

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 752**

51 Int. Cl.:

**C07F 9/38** (2006.01) **C07C 279/12** (2006.01)

**C07F 9/40** (2006.01) **C07C 309/14** (2006.01)

**C07D 295/088** (2006.01)

**C07C 211/63** (2006.01)

**C07C 215/14** (2006.01)

**C07C 215/18** (2006.01)

**C07C 217/28** (2006.01)

**C07C 217/42** (2006.01)

**C07C 233/48** (2006.01)

**C07C 237/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2011 E 11761444 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2643332**

54 Título: **Procedimiento de tamponamiento de una composición química o biológica**

30 Prioridad:

**24.11.2010 US 953569**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**29.12.2014**

73 Titular/es:

**SACHEM, INC. (100.0%)  
821 East Woodward  
Austin, TX 78704, US**

72 Inventor/es:

**HAYMORE, BARRY L.**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 525 752 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de tamponamiento de una composición química o biológica

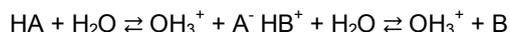
**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a compuestos tampón, especialmente a compuestos tampón para su uso en sistemas biológicos en los que el compuesto tampón comprende compuestos de amonio cuaternario-amina. Más particularmente, la invención se refiere a compuestos tampón en los que la molécula tampón contiene tanto un átomo de nitrógeno de la amina como un átomo de nitrógeno de amonio cuaternario.

**Antecedentes**

10 Los compuestos tampón clásicos son compuestos o agentes químicos que resisten o minimizan los cambios en las concentraciones de iones de hidrógeno cuando un sistema de interés se coloca en estrés químico o estrés físico. El estrés químico incluye la generación o el consumo de los iones de hidrógeno, cambio en la fuerza iónica y el cambio en las propiedades de disolvente. El estrés físico incluye cambios en la temperatura y / o la presión. En muchas circunstancias es útil o necesario mantener constante el pH o dentro de unos límites estrechos. Los compuestos tampón se utilizan a menudo en solución acuosa homogénea, pero también se pueden usar en mezclas sólidas o semisólidas, en disolventes polares no acuosos o en cremas, ungüentos o suspensiones. Los compuestos tampón naturales se utilizan en los sistemas biológicos o células vivas para mantener o modular las condiciones de pH adecuadas. Los compuestos tampón naturales y sintéticos se utilizan comercialmente en el tratamiento e higienización del agua, en agentes para el control de la corrosión, en mezclas de fertilizantes para la agricultura, en las formulaciones de medicamentos y productos de aseo personal, en alimentos y bebidas, en la fermentación y la elaboración de la cerveza, en pinturas y recubrimientos, en fármacos humanos o animales y en muchas otras aplicaciones.

25 El pH es una medida de la actividad solvatada de los iones de hidrógeno, que está directamente relacionada con la concentración de iones de hidrógeno:  $-\log[H^+]$ . La fuerza de un ácido monoprótico neutro (HA) o ácido conjugado monoprótico de una base neutra ( $HB^+$ ) se miden mediante el  $pK_a$  los valores para las respectivas reacciones que se definen por:



$$pK_a = -\log K_a \text{ en la que } K_a = [OH_3^+][A^-] / [A] \text{ o } K_a = [OH_3^+][B] / [HB^+]$$

Reordenadas, estas ecuaciones dan:

30  **$pH = pK_a + \log([A^-] / [HA])$  o  $pH = pK_a + \log([B] / [HB^+])$**

35 Cada elemento entre corchetes en las ecuaciones anteriores refleja la "actividad" de las respectivas especies neutras e iónicas en solución. La actividad es un término termodinámico definido y se relaciona con la concentración. A una concentración baja y una fuerza iónica baja, la actividad es aproximadamente igual a la concentración. En la presente memoria, los inventores usan una  $pK_a$  basada en la concentración, valores medidos a 25 °C en una fuerza iónica ( $\mu$ ) de 0,10, a menos que se especifique lo contrario. Dichos valores de  $pK_a$  son más aplicables a las condiciones prácticas que los valores termodinámicos de  $pK_a$ , en los que  $\mu \sim 0$

