



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



①① Número de publicación: **2 092 958**

②① Número de solicitud: 9500061

⑤① Int. Cl.⁶: C07C 233/47
A61K 31/16

①②

PATENTE DE INVENCION

B1

②② Fecha de presentación: **10.01.95**

④③ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.96**

Fecha de concesión: **27.06.97**

④⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **01.08.97**

④⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.08.97

⑦③ Titular/es: **Laboratorios Miret, S.A.**
Pol. Ind. Can Parellada C. D'Hercules 18
Les Fonts-Terrassa, Barcelona, ES

⑦② Inventor/es: **Contijoch Mestres, Agustín;**
Infante Martínez-Pardo, M. Rosa y
Erra Serrabasa, Pilar

⑦④ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

⑤④ Título: **Procedimiento para la síntesis de tensioactivos catiónicos derivados de la condensación de ácidos grasos con aminoácidos de carácter básico esterificados y su aplicación como agentes antimicrobianos.**

⑤⑦ Resumen:

Procedimiento para la síntesis de tensioactivos catiónicos derivados de la condensación de ácidos grasos con aminoácidos de carácter básico esterificados, y su aplicación como agentes antimicrobianos.

El procedimiento comprende una primera etapa de esterificación de un aminoácido y se caracteriza por el hecho de que en una segunda etapa tiene lugar la condensación de un cloruro de ácido graso con un derivado de aminoácido esterificado.

Se refiere a la síntesis de compuestos tensioactivos de tipo catiónico constituidos por aminoácidos de carácter básico naturales (y cualquiera de sus homólogos) modificados convenientemente con el objeto de conseguir productos con aplicaciones específicas como agentes antimicrobianos (biocidas).

Se utilizan medios de reacción y catalizadores no tóxicos y se obtiene un producto final exento de impurezas.

El coste es reducido debido a la utilización de primeras materias más económicas e instalaciones más simples.

ES 2 092 958 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Procedimiento para la síntesis de tensioactivos catiónicos derivados de la condensación de ácidos grasos con aminoácidos de carácter básico esterificados y su aplicación como agentes antimicrobianos.

5 La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de obtención de productos tensioactivos catiónicos, cuya parte hidrófila está constituida por un aminoácido de carácter básico esterificado y su parte hidrófoba consiste en un ácido graso unido al grupo α -amino del aminoácido a través de un enlace amida.

10 Antecedentes de la invención

La aplicación de compuestos tensioactivos catiónicos como agentes antimicrobianos ha sido extensamente estudiada.

15 Como antecedentes de la presente solicitud de patente pueden citarse las siguientes patentes: JP 7416005; JP 7505350; JP 723571; JP 7783942; JP 73118516; JP 8153280; GB 1352420, y, US 3985722.

20 Existen antecedentes de aplicación de compuestos de naturaleza semejante en campos tales como cosmética (ver patente GB 1352420), dentífricos (JP 51023571) y acondicionadores del cabello (GB 2140297).

25 En las patentes EP 320 976 y GB 1352420 se describe la síntesis de compuestos semejantes a los obtenidos en el procedimiento de la invención (tales como sales de pirrolidin carboxilato). El procedimiento de síntesis se realiza siguiendo un orden y unas condiciones de reacción determinados: condensación del ácido graso sobre el aminoácido en un medio organo-acuoso, posterior esterificación del N-acil-aminoácido con el alcohol correspondiente saturado con ácido clorhídrico y final formación de sal con pirrolidin carboxilato.

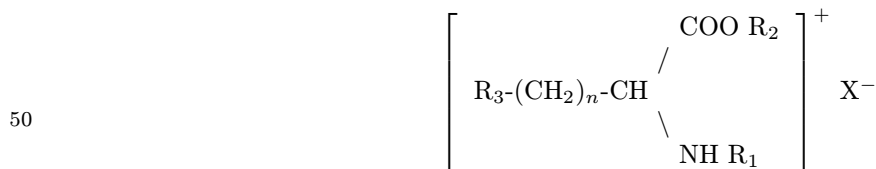
30 En la patente US 3985722 el reactivo acilante es una mezcla del ácido graso y anhídrido sulfúrico, realizándose la reacción en presencia de trietanolamina.

