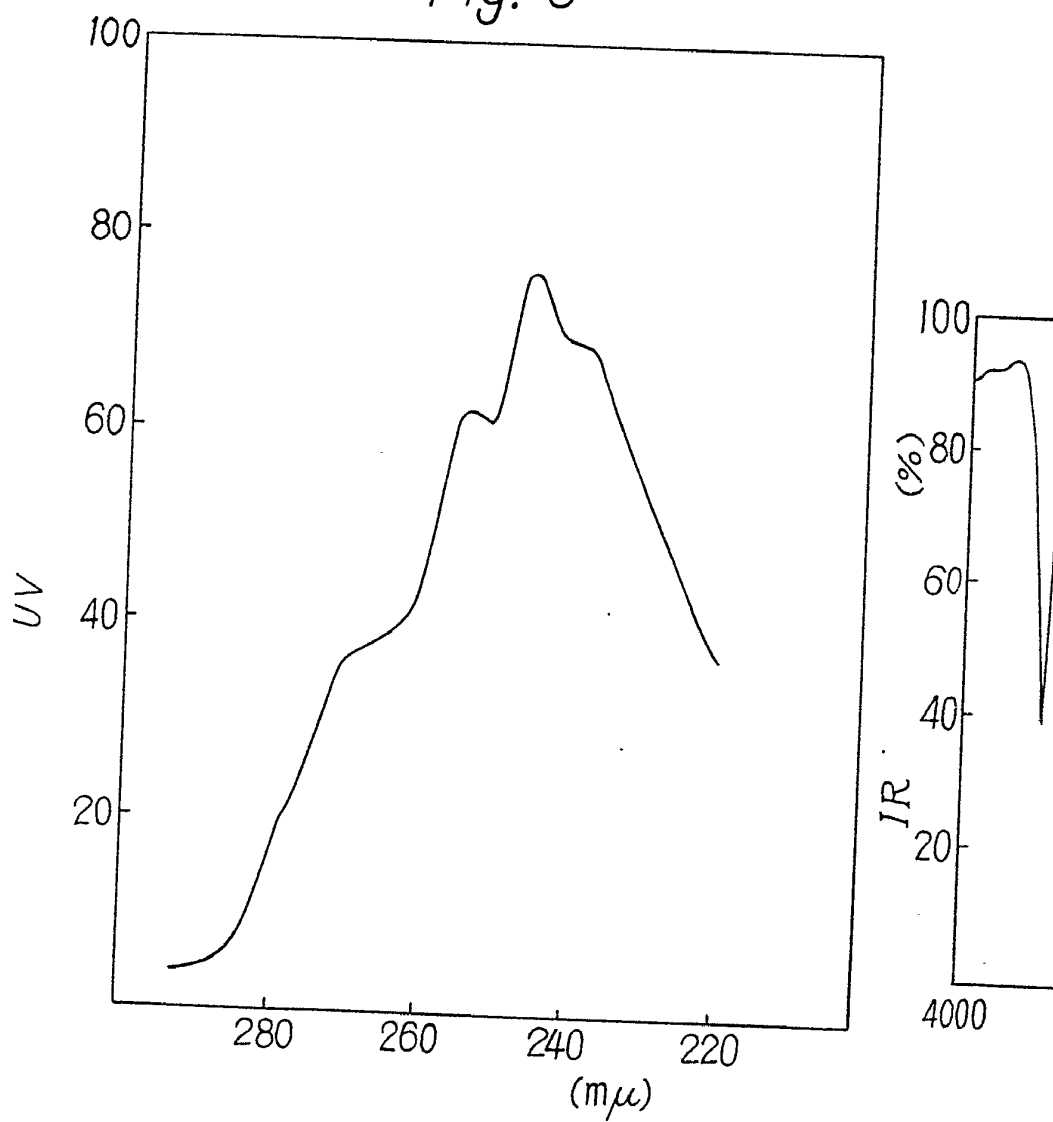
Fig. 10



ESBILA VARMABLE
 CARLOS ROEY
 P. P.

415591

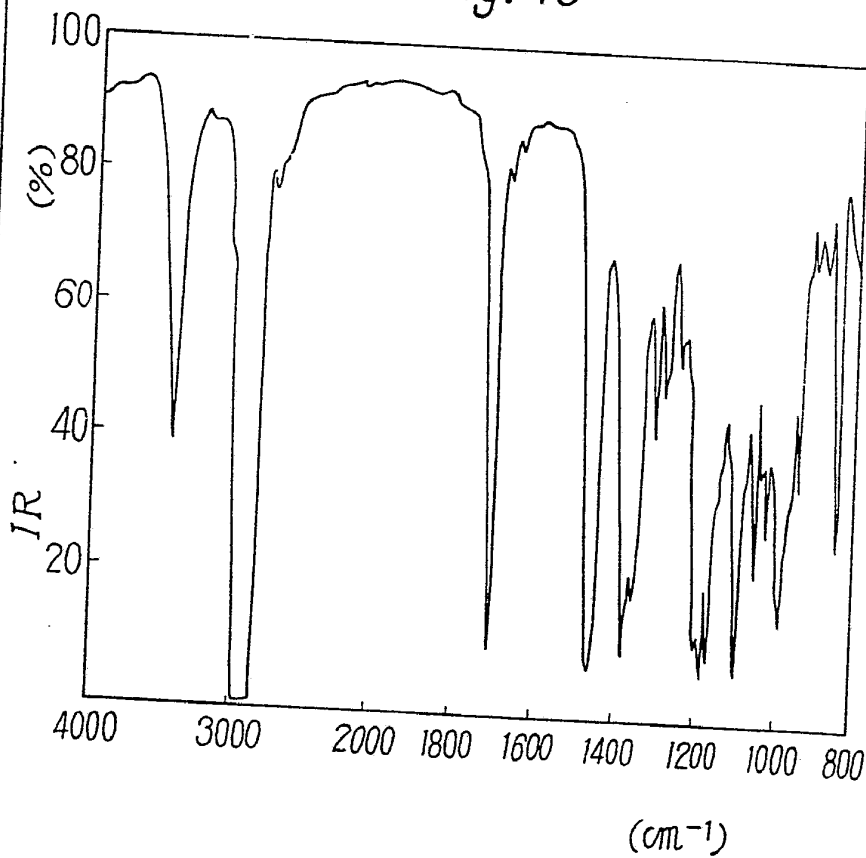
Fig. 9





415591

Fig. 10



ESCALA VARIABLE
CARLOS ROEB
P. P.

Fdo.: Francisco del Pozo



415591

415591

Fig. 11

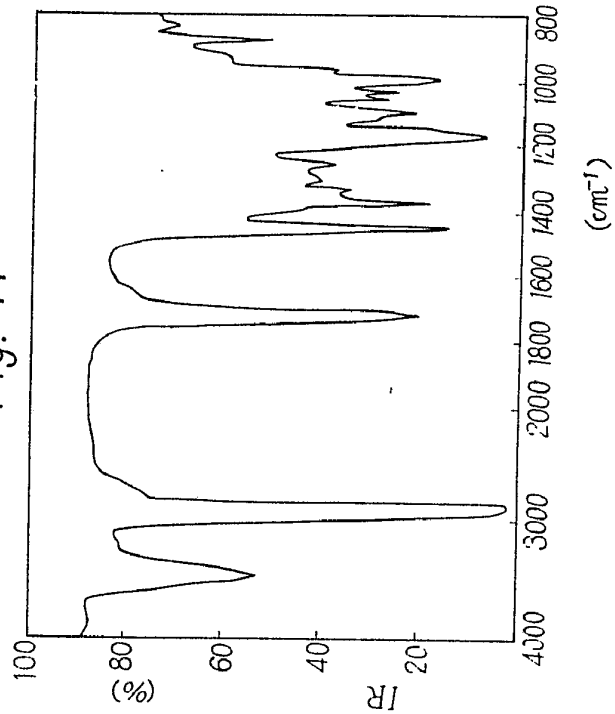
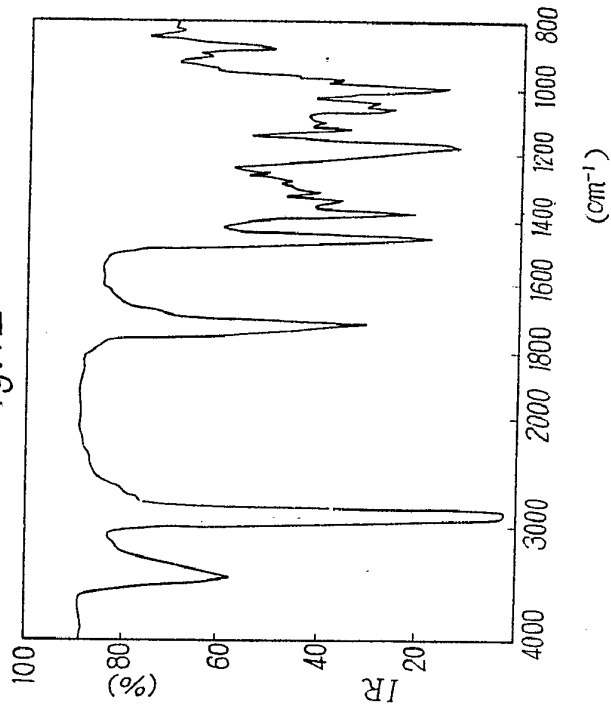


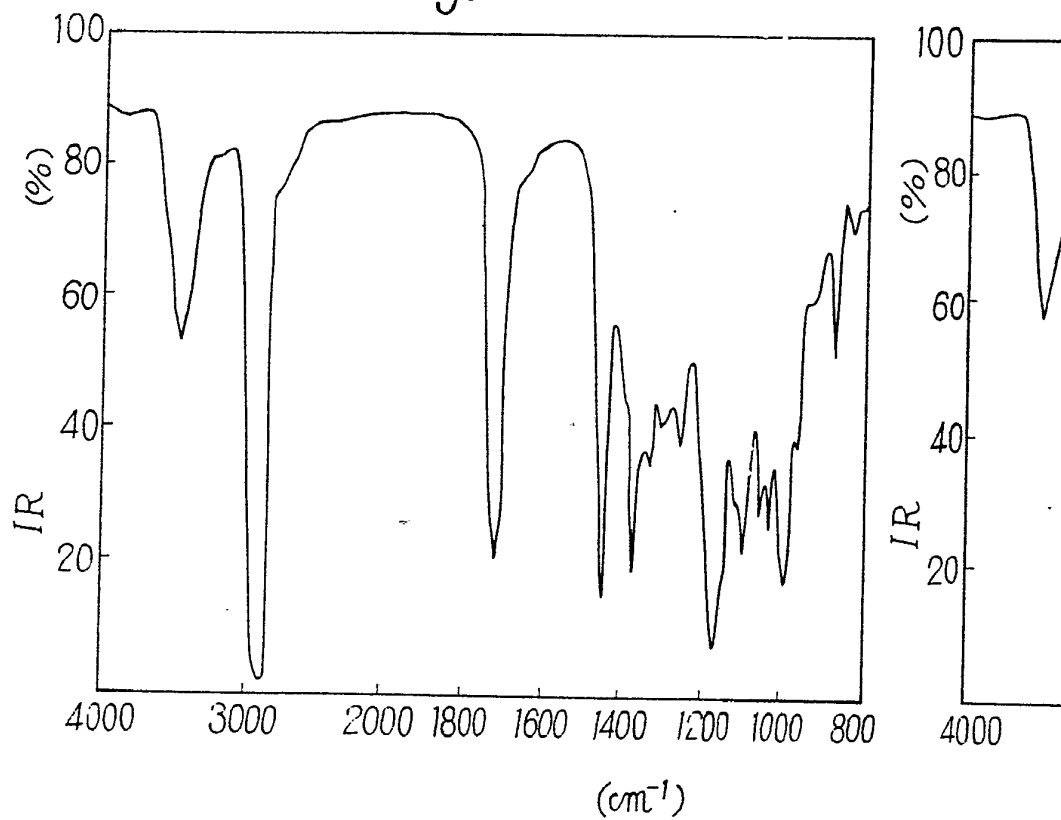
Fig. 12

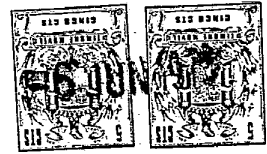


ESQUILA VILLALBA
 CARLOS INCEB
 P.P.