40 El intervalo del pH y la escala tiene especial significado únicamente en un disolvente específico de interés y se hace referencia a ciertas normas de pH definidas. Las propiedades de solvatación del disolvente hacia los ácidos y bases conjugados y dictan el grado de ionización y la fuerza de los ácidos y las bases. Adicionalmente, la mayoría de los disolventes polares tienen propiedades de autoionización que limitan la fuerza de los ácidos fuertes y las bases fuertes disueltos en ese disolvente. Este efecto, denominado el "efecto de nivelación", es fácilmente evidente en agua, en la que la constante de autoionización,  $pK_w$ , es de aproximadamente 13,8 (25 °C,  $\mu = 0,1$ ). En estas condiciones, la neutralidad, que es cuando  $[OH_3^+] = [OH^-]$ , se define por un  $pH = 0,5 + pK_w = 6,9$ . Cuando el agua es el disolvente, la acidez ( $pK_a$ ) de los  $OH_3^+$  solvatados es de aproximadamente -1,7 mientras que la de  $OH_2$  solvatado es de aproximadamente 15,5. Disueltas en agua, las bases más fuertes que el hidróxido simplemente reaccionan con el agua formando  $OH^-$  (ion hidróxido). Del mismo modo, los ácidos más fuertes que  $OH_3^+$  reaccionan con agua formando  $OH_3^+$ . Por lo tanto, en condiciones reales, cuando la concentración de ácido / base es aproximadamente 0,10 M y la concentración del disolvente ( $H_2O$ ) es de aproximadamente 55,5 M, el efecto de nivelación del agua limita el intervalo de pH útil para el tamponar hasta aproximadamente 1,0- 12,8. Por otra parte, otras limitaciones prácticas en el agua hacen que trabajar con tampones sea incómodo o difícil cuando se opera fuera del intervalo 2-12.

Una propiedad importante de un compuesto tampón es su capacidad de tamponamiento, es decir, la cuánto  $OH_3^+$  u  $OH^-$  se puede neutralizar mediante el tampón y reducir al mínimo el cambio de pH en la solución. Las ecuaciones

anteriores muestran que la capacidad tampón está directamente relacionada con (a) la concentración del tampón y (b) la diferencia ( $\Delta$ ) entre el pH operativo y el  $pK_a$  del tampón. Más capacidad de tamponamiento se puede obtener por (a) el aumento de la concentración del compuesto tampón, (b) hallando un compuesto tampón adecuado para que  $\Delta$  sea menor o (c) mediante el ajuste del pH operativo para que  $\Delta$  sea menor. Un usuario de compuestos tampón debe

5 estimar cuánto ácido o base puede generarse en el sistema en estudio y cuánta variación del pH se puede tolerar el fin de elegir tampones y concentraciones adecuados. Excepto cerca de los extremos de los intervalos útiles de pH (pH = 2 o 12), la siguiente tabla permite estimar la capacidad tampón real (mM) como una fracción de la concentración del compuesto tampón total ( $C_B$ , mM) a diferentes valores de  $\Delta$ . Un intervalo de tamponamiento útil de un compuesto

10 tampón es el intervalo de pH dentro del cual al menos el 50% de la capacidad tampón máxima se ha de mantener. Como verá más adelante, el intervalo de tamponamiento de un ácido monoprótico típico es de aproximadamente 0,96 unidades de pH, es decir  $\pm 0,48$  unidades de pH centradas en el valor de  $pK_a$ .

Capacidad (mM)  $\Delta$  (pH- $pK_a$ )

0,500* $C_B$	0,00
0,443* $C_B$	$\pm 0,10$
0,400* $C_B$	$\pm 0,18$
0,387* $C_B$	$\pm 0,20$
0,333* $C_B$	$\pm 0,30$
0,285* $C_B$	$\pm 0,40$
0,250* $C_B$	$\pm 0,48$
0,240* $C_B$	$\pm 0,50$
0,201* $C_B$	$\pm 0,60$
0,167* $C_B$	$\pm 0,70$
0,137* $C_B$	$\pm 0,80$
0,112* $C_B$	$\pm 0,90$
0,091* $C_B$	$\pm 1,00$

Se han desarrollado muchos compuestos para una multitud de usos, incluyendo en los sistemas biológicos. Los tampones para su uso en sistemas biológicos se enfrentan a una serie de requisitos, incluyendo una baja toxicidad para los organismos biológicos vivos, propiedades de baja unión a metal, baja sensibilidad a los cambios de pH causados por cambios en la temperatura y cargas iónicas específicas. Muchos compuestos tampón anteriormente conocidos utilizados en los sistemas biológicos han sufrido una falta de una o más de estas características y, por lo tanto, desde hace tiempo existe una necesidad constante de compuestos tampón mejores con propiedades especiales, predeterminadas y controlables.