35 En la patente ES 512643 la preparación de los compuestos objeto de la presente solicitud comprende una primera etapa de esterificación y una segunda etapa de condensación de un derivado de aminoácido esterificado con un ácido graso, utilizando directamente el ácido graso sin derivatizar y empleando dicitohexilcarbodiimida como agente de condensación.

Descripción de la invención

40 Es objeto de la presente invención preparar con buen rendimiento y pureza, tensioactivos catiónicos derivados de aminoácidos de carácter básico, a partir de materias primas y catalizadores no tóxicos, minimizándose el coste energético y obteniéndose un producto final libre de impurezas, con aplicaciones específicas como agentes antimicrobianos.

45 La presente invención está relacionada con la preparación de moléculas que responden a la fórmula:



donde:

55 X^- : puede ser Br^- , Cl^- , HSO_4^-

R_1 : es una cadena alquílica lineal de un ácido o hidroxiácido graso saturado de 8 a 14 átomos de carbono, unido al grupo α -amino del aminoácido a través de un enlace amídico.

60 R_2 : puede ser un resto alquílico lineal o ramificado de 1 a 12 átomos de carbono o aromático.

R_3 : puede ser

- NH₃



20 pudiendo variar n desde 0 hasta 4

Los materiales de partida utilizados pueden ser:

- aminoácidos de calidad técnica.
- cloruros de ácidos grasos de calidad técnica.
- agua desionizada.
- sosa y ácido clorhídrico de calidad técnica.

El procedimiento a que se refiere esta patente consta básicamente de dos etapas.

1a.- Esterificación del grupo carboxílico del α -aminoácido con alcoholes C₁-C₁₂, lineales, ramificados o aromáticos, utilizando como reactivo cloruro de tionilo, y aprovechando el calor de reacción para llevarlo a cabo.

2a.- Condensación de la cadena alquímica lineal de ácido graso C₈-C₁₄ al grupo α -amino a partir del cloruro de ácido correspondiente en un medio acuoso alcalino.

En la etapa de esterificación del ácido carboxílico de un α -aminoácido se puede utilizar cualquier aminoácido comercial, siendo de preferencia los aminoácidos de carácter básico, en particular la L(+) arginina.

La segunda etapa de condensación del cloruro de ácido graso o del hidroxiaácido con el éster del aminoácido se efectúa en un medio acuoso alcalino sin necesidad de la utilización de ningún solvente orgánico. Dicha condensación se lleva a cabo a un pH alcalino, con preferencia a un pH comprendido entre 8 y 10.

El pH alcalino se consigue por adición al medio acuoso de un hidróxido de metal alcalino, preferiblemente sodio o potasio.

Una vez efectuada la condensación se recupera el producto mediante centrifugación del producto precipitado después de ajustar el medio a un pH prácticamente neutro, preferiblemente a un pH comprendido entre 6 y 7, por adición de un ácido inorgánico, preferiblemente ácido clorhídrico.

Preferentemente, en el procedimiento de la invención la esterificación del aminoácido con alcoholes C₁ - C₁₂, en particular etanol, tiene lugar añadiendo cloruro de tionilo sobre una suspensión de arginina en alcohol preparada a temperatura ambiente.

El procedimiento de la invención difiere de los procedimientos anteriores tanto en la etapa de esterificación como en la etapa de condensación.

En la etapa de esterificación se utilizan los mismos reactivos y el mismo catalizador que en la patente ES 512643, pero la secuencia de la reacción es distinta. No se mezclan simultáneamente los reactivos (arginina y etanol) con el catalizador (cloruro de tionilo) sino que se añade el catalizador posteriormente a los reactivos. De este modo, la reacción de la invención es exotérmica, con lo cual se aprovecha el calor desprendido con el correspondiente ahorro energético durante esta fase del proceso.