415591

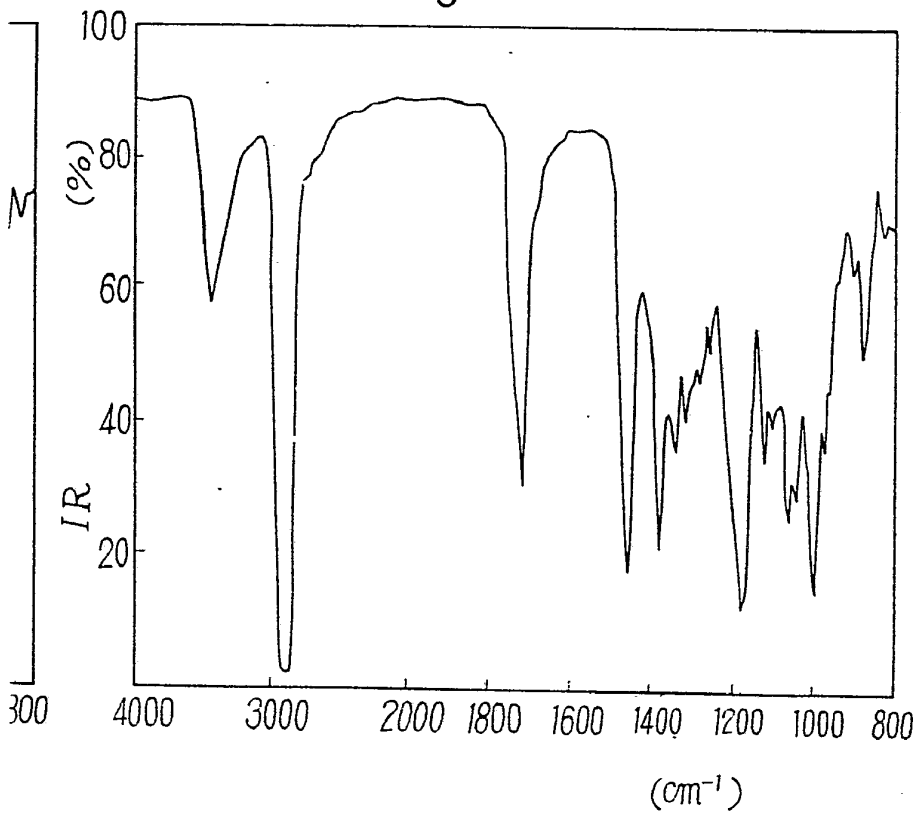
Fig. 11





415591

Fig.12



ESCALA VIGENTE
CARLOS ROSEB
P. P.

Fdez Francisco del Post



415591

415591

Fig. 13

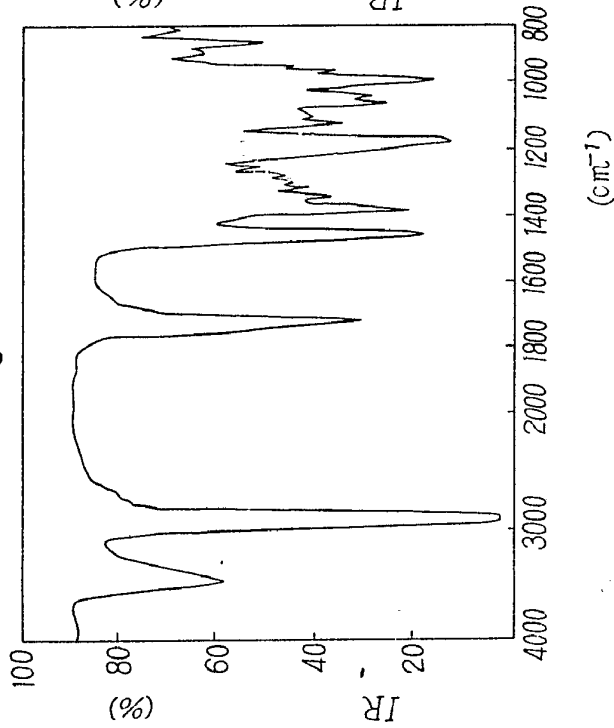
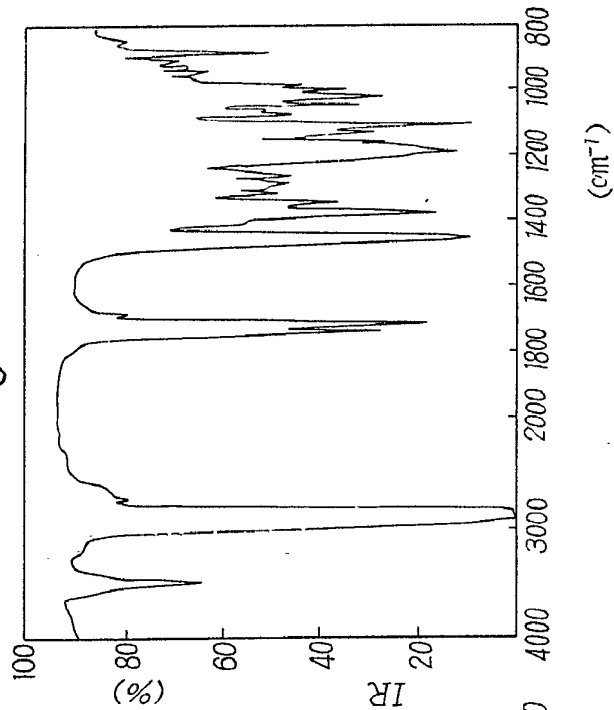


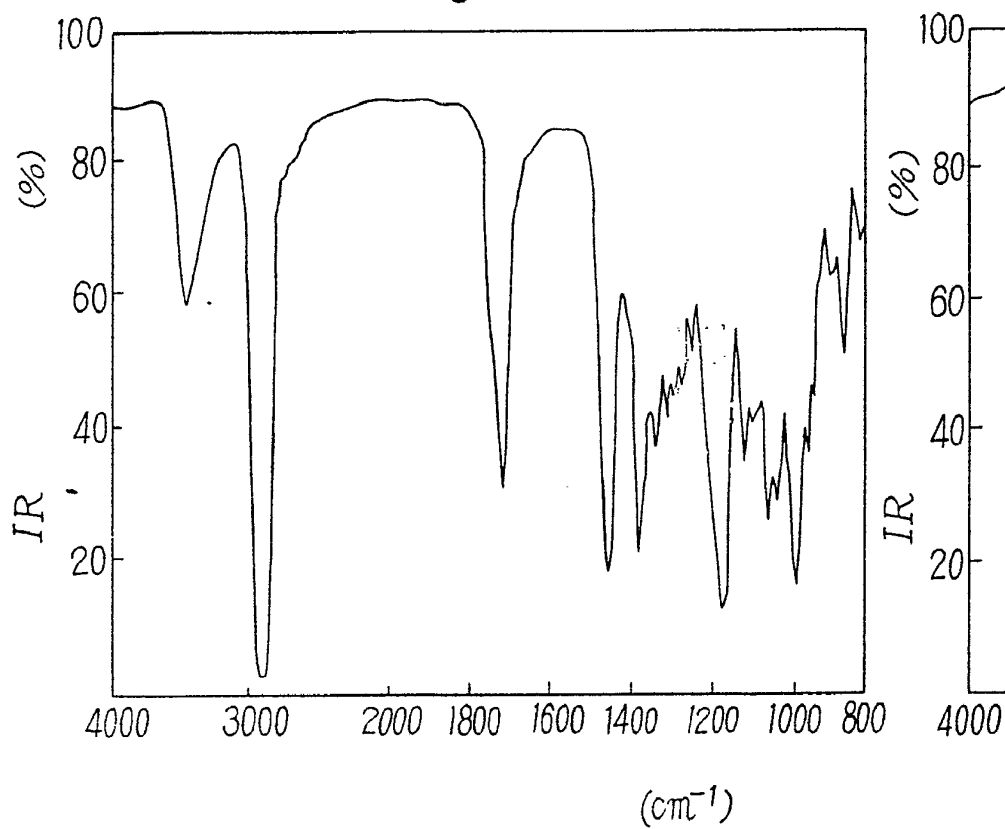
Fig. 14

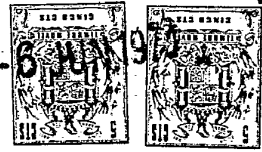


COPIA VALIDA
CARLOS ROEB
P. P.