15 Adicionalmente, los compuestos tampón conocidos, particularmente aquellos para usar en sistemas biológicos, han sufrido una incapacidad para cubrir fácilmente toda la gama de pH. Determinadas porciones de la gama de pH, por ejemplo, el intervalo de pH 11 a pH 13, han estado notablemente desprovistos de tampones capaces de mantener el pH dentro de este intervalo.

20 Además, debido a que los compuestos tampón preparados para su uso en diversos intervalos de pH eran a menudo bastante diferentes químicamente ha habido problemas de compatibilidad que surgen de las diferencias químicas que eran inherentes a los diferentes compuestos tampón necesarios para obtener tamponamiento a diferentes intervalos de pH. Idealmente, un tampón debería controlar el pH únicamente e interactuar mínimamente con las moléculas constituyentes en estudio o de interés en la solución. Una propiedad importante es su carga en general. Si se las sustancias químicas de interés se cargan, un compuesto de amortiguamiento de la misma carga se utiliza para

25 30 minimizar la interacción en solución o mezcla. Estas diferencias químicas introducen otra variable que debe considerarse a la hora de seleccionar un compuesto tampón apropiado para una aplicación particular. Por estas razones adicionales, ha habido una necesidad constante y sentida desde hace tiempo de compuestos tampón mejoradas con propiedades especiales, predeterminadas y controlables.

35 El documento EP 0 494 686 A1 describe un procedimiento para efectuar la separación electroforética de las moléculas en los capilares que comprende: introducir en dicho capilar una solución tampón que contiene al menos un zwitterión y establecer un campo eléctrico a través de dicho capilar para hacer que la muestra migre a través de dicho capilar y detecte los analitos separados.

Liu Qian et al., Sci. China Ser. B-Chem., 52, 2009, 1666 - 1676 describen la separación simultánea de proteínas ácidas y básicas usando tensioactivos géminis catiónicos como aditivos tampón en la electroforesis capilar.

**Sumario**

La presente invención aborda la necesidad sentida durante largo tiempo de compuestos tampón capaces de tamponar y mantener el pH a través de sustancialmente todo el intervalo de pH desde pH 2 a pH 13, al mismo tiempo que proporcionan propiedades deseables, incluyendo una o más de las propiedades de carga predeterminadas seleccionables, baja toxicidad para los organismos biológicos vivos, propiedades de unión baja a metales y baja sensibilidad a los cambios de pH causados por los cambios en la temperatura, y que tiene la compatibilidad química suficiente entre las sustancias de interés y los compuestos tampón que ofrecen tamponamiento en un amplio intervalo de pH, de modo que se evitan muchos de los problemas resultantes de las diferencias químicas que acompañan a diferentes compuestos tampón usados para obtener el tamponamiento en un amplio intervalo de pH. Para los sistemas biológicos, el intervalo de pH más importante es de pH 4 a pH 10, y la presente invención proporciona una gran versatilidad en la selección de compuestos tampón adecuados para su uso en este intervalo.

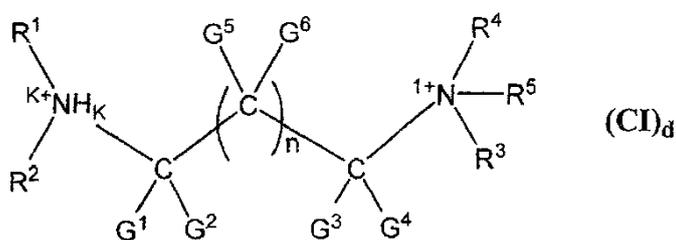
Los presentes inventores han desarrollado una serie bastante novedosa y no obvia de compuestos tampón que se basan en una estructura de amonio cuaternario-amina ("amina-cuat"). Las diversas sustituciones en la amina y la proximidad del grupo de amonio cuaternario a la amina permiten construir una familia de moléculas tampón que tienen un amplio intervalo de valores de  $pK_a$  útiles (2- 13), al mismo tiempo que se pueden impartir propiedades químicas y físicas únicas y útiles (por ejemplo, carga, solubilidad) de una manera controlable predeterminada a los compuestos tampón, de modo que se mejora su función y utilidad. Estos nuevos compuestos tampón pueden usarse para aplicaciones de uso general, aplicaciones especiales y / o aplicaciones biológicas.

Los compuestos de amina-cuat están formados por cinco tipos estructurales con diferentes propiedades.