En la etapa de condensación los componentes son distintos. Así, por ejemplo, en la patente ES 512643 se utilizan DMF (dimetilformamida), dicitclohexilcarbodiimida y un ácido graso, mientras que en la invención se utilizan agua, sosa y un cloruro de ácido graso. Se trata, pues, de una condensación del cloruro de ácido graso en medio acuoso, separándose el clorhidrato del derivado correspondiente.

Por lo tanto, el procedimiento de la invención es sustancialmente distinto de los procedimientos anteriores en cuanto a las materias primas y catalizadores no tóxicos utilizados y la exención de impurezas en los productos finales obtenidos, característica diferencial muy importante en cuanto elimina las interferencias que dichas impurezas pueden producir en la aplicación final como agentes antimicrobianos. Debido a las materias utilizadas el costo del procedimiento también resulta menor y las instalaciones más simples.

La presente invención se refiere también a la aplicación de los productos obtenidos por el procedimiento citado como agentes antimicrobianos (biocidas).

Los productos descritos carecen de efectos irritantes dérmicos y de actividad ulcerogénica gástrica significativa, no son mutagénicos (según test de Ames) a las dosis habituales de uso en sus campos de aplicación y presentan valores de DL_{50} por vía oral superiores a 2000 mg/kg. (La DL_{50} es una forma de expresar la toxicidad de cualquier producto y se define como la dosis mínima, expresada en mg de producto ensayado por kg del animal experimentado, que produce la muerte del 50% de los animales objeto del ensayo).

Los productos descritos son capaces de formar agregados supramoleculares de tipo micelas, cristales líquidos, emulsiones y microemulsiones en sistemas binarios, ternarios, cuaternarios, cuya tecnología es aplicable a muchos campos industriales tales como la cosmética, la dermofarmacia o la alimentación.

Ejemplos

A continuación se detallan varios ejemplos:

Uno de obtención y cuatro de aplicación: dos en la industria cárnica y dos en la cosmética.

Ejemplo I

Describiremos el proceso de obtención a escala de laboratorio de un producto concreto: el monoclóridato de la lauramida del éster etílico de la L (+) Arginina.

Como se ha mencionado en la memoria el proceso consta de dos etapas.

Primera etapa

Preparación del diclorhidrato del éster etílico de la L (+) Arginina.

En un reactor de vidrio de 2 litros de capacidad con tapa de cinco bocas y provisto de agitación mecánica, condensador de reflujo, entrada de nitrógeno gas, embudo de adición y termómetro, se suspende 1 equivalente de L (+) Arginina clorhidrato en 200 ml. de alcohol etílico básicamente exento de agua, a temperatura ambiente, y se conecta la agitación.

Acto seguido se añade gota a gota, y durante un período de dos horas, 1,3 equivalente de cloruro de tionilo, manteniendo el reflujo por calefacción. Cuando la mezcla llegue a la temperatura de ebullición se agita durante tres horas más, finalizadas las cuales se elimina el disolvente evaporándolo a presión reducida repetidas veces, con previas adiciones de etanol seco.

Segunda etapa

Preparación del monoclóridato de la lauramida del éster etílico de la L(+) Arginina.

ES 2 092 958 B1

Se disuelve en agua el crudo de la reacción anterior, se neutraliza con hidróxido sódico acuoso, y posteriormente se lleva a pH 8-10 en el cual se mantiene durante el resto de la reacción, mientras que se añaden, gota a gota, 1,1 equivalente de cloruro de lauroilo, manteniendo la temperatura de la mezcla por debajo de 20°C por medio del adecuado baño refrigerante con etilenglicol.

Finalizada la adición se mantiene la agitación durante dos horas más, ajustando finalmente el pH a valores 6 - 7 con ácido clorhídrico. Finalmente se filtra el crudo de reacción, obteniéndose un sólido blanco de aspecto nacarado, de riqueza 80 - 85 % P/P sobre el producto inicialmente esperado.

Ejemplo II

Describiremos la aplicación del producto obtenido según el proceso descrito en el ejemplo I, como conservante en la industria cárnica, concretamente de jamón cocido.