415591

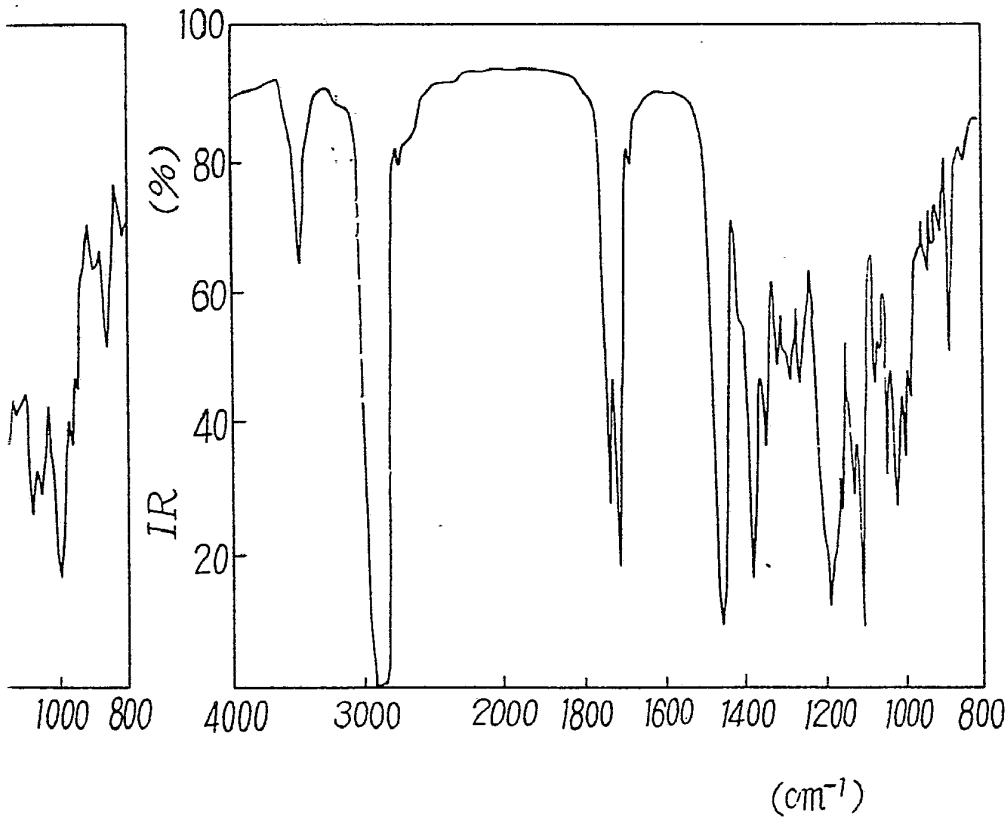
Fig. 13





415591

Fig. 14



ESQUEMA VARIABLE
CARLOS ROEB
R. P.

415591



415591

Fig. 15

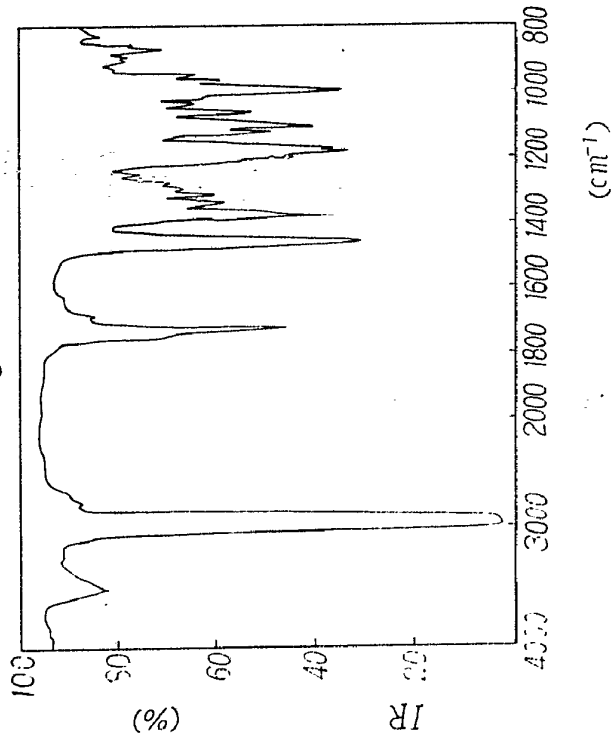
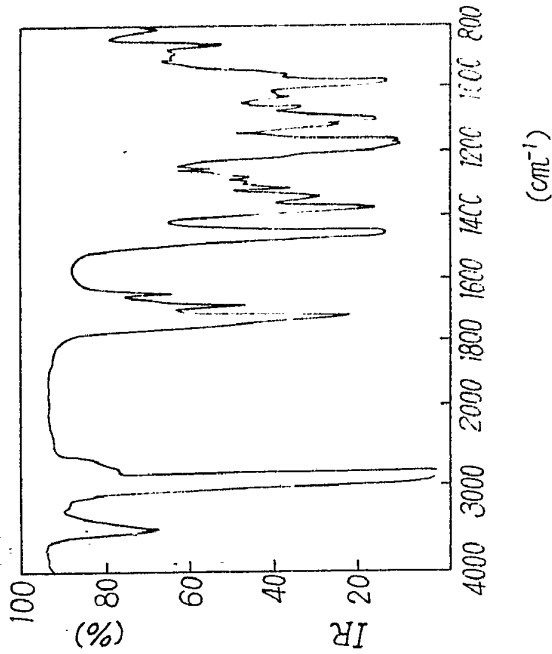


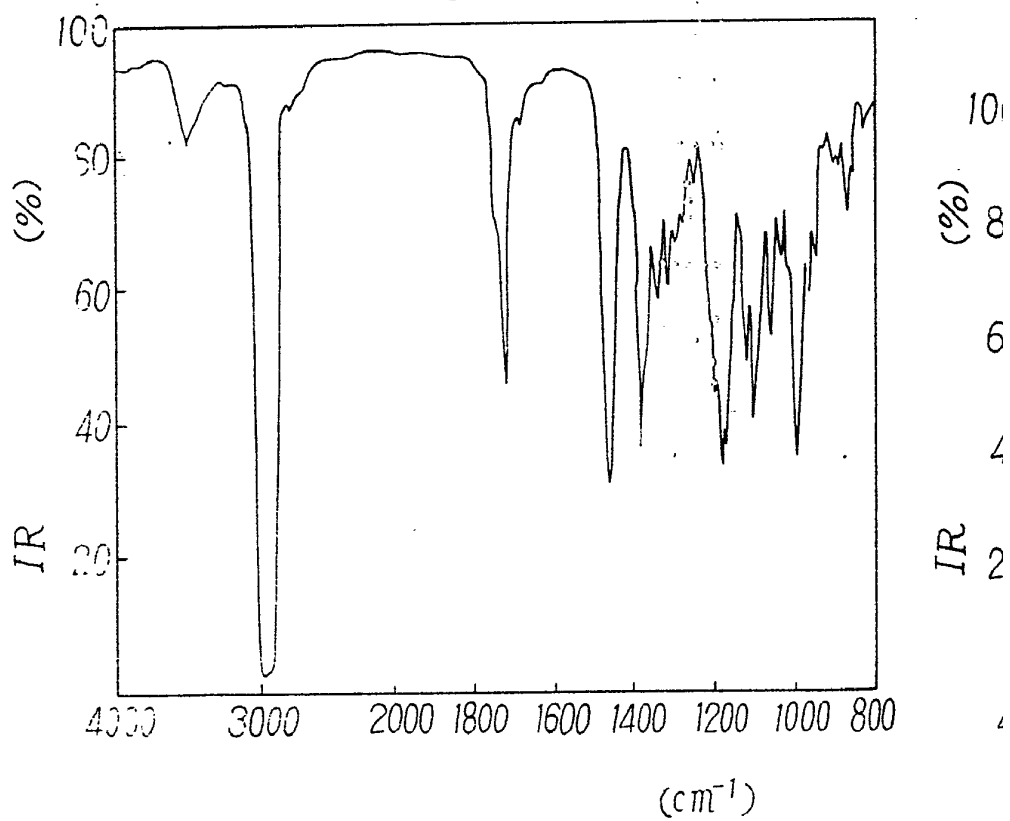
Fig. 16



ESCOLA VARIADLE
 CARLOS ROSS
 H.P.

415591

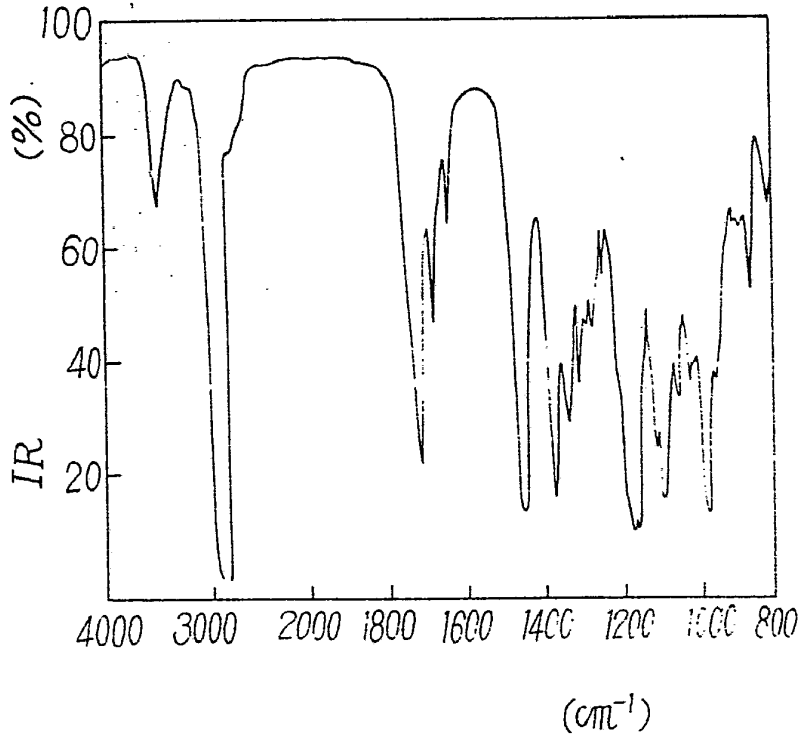
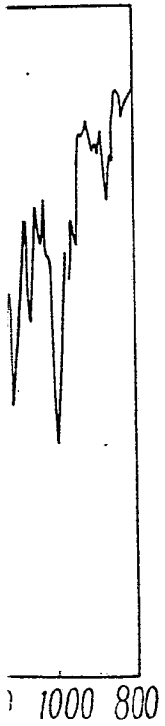
Fig. 15





415591

Fig. 16



ESCOLA VARIABLE
CARLOS ROEB
F. P.



415591

415591

Fig. 17

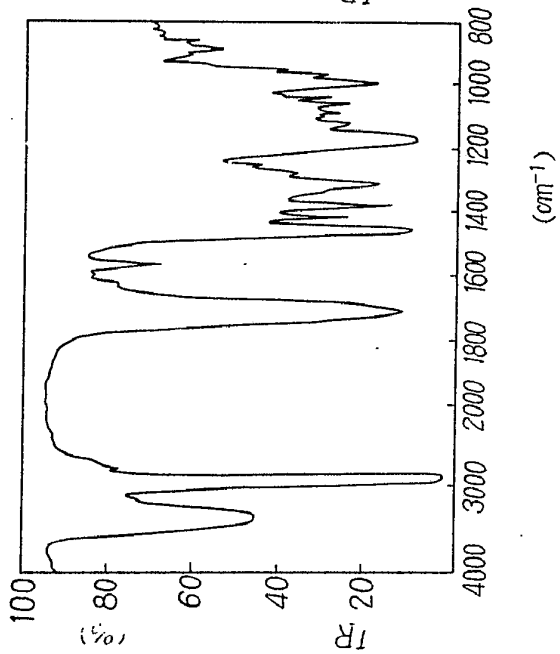
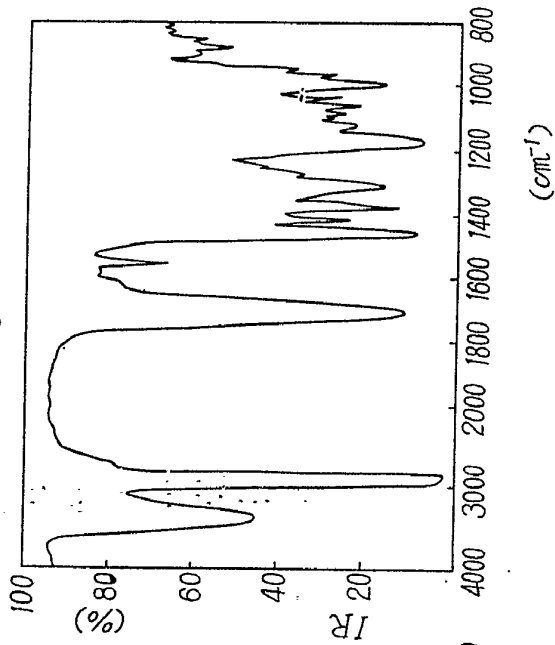