1. Monoamino-monocuat. Estos compuestos tampón monopróticos son catiónicos en todas las condiciones de protonación.
2. Monoamino-monocuat con un único grupo aniónico unido ( $1^-$  o  $2^-$ ), cuyo(s) valor(es) de  $pK_a$  está(están) fuera del intervalo de tamponamiento de interés. Estos compuestos tampón nominalmente monopróticos han cargado especies en el intervalo de  $2^+$  a  $1^+$ .
3. Monoamino-monocuat con dos grupos aniónicos unidos ( $1^-$  o  $2^-$ ), cuyo(s) valor(es) de  $pK_a$  está(están) fuera del intervalo de tamponamiento de interés. Estos compuestos tampón nominalmente monopróticos han cargado especies en el intervalo de  $2^+$  a  $3^+$ .
4. Monoamino-monocuat con 1 -2 grupos aniónicos unidos ( $1^-$  o  $2^-$ ) en el que al menos un valor de  $pK_a$  de un grupo aniónico está dentro del intervalo de tamponamiento de interés. Estos compuestos tampón nominalmente dipróticos o polipróticos tienen dos o más valores de  $pK_a$  solapantes, valores que normalmente están separados por aproximadamente 1 a aproximadamente 2 unidades  $\log K_a$  de diferencia. Estos compuestos tampón de amplio intervalo han cargado especies en el intervalo de  $2^+$  a  $3^+$ .
5. Diamina-monocuat con 0-3 grupos aniónicos unidos ( $1^-$  o  $2^-$ ) Estos compuestos tampón nominalmente dipróticos o polipróticos tienen dos o más valores de  $pK_a$  solapantes (aminas y/o aniones), que normalmente están separados por aproximadamente 1 a aproximadamente 2 unidades  $\log K_a$  de diferencia. Estos compuestos tampón de amplio intervalo han cargado especies en el intervalo de  $3^+$  a  $5^-$ .

Los compuestos tampón amina-cuat anteriores se pueden sintetizar a partir de diaminas simétricas y asimétricas y amina-guanidinas en las que uno de los átomos de nitrógeno de la amina o guanidina está cuaternizado, dejando una mono-amina o mono-guanidina cargada positivamente. Estos compuestos tampón amina-cuat, en sus formas ácidas y básicas son sales orgánicas incoloras y no volátiles o zwitteriones con una solubilidad apreciable en agua y en muchos disolventes orgánicos y mezclas de disolventes. Los compuestos tampón amina-cuat se preparan convenientemente con un rendimiento razonable usando de una a tres etapas sintéticas a partir de materiales de partida químicos fácilmente disponibles. Después de la síntesis se obtienen materiales puros (> 99%) después de 1-3 ciclos de recristalización a partir de disolventes habituales.

Por tanto,, en una realización, la presente invención se refiere a un compuesto tampón de de amonio cuaternario-amina protonado o no protonado y a un procedimiento de formación de compuestos tampón correspondiente a una composición química o biológica, que comprende añadir a la composición una cantidad para formar compuesto tampón eficaz de al menos un compuesto tampón de amonio cuaternario-amina protonado o no protonado, en el que el compuesto tampón de amonio cuaternario-amina tiene una fórmula general:



en la que:

n tiene valores enteros en el intervalo de 0 – 4,

k es 0 para el complejo no protonado y k es 1 para el compuesto protonado;

5 cada  $G^1$ ,  $G^3$  y  $G^5$  es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, o es un componente de un resto químico cíclico,

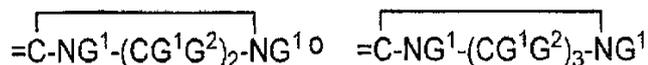
cada  $G^2$  y  $G^4$  es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, y -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, o es un componente del resto químico cíclico.

cada  $G^6$  es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -OH, -OCH<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> y -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, o es un componente del resto químico cíclico, y

10 cada  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  es un resto químico seleccionado independientemente de -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -ciclohexilo, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-3</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-3</sub>N(CH<sub>3</sub>)C(O)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)NHCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> siendo m 0, 1, 2 o 3, o es un componente del resto químico cíclico, o  $R^5$  es un resto químico  $-[CG^7G^8-(CG^7G^9)_r-CG^7G^8-H_iNR^6R^7]^+$ , en el que cada  $G^7$  es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, cada  $G^8$  es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, y -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>,  $G^9$  es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -OH, -OCH<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, y -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, r tiene valores enteros en el intervalo de 0 - 4, y j es 0 o 1, y cada  $R^6$  y  $R^7$  es un resto químico seleccionado independientemente de -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -ciclohexilo, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-3</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-3</sub>N(CH<sub>3</sub>)C(O)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)NHCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> siendo m 0, 1, 2 o 3;

en el que cuando el compuesto comprende el resto químico cíclico, el resto químico cíclico es uno o más seleccionados de (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (g):