Con la finalidad de evaluar la actividad antimicrobiana del producto obtenido según el proceso descrito en el ejemplo I, se ha efectuado un ensayo a escala industrial en una planta de fabricación de jamón cocido, según se explica seguidamente:

En un depósito de 100 l que contiene la salmuera de inyección para los jamones se adiciona el producto (monoclorhidrato de la lauramida del éster etílico de la L(+) arginina) en una cantidad tal que resulte una dosis de 29 de producto por 1000 g de jamón tratado.

Siguiendo los métodos industriales habituales se inyectan los jamones con dicha salmuera, se procede al masaje durante 48 horas con bombos al vacío y a una posterior cocción (a 69°C en el corazón de la pieza), tras lo cual se procede a su envasado. A partir de aquí se hace un estudio microbiológico durante cuatro meses, período durante el cual las piezas se han sometido a condiciones extremas de almacenaje.

La evaluación de la eficacia del producto como conservador de los jamones (por su efecto antimicrobiano) se ha llevado a cabo a través de ensayos microbiológicos determinándose el nivel de contaminación microbiana (en concreto bacteriana, en este caso) presente en las piezas.

El método de determinación es el de contaje de viales en placa determinándose bacterias aerobias mesófilas totales, enterobacteriaceas y microbiota heteroláctica.

Los resultados obtenidos al cuarto mes son los siguientes:

	UFC/g	
	S.C.	C.P.
<i>Aerobias mesófilas totales</i>	2·10 ⁵	1,5 ·10 ³
<i>Enterobacteriaceas</i>	3,5·10 ³	ausencia
<i>Heterolácticas</i>	1·10 ²	ausencia

(Los resultados se expresan en unidades formadoras de colonias (UFC) (bacterias) por gramo)

La columna marcada S.C. corresponde a producto sin conservante; a la marcada C.P. se le ha añadido el producto objeto del ejemplo a la dosis descrita.

De los resultados obtenidos se desprende claramente la eficacia del producto que rebaja notablemente el nivel del primer microorganismo citado (hasta niveles tolerables para una no putrefacción del jamón) y los elimina totalmente en los otros dos casos.

Ejemplo III

Este ejemplo consiste en la repetición del anterior ensayo inyectando los jamones con salmuera conteniendo el producto objeto del ejemplo II (columna C.P.) y, a título de comparación, en otro grupo de jamones, con salmuera conteniendo un conservante químico tradicional a base de sorbato potásico y p-hidroxibenzoato de propilo (columna CT).

Los resultados obtenidos son los siguientes:

ES 2 092 958 B1

		UFC/g	
		C.T.	C.P.
5	<i>Aerobias mesófilas totales</i>	1·10 ³	ausencia
	<i>Enterobactereáceas</i>	ausencia	ausencia
	<i>Neterolácticas</i>	ausencia	ausencia

de donde se desprende una mejor eficacia del producto propuesto sobre el conservante químico tradicional utilizado como referencia. Ello abunda sobre la bondad del producto propuesto dadas además sus características de inocuidad.

Nótese que el valor absoluto de los contajes puede variar de un ensayo a otro debiendo tenerse en cuenta las tendencias.

15 Ejemplo IV

Describiremos la aplicación del producto en la industria cosmética, concretamente su uso como conservante en la preparación de un champú.

20 Se prepara, a nivel de laboratorio, una cantidad (5 Kg) de champú, siguiendo una formulación clásica, expresada en % p/p:

25	Lauril sulfato sódico al 25%	30%
	Dietanolamida láurica	5%
	Conservante (el mismo de los ej. I y II)	0,04 - 0,05%
	Agua desionizada	hasta 100%

(no se incluye perfume ni colorante pues no inciden en el proceso de conservación).

30 Se prepara otra cantidad análoga de champú con la misma fórmula pero sin conservantes para utilizarlo como referencia.