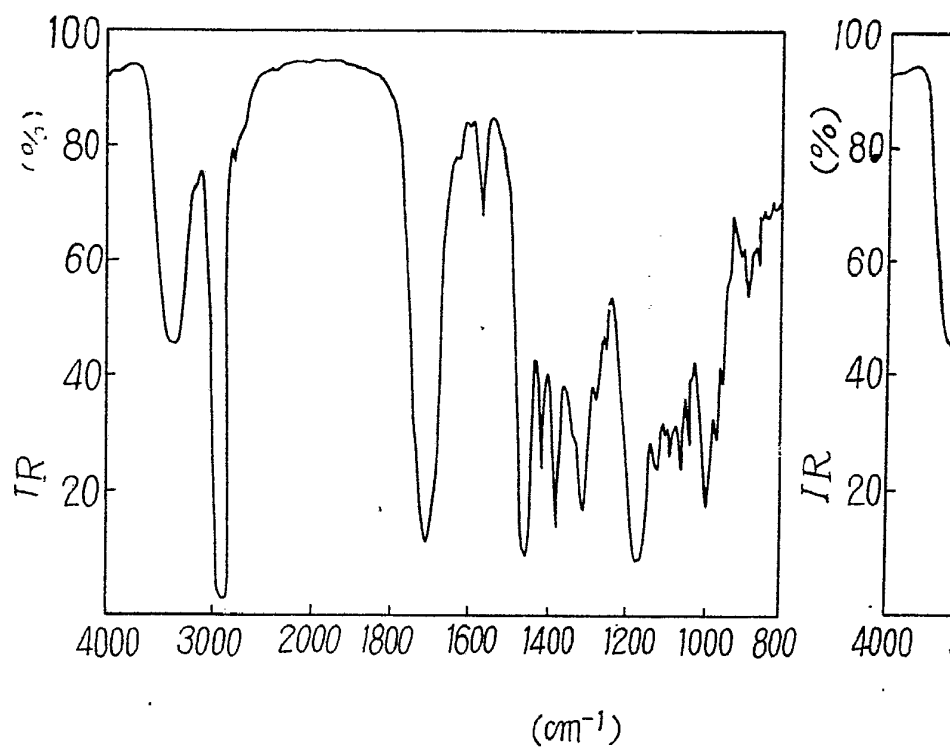
Fig. 18



EDGILIA VARGAS
 CARLOS ROEB
 P. P.

415591

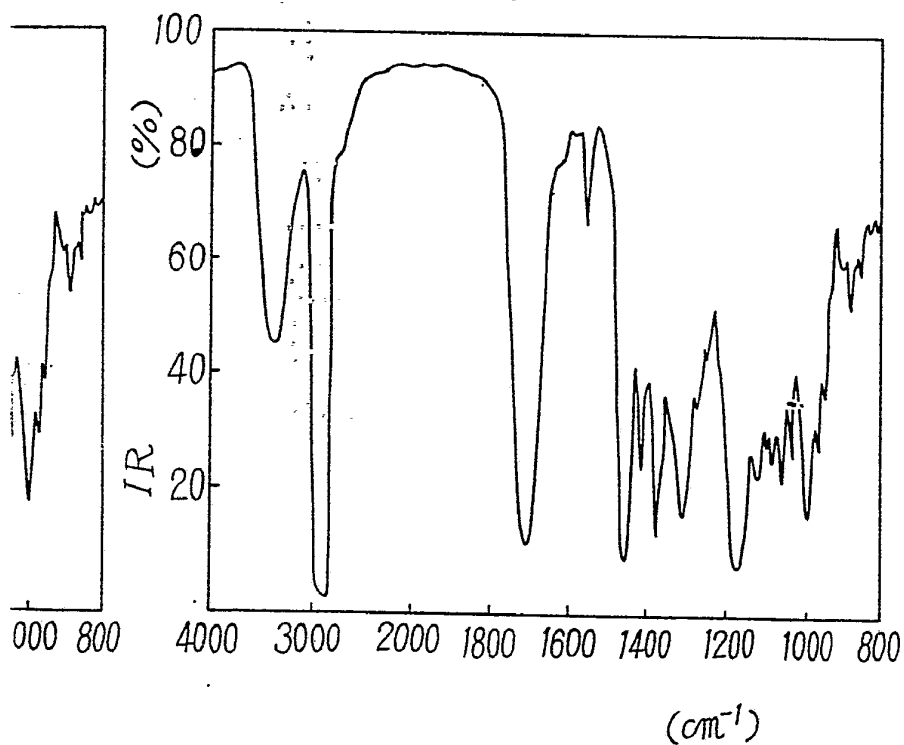
Fig. 17





415591

Fig. 18



ESCALA VARIABLE
CARLOS ROEB
P. P.



415591

415591

Fig 19

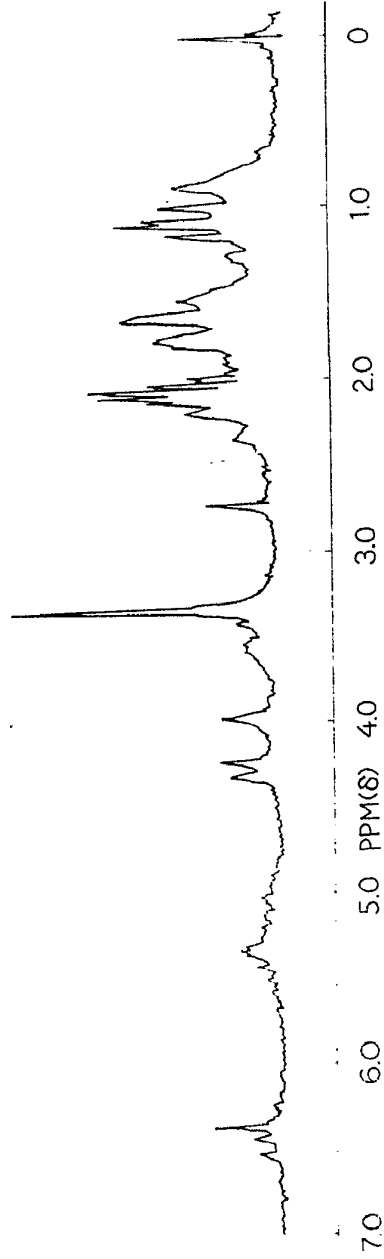
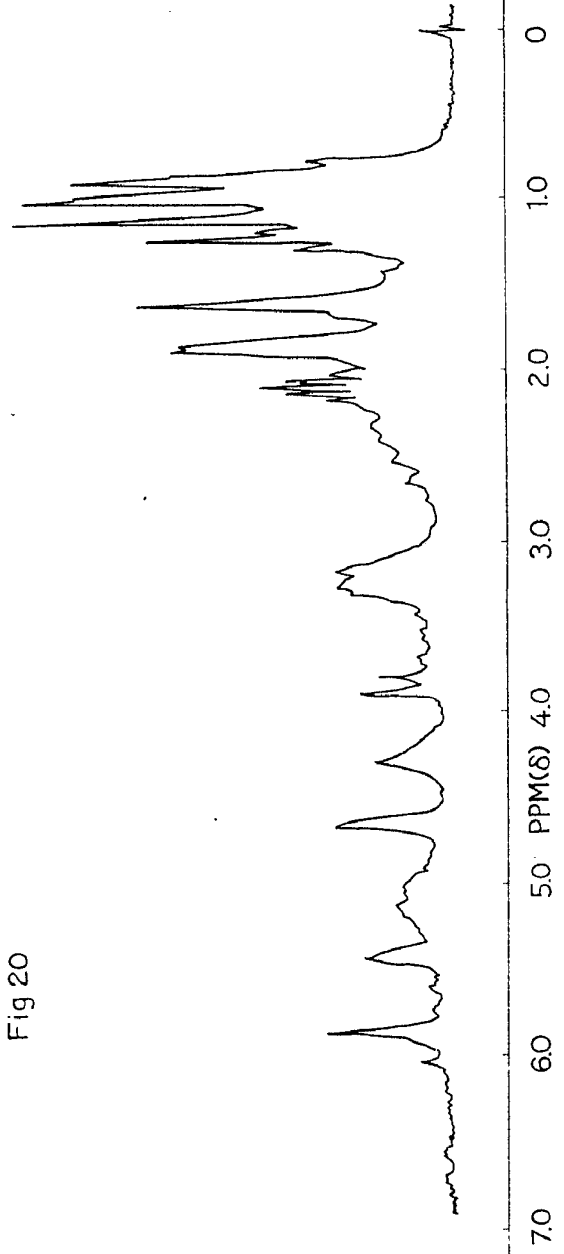


Fig 20



RECEIVED
CARLOS ROEB
P.P.