25 (a) uno o más par de  $R^1$  y  $R^2$ ,  $R^3$  y  $R^4$ ,  $R^3$  y  $R^5$ , y/o  $R^4$  y  $R^5$ , forma un solo resto químico de tal manera que el par es individual e independientemente -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH(OH)CH<sub>2</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(C(O)G<sup>1</sup>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>C(O)N(G<sup>1</sup>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH(OH)CH<sub>2</sub><sup>-</sup>, = C(NG<sup>1</sup>)<sub>2</sub>.



30 (b) uno o más pares de  $R^1$  y  $R^3$ ,  $R^1$  y  $R^4$ ,  $R^1$  y  $R^5$ ,  $R^2$  y  $R^3$ ,  $R^2$  y  $R^4$  y/o  $R^2$  y  $R^5$  forma un único resto químico de tal manera que el par es individual e independientemente -(CG<sup>1</sup>G<sup>2</sup>)<sub>g</sub><sup>-</sup>, siendo n 0 o 1 y siendo g 2 o 3;

(c) uno o más pares de  $G^1$  y  $G^3$ ,  $G^2$  y  $G^4$ ,  $G^1$  y  $G^4$  y/o  $G^2$  y  $G^3$  forma un resto químico único de tal manera que el par es individual e independientemente -(CG<sup>1</sup>G<sup>6</sup>)<sub>q</sub><sup>-</sup>, teniendo q valores enteros de 0-4 y la suma de q y n tiene valores enteros de 3-4, y, cuando q = 0, -(CG<sup>1</sup>G<sup>6</sup>)<sub>0</sub><sup>-</sup> es un enlace sencillo carbono-carbono entre los átomos de carbono a los que el par está unido en la fórmula general;

35 (d) uno o más pares de  $G^1$  y  $G^2$ ,  $G^3$  y  $G^4$ , y/o  $G^5$  y  $G^6$  forma un único resto químico tal que el par es individual e independientemente -(CG<sup>1</sup>G<sup>6</sup>)<sub>w</sub><sup>-</sup>, teniendo w valores enteros de 4-5.

(e) uno o más pares de  $R^1$  y  $G^3$ ,  $R^1$  y  $G^4$ ,  $R^2$  y  $G^3$ ,  $R^2$  y  $G^4$ ,  $R^3$  y  $G^1$ ,  $R^5$  y  $G^2$ ,  $R^4$  y  $G^1$ ,  $R^4$  y  $G^2$ ,  $R^5$  y  $G^1$ , y/o  $R^5$  y  $G^2$  forma un resto químico único de tal manera que el par es individual e independientemente -(CG<sup>1</sup>G<sup>2</sup>)<sub>s</sub><sup>-</sup> teniendo s valores enteros 1 -3, teniendo n tiene valores enteros 0-2 y la suma de s y n tiene valores enteros de 2-3;

(f) uno o más pares de  $R^1$  y  $G^5$ ,  $R^1$  y  $G^6$ ,  $R^2$  y  $G^5$ ,  $R^2$  y  $G^6$ ,  $R^3$  y  $G^5$ ,  $R^3$  y  $G^6$ ,  $R^4$  y  $G^5$ ,  $R^4$  y  $G^6$ ,  $R^5$  y  $G^5$ , y/o  $R^5$  y  $G^6$  forma un resto químico único de tal manera que el par es individual e independientemente -(CG<sup>1</sup>G<sup>2</sup>)<sub>v</sub><sup>-</sup> teniendo v valores enteros 0 -3, teniendo n tiene valores enteros 1-4 y la suma de v y n tiene valores enteros de 3 - 4 y cuando v = 0, -(CG<sup>1</sup>G<sup>2</sup>)<sub>0</sub><sup>-</sup> es un enlace sencillo carbono-carbono entre los átomos de carbono a los que está unido el par en la fórmula general; y