35 La actividad antimicrobiana de ambos se determina mediante una adaptación del test de "Challenge" en el que se disponen muestras de ambos champús añadiéndoles a todas ellas un inóculo combinado de levaduras, bacterias y hongos de las siguientes especies y cepas:

- Escherichia coli* (ATCC n° 9027)
- Staphylococcus aureus* (ATCC n° 8739)
- Pseudomonas aureoginosa* (ATCC n° 9077)
- Candida albicans* (ATCC n° 10231)
- Aspergillus niger* (ATCC n° 16404)

45 El test consiste en contaminar una cierta cantidad del champú de las mencionadas muestras inculándolas con varios microorganismos conocidos y ver su evolución a un tiempo y temperatura determinados (37°C en n/caso).

50 En nuestro caso los contajes en placa se efectúan a diversos tiempos de incubación, dando los resultados detallados a continuación, de los que se deduce claramente (por el descenso del número de colonias) la efectividad del producto en el champú comparándolo con el de referencia que no lleva el producto.

Tiempo de la incubación		Colonias/Grano formulación							
		1ª inoculación							
Muestra		0 horas		24 horas		3 días		7 días	
		NTB	Hyl	NTB	Hyl	NTB	Hyl	NTB	Hyl
55	Referencia (sin conservante)	3·10 ⁶	2·10 ⁵	3·10 ⁶	1·10 ⁴	3·10 ⁶	5·10 ²	6·10 ⁶	<10
60	Con 0,4% del producto objeto del ejemplo	3·10 ⁶	2·10 ⁵	<10	<10	<10	<10	<10	<10

ES 2 092 958 B1

donde NTB = número total de bacterias
 Hyl = Número de hongos y levaduras

5	Tiempo de la incubación	Colonias/Grano formulación							
		2ª inoculación							
		0 horas		24 horas		3 días		7 días	
Muestra	NTB	Hyl	NTB	Hyl	NTB	Hyl	NTB	Hyl	
10	Referencia (sin conservante)	5·10 ⁷	3·10 ⁵	5·10 ⁷	5·10 ⁴	7·10 ⁷	4·10 ³	7·10 ⁷	1·10 ³
	Con 0,4% del producto objeto del ejemplo	5·10 ⁷	3·10 ⁵	4·10 ⁴	1·10 ²	<10	<10	<10	<10

15 Ejemplo V

En este ejemplo, se efectúa un ensayo de su eficacia como conservante en un desodorante que se presenta en aerosol y cuya formulación expresada en % p/p es como sigue:

20	1,2 propilenglicol	1%
	Etanol	40%
	Conservante (el mismo de los ej. anteriores)	0,4 - 0,5%
25	Agua desionizada	hasta 100%

(no se incluye perfume pues no incide en el proceso de conservación; tampoco se incluye el propelente)

30 La actividad antimicrobiana se determina midiendo el halo de inhibición producidos en los cultivos en placa de agar de las siguientes cepas:

- 35 *Pseudomonas aureoginosa* (ATCC n° 9077)
- Stephylococcus aureus* (ATCC n° 8739)
- Escherichia coli* (ATCC n° 9027)
- Candida albicans* (ATCC n° 10231)
- Aspergillus niger* (ATCC n° 16404)

Las placas se incuban en estufa 18 horas a 37°C.

40 Se obtienen los siguiente resultados

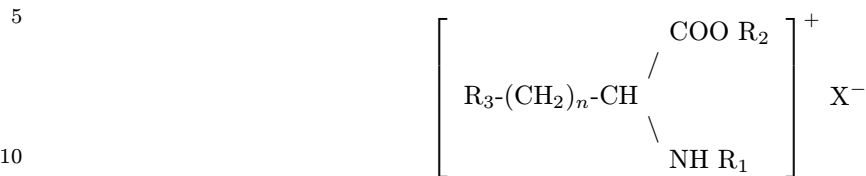
45	Microorganismo Ensayado	Diámetro del halo de inhibición (+13 mm disco muestra)	
		Muestra con 0,4% del conservante ensayado	Muestra Control (sin conservante)
50	<i>Stephylococcus aureus</i>	30	13
	<i>Pseudomonas aureoginosa</i>	28	13
	<i>Escherichia coli</i>	26	13
	<i>Candida albicans</i>	15	13
	<i>Aspergillus niger</i>	20	13

55 Los resultados muestran claramente la eficacia: en las muestras control no se da halo de inhibición (13 mm no cuentan pues corresponde al disco central portamuestras), mientras que aquellos que llevan conservantes lo producen en dimensiones considerables.