[Handwritten signature]

Fig 19

415591

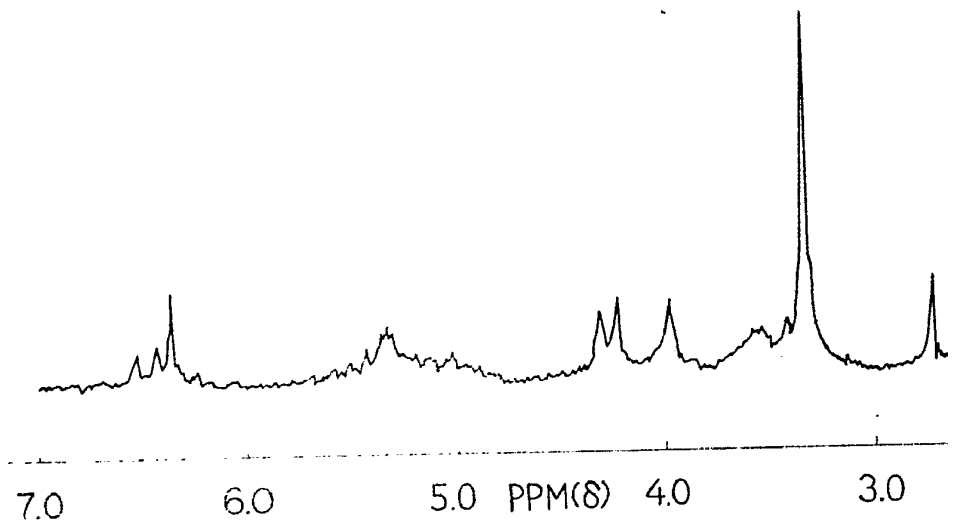
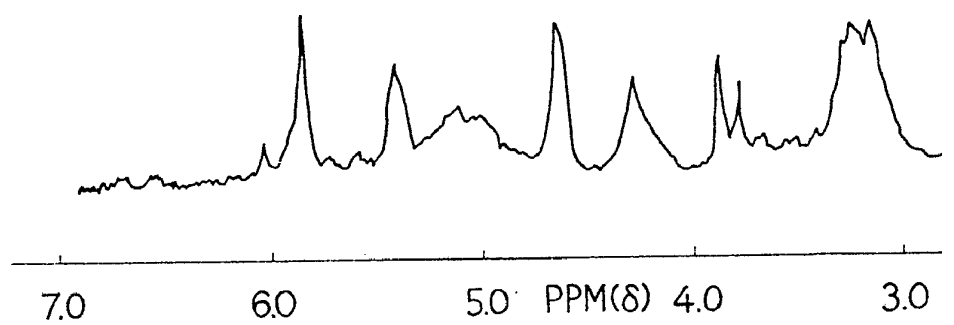
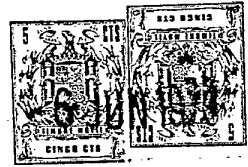
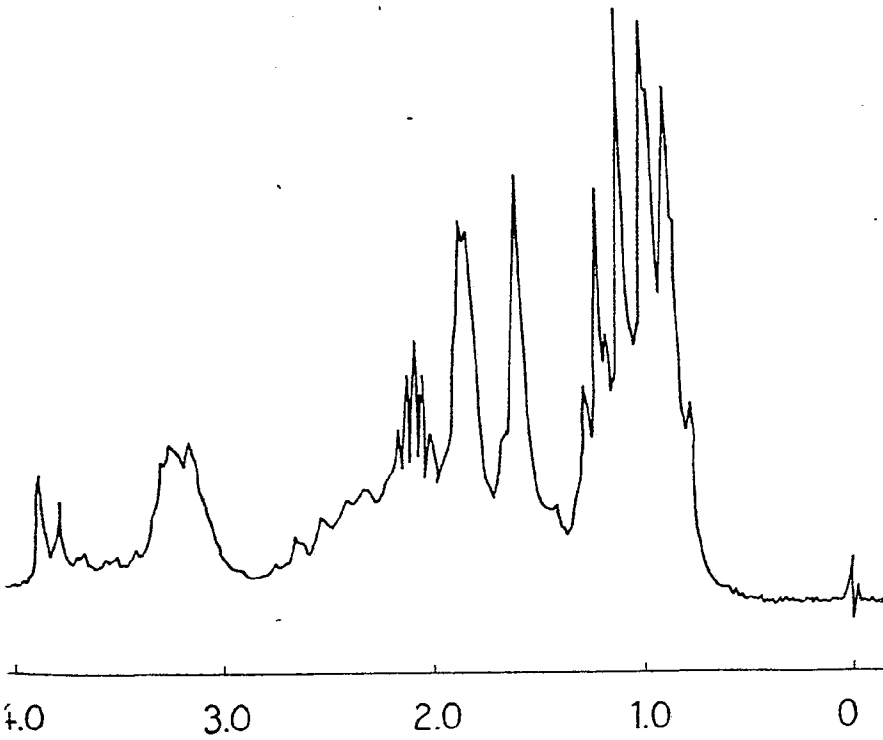
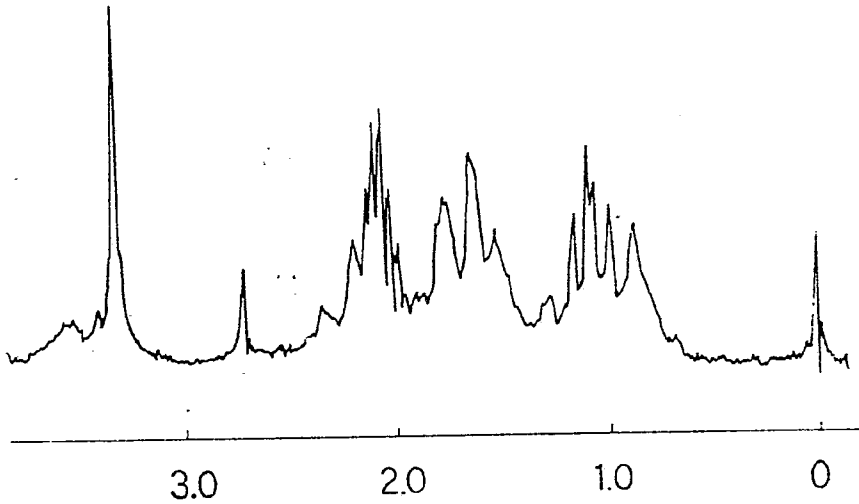


Fig 20





415591



ESBILA VARIADLE
CARLOS ROEB
P. P.



415591

Fig 21

415591

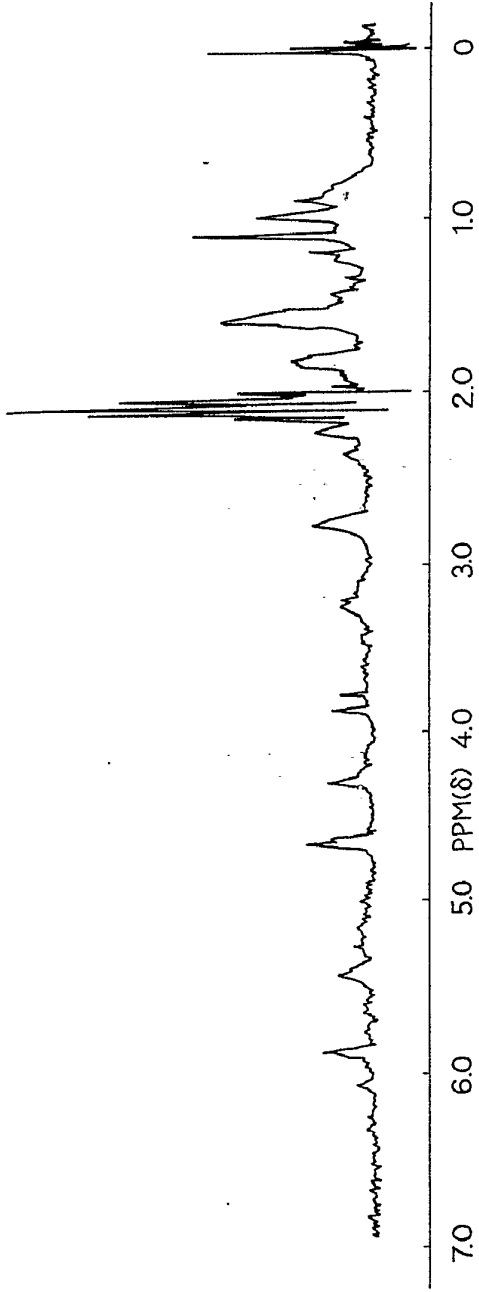
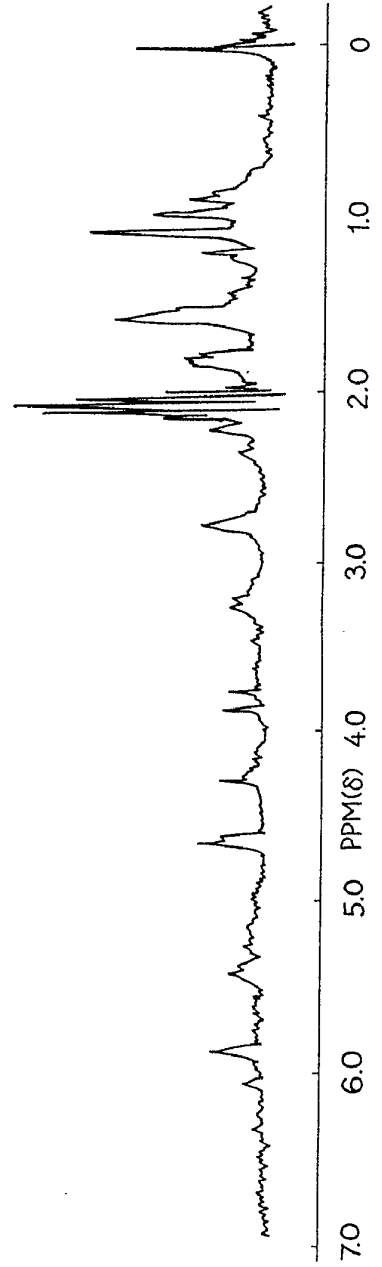


Fig 22



LABORATORIO
CARLOS ROES
S.A.

[Handwritten signature]