45 (g) uno o más pares de  $R^1$  y  $G^1$ ,  $R^1$  y  $G^2$ ,  $R^2$  y  $G^1$ ,  $R^2$  y  $G^2$ ,  $R^3$  y  $G^3$ ,  $R^3$  y  $G^4$ ,  $R^4$  y  $G^3$ ,  $R^4$  y  $G^4$ ,  $R^5$  y  $G^3$ , y/o  $R^5$  y  $G^4$  forma un único resto químico tal que el par es individual e independientemente -(CG<sup>1</sup>G<sup>2</sup>)<sub>u</sub><sup>-</sup>, teniendo u valores enteros de 3-4;

50 en el que Cl es un contraión no interferente o mezcla de no contraiones no interferentes , según sea necesario para mantener la electroneutralidad, con la carga en el compuesto de amonio cuaternario-amina que es igual al valor de la

cantidad  $(j + k - z + 1)$  en la que  $z$  es igual al valor absoluto de la suma numérica de todas las cargas negativas en cada resto  $-\text{CO}_2^-$ ,  $-\text{SO}_3^-$ ,  $-\text{PO}_3\text{H}^-$ , and  $-\text{PO}_3^{2-}$  contenido en  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$ ,  $\text{R}^4$ ,  $\text{R}^5$ ,  $\text{R}^6$ ,  $\text{R}^7$ ,  $\text{G}^2$ ,  $\text{G}^4$ ,  $\text{G}^6$ ,  $\text{G}^8$  y/o  $\text{G}^9$  presente y

5 en la que  $d$  es igual a  $|j + k - z + 1|$  para los contraiones monovalentes,  $|j + k - z + 1| / 2$  para los contraiones divalentes,  $|j + k - z + 1| / 3$  para los contraiones trivalentes  $|j + k - z + 1| / 4$  para los contraiones tetravalentes y el signo de  $(z - j - k + 1)$  refleja la carga en el contraión (es), a excepción de que cuando  $(j + k - z + 1)$  es cero,  $d$  es cero y no está presente un contraión independiente.

Se observa que, si no hay segundo nitrógeno de amina (es decir, cuando  $\text{R}^5$  no es un resto químico -  $[\text{CG}^7\text{G}^8 - (\text{CG}^7\text{G}^9)_r - \text{CG}^7\text{G}^8 - \text{H}_j\text{NR}^6\text{R}^7]^{j+}$ ),  $j$  es igual a cero en las fórmulas anteriores.

10 Lo compuestos tampón cuaternarios-amina anteriores y el procedimiento de formación de compuestos en tampón con una composición una composición mediante el uso de estos compuestos, proporciona un nuevo e inesperado amplio intervalo de pH de la capacidad de formación de compuestos de tampón, con un conjunto consistente de compuestos de formación de compuestos tampón. La presente invención, por lo tanto, proporciona una solución a el antiguo problema de proporcionar dicho sistema de mezcla de tampón versátil y de amplio alcance y a la necesidad sentida durante mucho tiempo para tales capacidades de composición tampón, al tiempo que proporciona una baja toxicidad para los organismos biológicos vivir, propiedades de unión baja a metal y baja sensibilidad a la temperatura inducidas por el cambio cambios de pH, y que tiene suficiente compatibilidad química entre las sustancias de interés y los compuestos tampón, de modo que evita muchos de los problemas resultantes de las diferencias químicas que acompañan a diferentes compuestos tampón utilizados para obtener el tamponamiento en un amplio intervalo de pH.

### **Breve descripción de las figuras**

20 Las Figuras 1 -4 son gráficos que representan el crecimiento comparativo de cuatro especies diferentes de microorganismos en medios de crecimiento que contienen compuestos tampón dentro y no dentro del ámbito de la presente invención, a diversas concentraciones de los compuestos tampón.

### **Descripción detallada**

25 Como se usa en el presente documento, la referencia a "tampón", "compuesto tampón" y el uso del término "tampón" en términos que incluyen esta palabra raíz, se refiere a un compuesto tampón de pH.

30 Como se utiliza en el presente documento, el término "no interferente", cuando se usa en la descripción de contraion proporcionado con los compuestos tampón de de amonio-amina para lograr la electroneutralidad del compuesto general tampón, significa que el contraión no interfiere con la solubilidad del compuesto tampón en general, ya que no da lugar a la formación de un precipitado insoluble cuando en un sistema acuoso. También se refiere a la ausencia de interacciones no deseadas con otros componentes en solución o en una mezcla.

Como se utiliza en el presente documento, el término "enlace químico" cuando se usa para definir un sustituyente opcional, se refiere a un enlace directo covalente entre los átomos conectados por el sustituyente. El término "enlace carbono-carbono" significa un enlace químico entre dos átomos de carbono.