60

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la síntesis de tensioactivos catiónicos derivados de la condensación de ácidos grasos con aminoácidos de carácter básico esterificados, de fórmula:



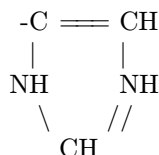
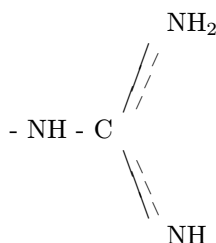
donde:

X⁻: puede ser: Br⁻, Cl⁻, HSO₄⁻

R₁: es una cadena alquílica lineal de un ácido o hidroxiaácido graso saturado de 8 a 14 átomos de carbono unido al grupo α-amino del aminoácido a través de un enlace amídico.

R₂: puede ser un resto alquílico lineal o ramificado de 1 a 12 átomos de carbono o aromático.

R₃: puede ser



pudiendo variar n desde 0 hasta 4

que comprende una primera etapa de esterificación de un aminoácido, **caracterizado** por el hecho de que en una segunda etapa tiene lugar la condensación de un cloruro de ácido graso con un derivado de aminoácido esterificado.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de utilizar aminoácidos de carácter básico, en particular L(+)-arginina.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la esterificación del aminoácido con alcoholes C1 - C12, en particular etanol, tiene lugar añadiendo cloruro de tionilo sobre una suspensión de arginina en alcohol preparada a temperatura ambiente.

4. Procedimiento, según la reivindicación 1, **caracterizado** por el hecho de que la segunda etapa de condensación de ácidos grasos con el grupo amino de los aminoácidos de carácter básico esterificados se lleva a cabo utilizando el cloruro de dichos ácidos grasos saturados de 8 a 14 átomos de carbono o el cloruro de los hidroxiaácidos de la misma longitud de cadena.

5. Procedimiento, según las reivindicaciones 1 o 3, **caracterizado** por el hecho de que la condensación del cloruro del ácido graso o del hidroxiaácido con el éster del aminoácido tiene lugar en un medio acuoso alcalino.

ES 2 092 958 B1

6. Procedimiento, según las reivindicaciones 1 o 5, donde el medio de reacción se mantiene a pH entre 8 y 10 por adición de hidróxido sódico.

5 7. Procedimiento, según las reivindicaciones anteriores, donde la separación del producto obtenido se lleva a cabo por centrifugación del crudo de reacción, previo ajuste de su pH a valores comprendidos entre 6 y 7 mediante el uso de ácido clorhídrico.

8. Aplicación de los tensioactivos catiónicos obtenidos por el procedimiento de las reivindicaciones anteriores, y en particular, el monoclóhidrato de la lauramida del éster etílico de la L(+) Arginina, para
10 su utilización como agentes antimicrobianos de aplicación en la industria en general.

9. Aplicación de los tensioactivos catiónicos obtenidos por el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 6 en los campos concretos de la industria alimentaria y agroalimentaria, en particular en la industria
15 cárnica y también veterinaria, detergencia, cosmética y dermofarmacia.

10. Aplicación de los tensioactivos catiónicos obtenidos por el procedimiento de las reivindicaciones 1 a 6 en cualquiera de sus formas de polvo, pasta, emulsión o suspensión acuosas u en otro vehículo y en
disolución acuosa o en el seno de disolventes varios, particularmente los glicoles.

20

25

30

35

40

45

50

55

60



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ① ES 2 092 958
② N.º solicitud: 9500061
③ Fecha de presentación de la solicitud: 10.01.95
④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: C07C 233/47, A61K 31/16

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	ES-512643-A (CSIC - ASOCIACION DE INVESTIGACION DE DETERGENTES) * Todo el documento *	1-10
A	ES-518433-A (CSIC - ASOCIACION DE INVESTIGACION DE DETERGENTES) * Todo el documento *	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
20.07.95

Examinador
E. Albarrán Gómez

Página
1/1