415591

Fig 21

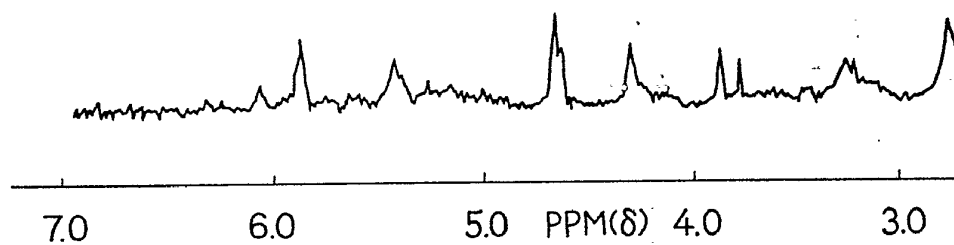
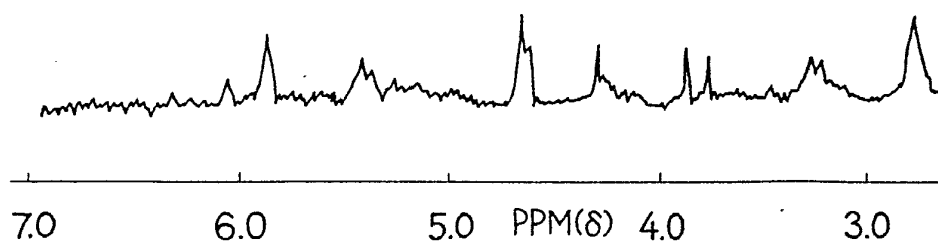
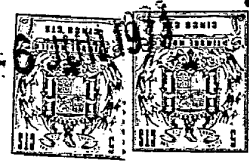
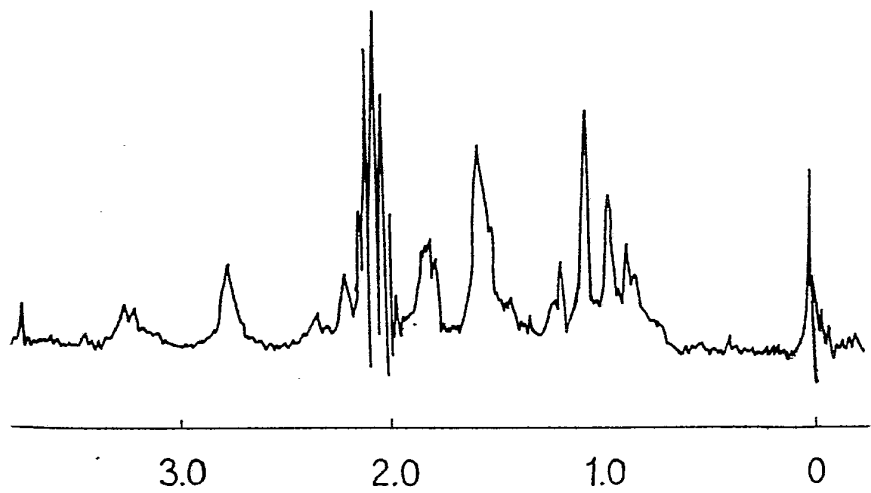
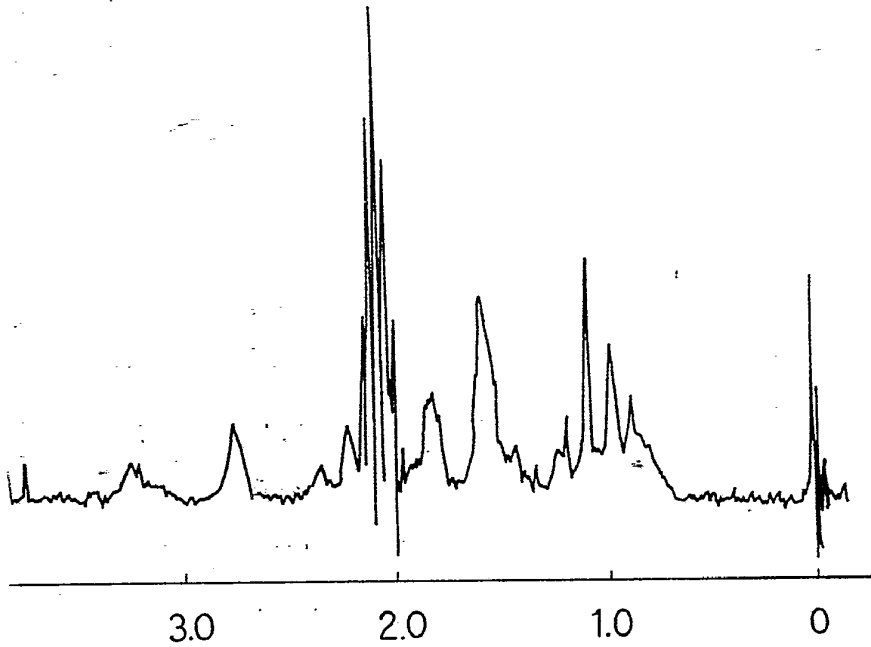


Fig 22





415591



~~ECUENA VARIABLE~~
CARLOS ROEB
P.B.

Fdo. Francisco del Pozo

Fig 23

4,0591

415591

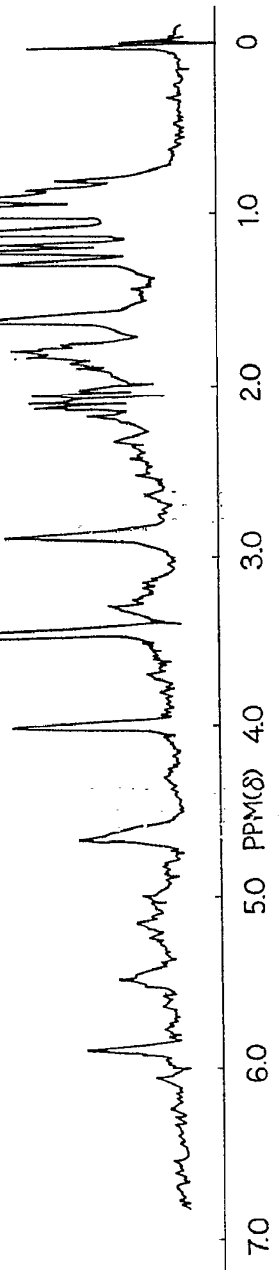
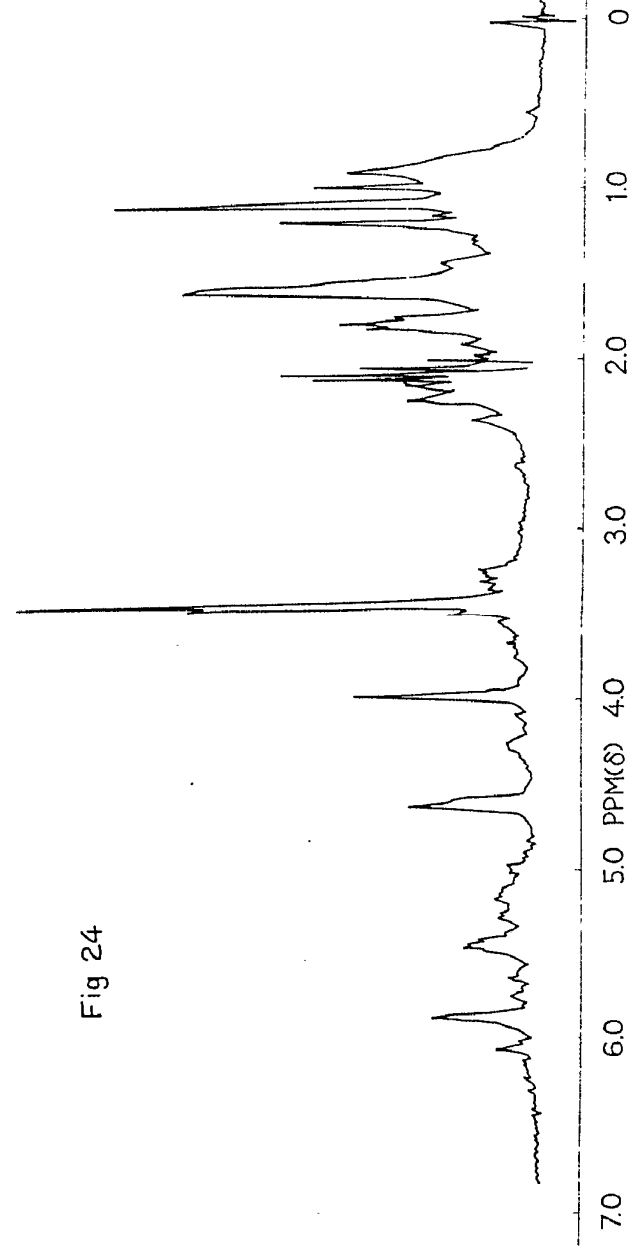


Fig 24



EQUADOR VERONABLE
CARLOS ROSE
P.P.

Fig 23.