35 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, los límites numéricos de los intervalos y las proporciones descritos se pueden combinar, y se estima que todos los valores intermedios se divulgan mediante la divulgación de los intervalos. A lo largo de la divulgación y las reivindicaciones, cualquier miembro de un grupo puede ser eliminado del grupo. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, todas las posibles combinaciones de los diversos elementos descritos pueden combinarse y se estima que todas tales combinaciones están incluidas dentro del ámbito de la presente invención. A menos que se especifique lo contrario, todas las temperaturas se miden en grados centígrados, todos los procesos se llevan a cabo a temperatura ambiente, todas las presiones son la atmosférica.

40 Se ha de entender que a menos que se indique específicamente lo contrario, la referencia a "un", "una", y / o "el/la" puede incluir uno o más de uno, y que la referencia a un elemento en singular también pueden incluir el artículo en plural.

45 Pueden existir ciertos compuestos tampón de la presente invención, en particular, las formas geométricas o estereoisoméricas. La presente invención contempla todos estos compuestos, incluyendo los isómeros cis y trans, los enantiómeros R y S ( $d$  y  $l$ ), incluyendo mezclas racémicas de los mismos, diastereómeros y otras mezclas de los mismos, que caen dentro del ámbito de la invención. En un sustituyente, tal como un grupo alquilo, puede haber átomos de carbono asimétricos adicionales. Se pretende que todos estos isómeros, así como las mezclas de los mismos, se incluyan en la presente invención.

50 Particularmente útiles son los compuestos tampón catiónicos de la presente invención en forma de hidróxido, es decir, con  $\text{OH}^-$  como el contraión. Los compuestos tampón de la presente invención en forma de hidróxido tienen propiedades únicas y útiles y en sí mismos. Estos compuestos tampón son fuertes hidróxidos iónicos que no contienen cationes inorgánicos y como resultado tienen propiedades químicas y físicas únicas tanto en agua como disolventes orgánicos.