4.5591

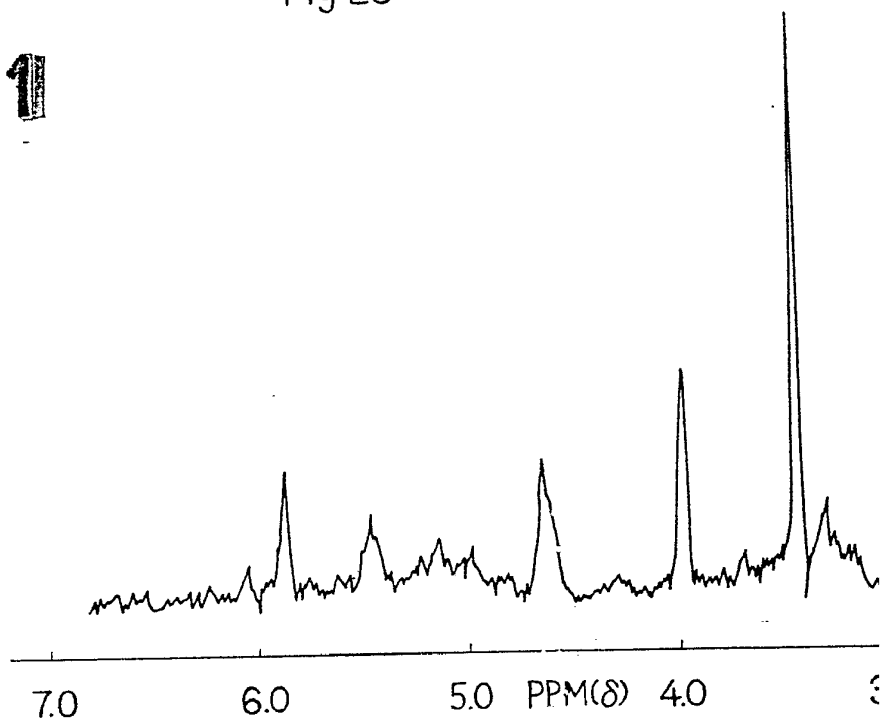
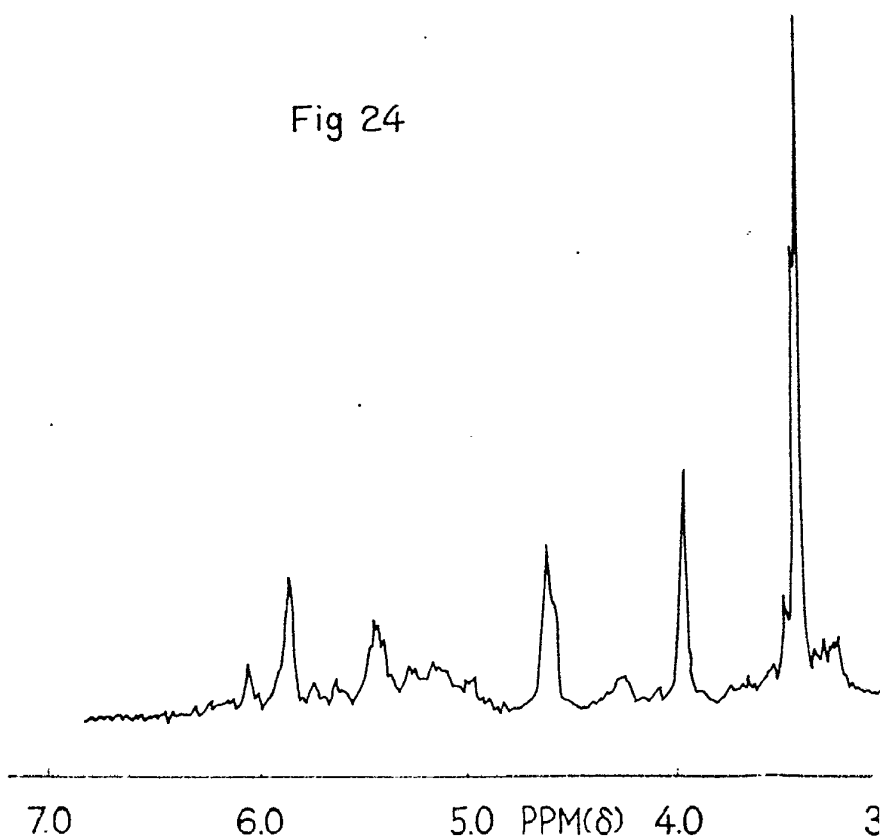
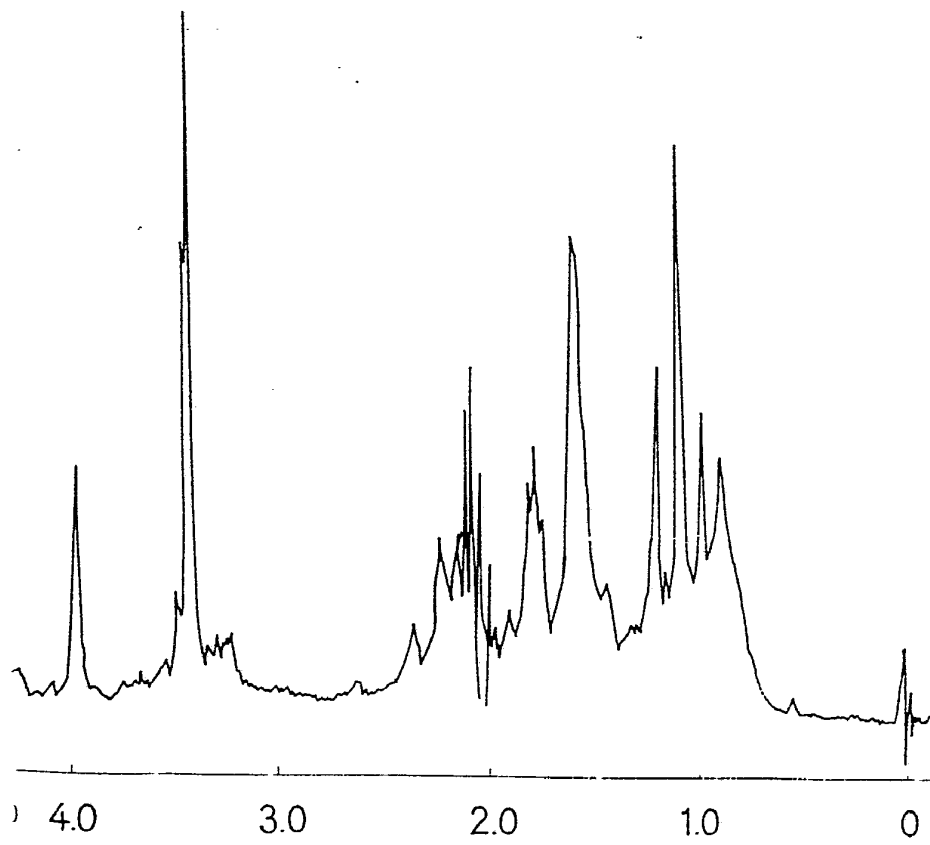
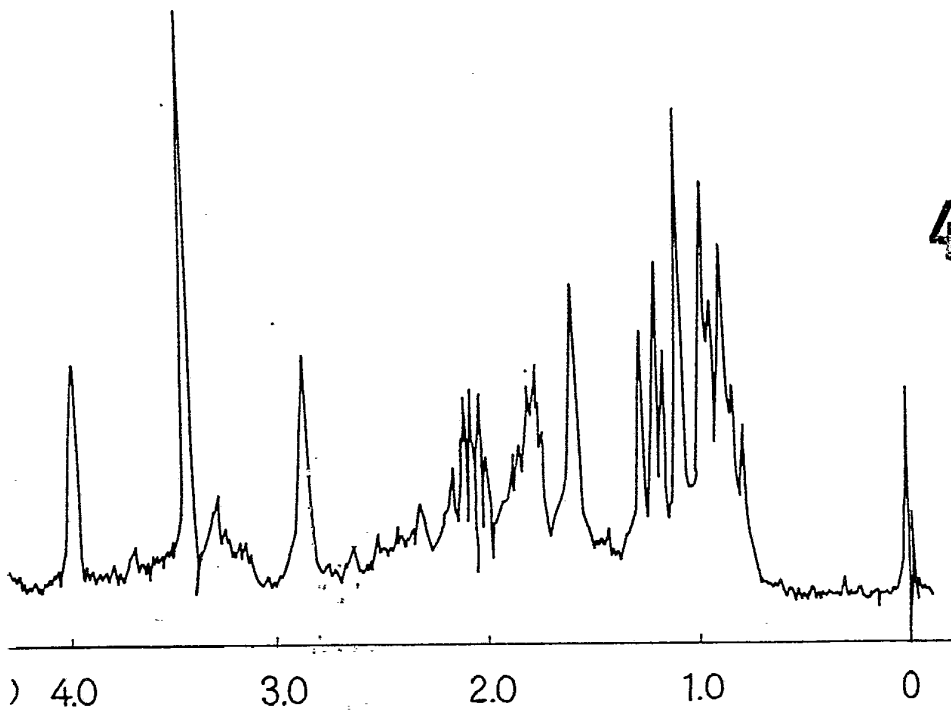


Fig 24





415591



ESCALA VARIABLE
CARLOS ROEB
P. P.

Sankyo Company Limited.



415591

415591

Fig 25

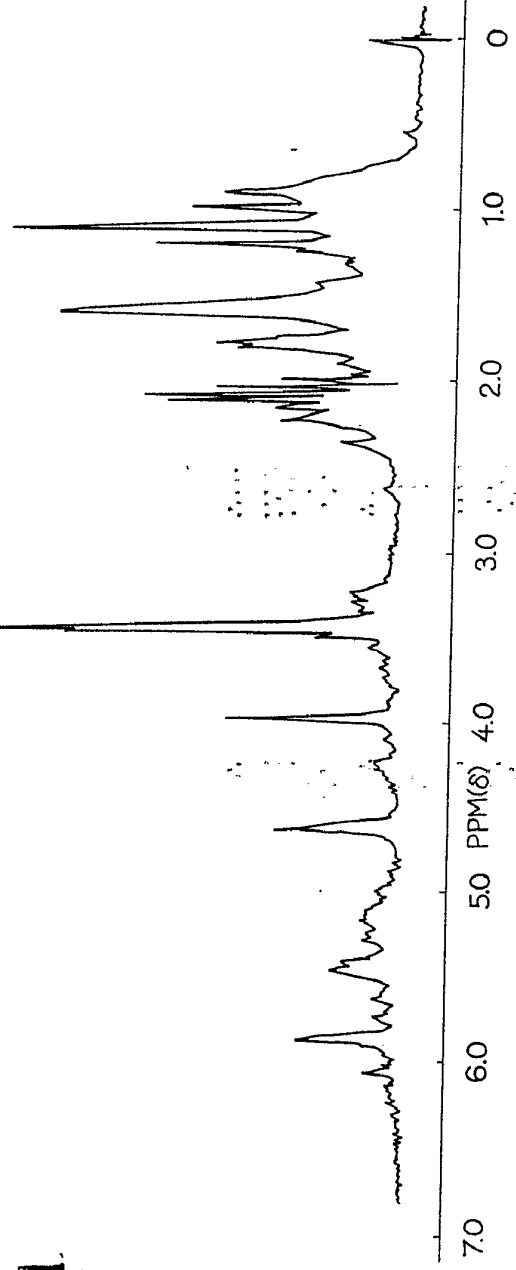
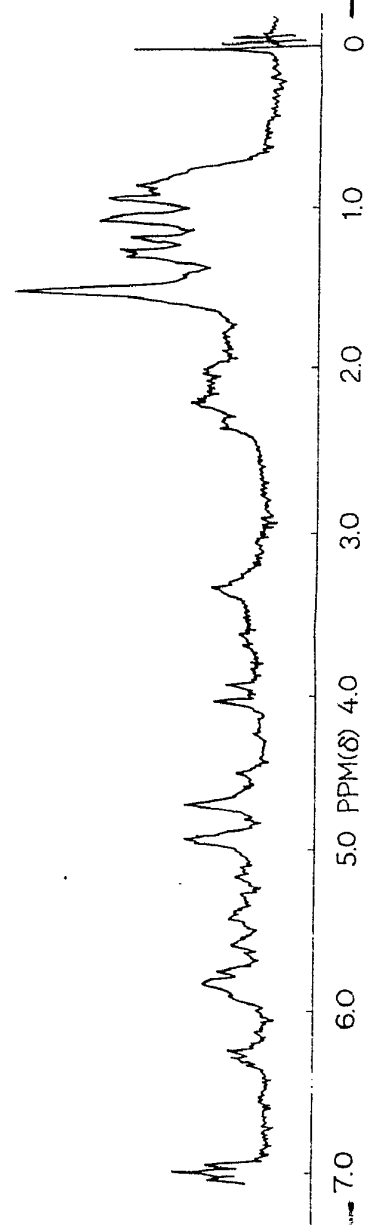


Fig 26



ANGEL VARGAS
CARLOS ROEB
P. P.

Fdn.: Francisco del P...

Fig 25

415591

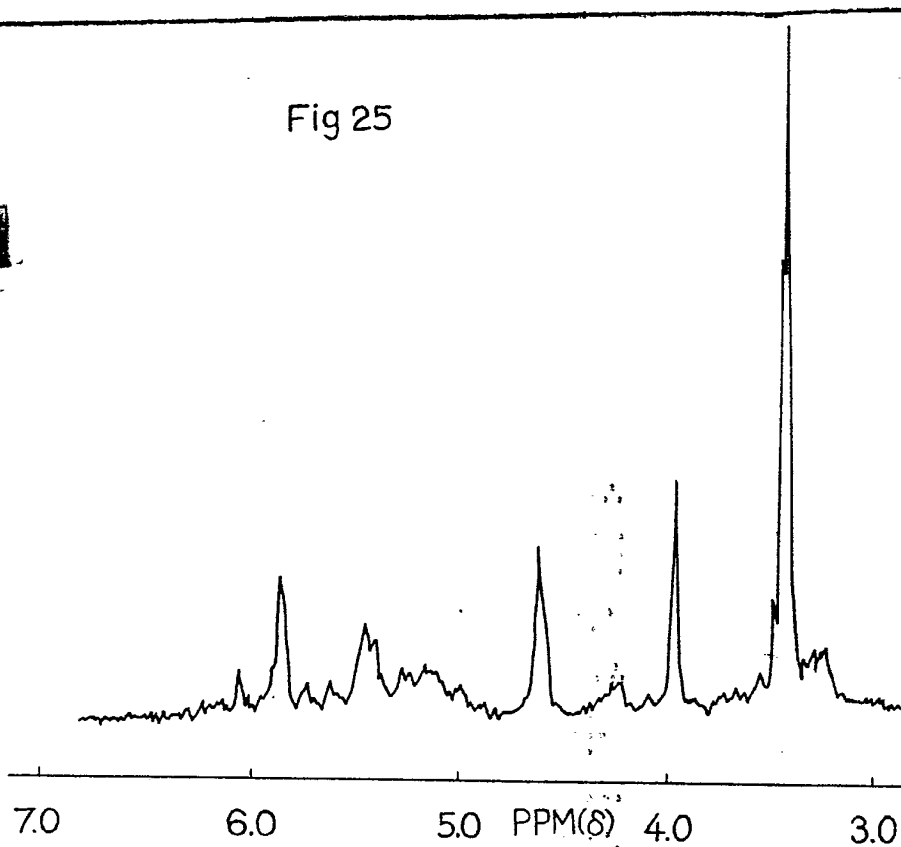
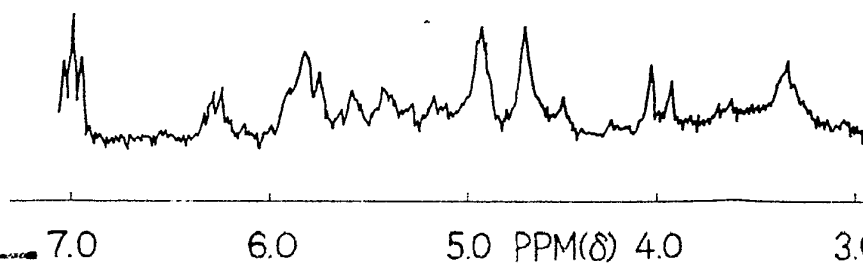
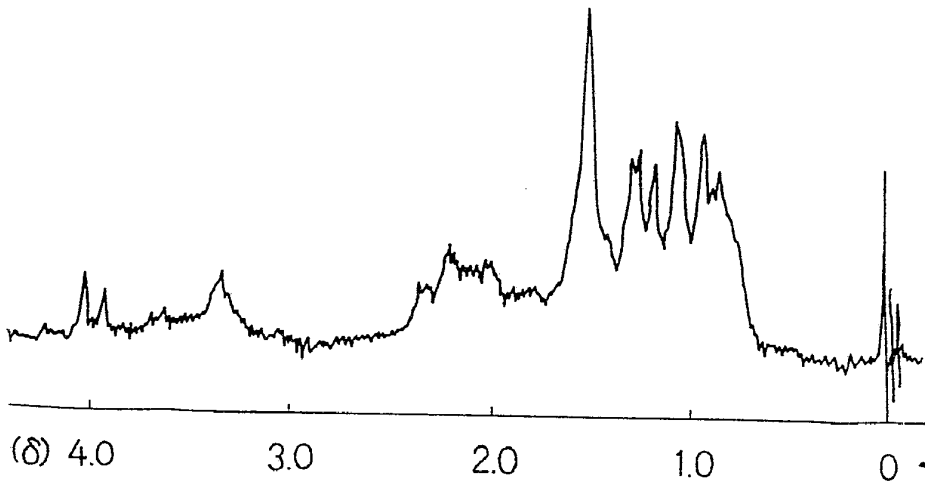
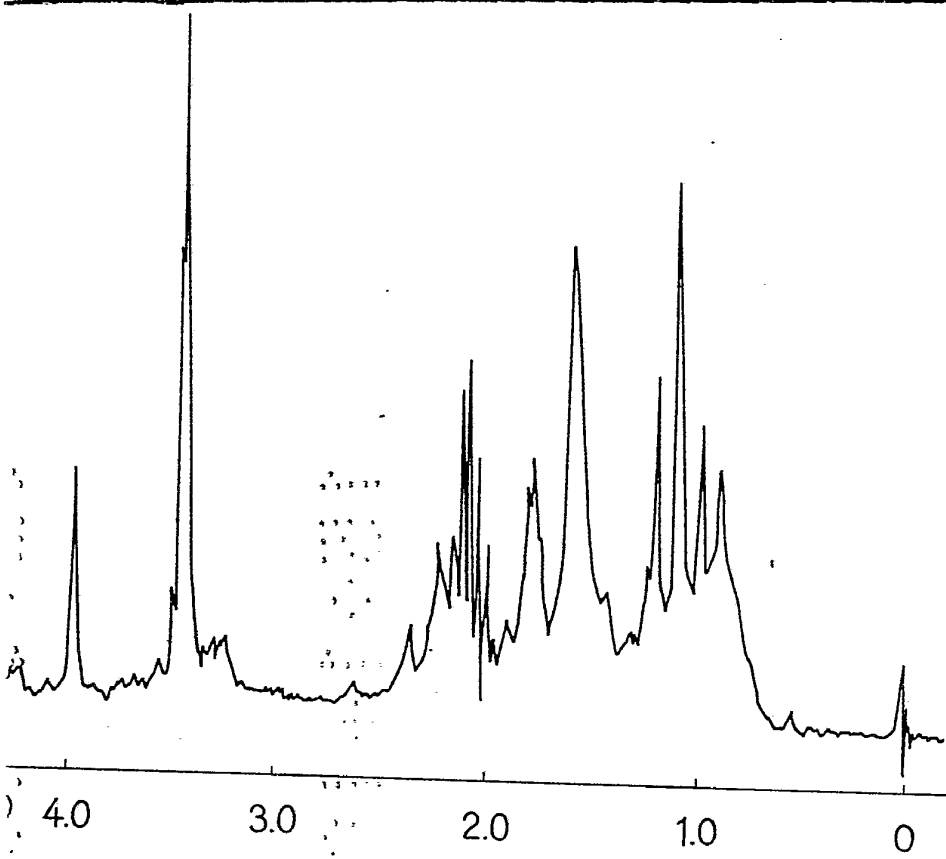


Fig 26





415501



COPIA VARIABLE

CARLOS ROEB
P. P.

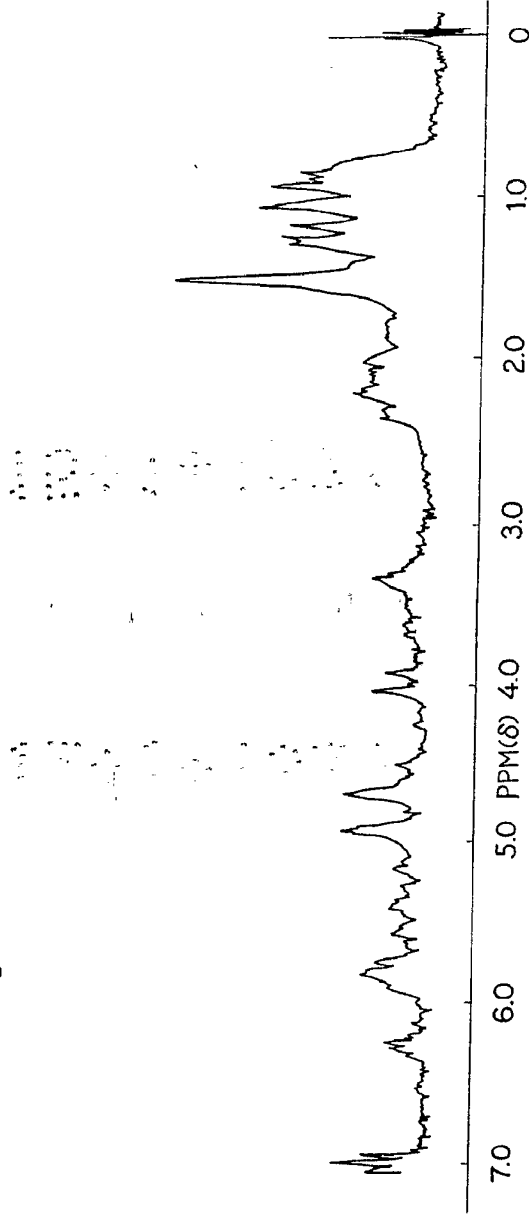
Fdo.: Francisco del Pez

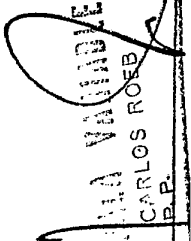


415591

415591

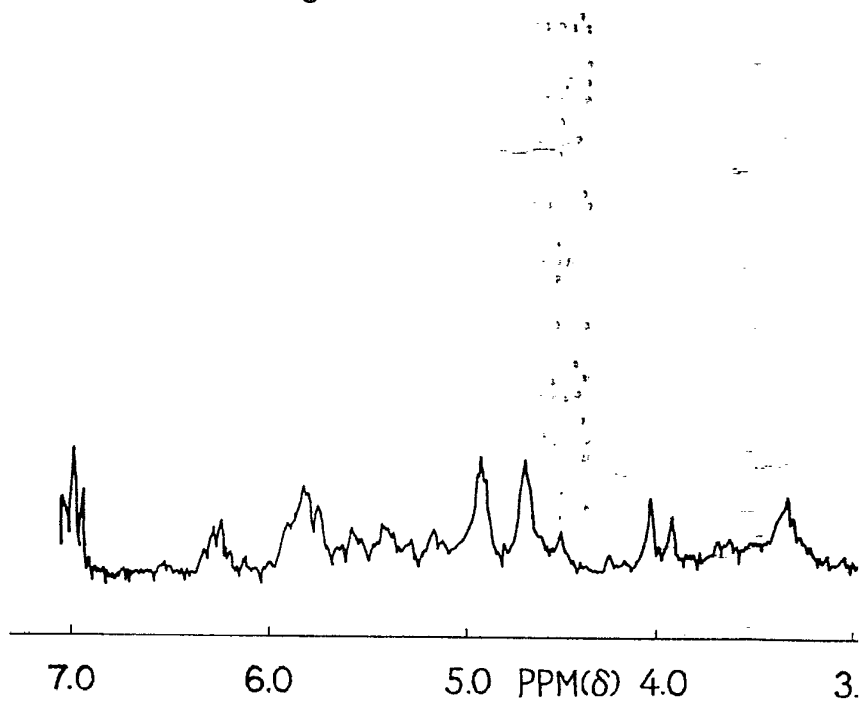
Fig 27




 ROSALBA VARGAS
 CARLOS ROEB
 P.P.

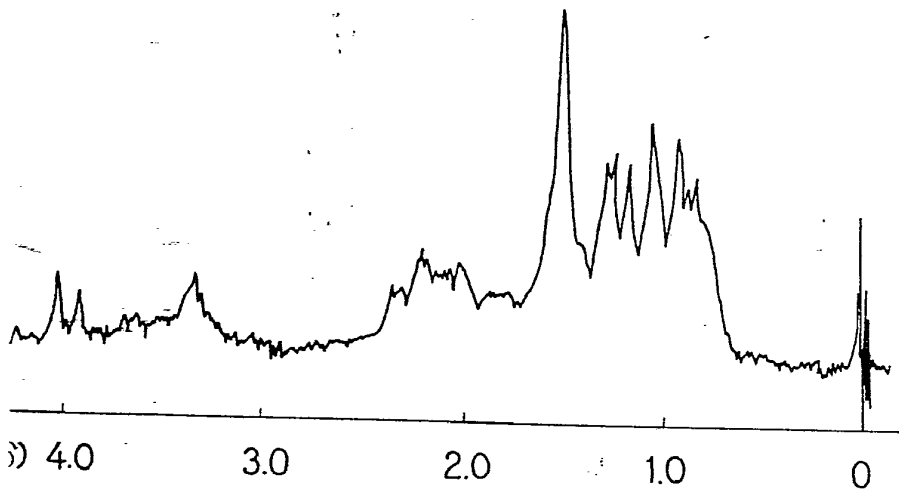
415591

Fig 27





415591



BOHIA VARIABLE
CARLOS ROEB
P.P.