- Una cuestión importante relacionada con los hidróxidos de amonio cuaternario es su estabilidad hacia desalquilación a pH alto. La mayoría de los compuestos tampón divulgados en el presente documento tienen cierta estabilidad alta de pH (pH = 14 en agua, a 23 °C, 2 días), y muchos tienen estabilidad sustancial alta del pH (pH = 14 en agua, a 23 °C, 3 meses). Generalmente, los compuestos con grupos β-hidroxietilo unidos a átomos de nitrógeno cuaternario son menos estables (horas o días), aquellos con grupos β-hidroxietilo unidos a átomos de nitrógeno terciarios también son menos estables (de días a semanas), y aquellos sin estos grupos son más estables (meses), a un pH tan alto. Cuando la estabilidad a pH alto es problemático y el carbonato es un sustituto aceptable para el hidróxido, las sales de carbonato se preparan fácilmente directamente por procedimientos de metátesis o de intercambio iónico, o de sales de hidróxido, que se convierten en carbonatos utilizando CO<sub>2</sub>.
- Algunos compuestos de zwitteriónicos descritos en este documento pueden no tener contraiones. Los compuestos tampón catiónicos descritos en el presente documento debe contener aniones y compuestos tampón aniónicos descritos en el presente documento debe contener contraiones. Los contraiones o contracciones únicos pueden impartir propiedades importantes y útiles para el tampón como un todo. Durante la síntesis de los tampones catiónicos, se han utilizado diversos agentes alquilantes. Esto conduce a un intervalo de tampones catiónicos con diferentes aniones tales como Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>, I<sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, *p*-CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>. La disponibilidad de los tampones catiónicos en forma de hidróxido permite la síntesis de una amplia gama de compuestos tampón neutralizando el tampón hidróxido con ciertos ácidos, incluyendo los aniones mencionados anteriormente: NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, HCO<sub>2</sub><sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, (CH<sub>3</sub>O)<sub>2</sub>PO<sub>2</sub><sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, HPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, CH<sub>3</sub>PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>3</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>2</sub><sup>-</sup>, B(OH)<sub>4</sub><sup>-</sup> y aniones similares, en los que un grupo metilo está sustituido con otro grupo alquilo pequeño (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>). Otra clase de tampones catiónicos que contienen aniones fuertemente hidrófobos se preparan de manera similar usando los ácidos correspondiente a CCl<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, CBr<sub>3</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup>, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>. Sin embargo, otra clase de tampones catiónicos contienen aniones lipófilos que contienen grupos alifáticos y aromáticos lineales y ramificados (R = C<sub>4</sub>-C<sub>18</sub>). Los tampones se vuelven más solubles en disolventes orgánicos polares y no polares, como especies iónicas o especies de iones emparejados cuando R = C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>. Por otra parte, la formación de micelas y las propiedades detergente en agua se pueden obtener cuando R = C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>. Estos compuestos se preparan fácilmente a partir de sus ácidos, que producen sales que contienen RCO<sub>2</sub><sup>-</sup>, RSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ROSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ROPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, (RO)<sub>2</sub>PO<sub>2</sub><sup>-</sup>, RPO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. En unos pocos casos, los aniones útiles se asocian con ácidos inestables. En estos casos, los compuestos tampón se preparan mediante procedimientos de intercambio de iones que forman sales NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>.
- Los compuestos tampón aniónicos contienen contraiones catiónicos. Los más habitualmente usados son Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> y, en algunos casos, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cuando el pH es suficientemente ácido. Los cationes orgánicos son a menudo aceptables cuando se necesitan propiedades de solubilidad especiales: amonio cuaternario, di-amonio cuaternario, fosfonio, sulfonio, sales de sulfoxonio son cationes orgánicos representativos. Cuando la solubilidad lo permite y lo necesita, los cationes alcalinotérreos, cationes lantánidos, cationes de metales de transición y los cationes de metales de postransición pueden ser contraiones aceptables para tampones aniónicos.
- Sales de hidróxido de tampones catiónicos - forma ácida de tampones aniónicos:**
- Particularmente útiles son los compuestos tampón catiónicos en forma de hidróxido, es decir, con OH<sup>-</sup> como el contraión. En algunos casos, estos compuestos se pueden preparar mediante reacciones de metátesis usando Ba(OH)<sub>2</sub>, KOH, NaOH, Ag<sub>2</sub>O en agua o disolventes orgánicos polares. Más preferiblemente, estos compuestos se preparan por electrólisis / electrodiálisis en agua o por procedimientos de intercambio iónico en agua o disolventes orgánicos polares. Los tampones en forma de hidróxido tienen propiedades únicas y útiles en sí mismos. Los hidróxidos iónicos fuertes que no contienen cationes inorgánicos tienen propiedades químicas y físicas únicas tanto en agua como en disolventes orgánicos. Un uso importante de las sales de hidróxido es la conveniente preparación de muchos compuestos diferentes por simples reacciones de neutralización utilizando ácidos débiles o fuertes (véase más adelante).
- Las formas ácidas de los tampones aniónicos permiten al usuario fabricar cualquier sal deseada mediante el uso de los hidróxidos inorgánicos apropiados, NaOH, KOH, NH<sub>4</sub>OH. Además, los ácidos tampón aniónicos y los hidróxidos tampón catiónicos se pueden mezclar para formar sistemas de tamponamiento mixtos sin producir la sal no deseada.
- Cationes de tamponamiento con aniones de tamponamiento:**
- Una propiedad muy útil y única de los compuestos tampón de acuerdo con otra realización de la presente invención es la combinación de compuestos tampón catiónicos con compuestos tampón aniónicos de, incluyendo, en particular, los compuestos tampón aniónicos de acuerdo con realizaciones de la presente invención, así como compuestos tampón aniónicos convencionales. Los resultados son combinaciones de tampones útiles con capacidades tampón de gama media a concentraciones razonables. En algunas aplicaciones, los tampones catiónicos requieren un anión no-reactivo pasivo. Sin embargo, en otras aplicaciones, un anión tampón es perfectamente aceptable. La mayoría de los tampones catiónicos descritos en el presente documento son compatibles con muchos aniones de tamponamiento que forman sales que tienen propiedades de solubilidad en soluciones acuosas aceptables. Esto incluye formiato, acetato, bicarbonato, hidrogenofosfato, dihidrogenofosfato y borato. Esto también incluye una amplia gama de tampones aniónicos de uso habitual que contienen ácidos aminoalcanosulfónico y tampones aniónicos del tipo descrito en el presente documento. Como se ha indicado, en una realización, los tampones catiónicos y los tampones aniónicos, cada uno dentro del ámbito de la presente invención, se pueden combinar para su uso para obtener tamponamiento a

través de una gama más amplia de pH. Hay muchas combinaciones útiles con diferentes proporciones de concentración que no todos pueden figurar en esta lista. La disponibilidad de los tampones catiónicos en forma de hidróxido y los tampones aniónicos en forma de ácido (protonados) permite hacer muchas combinaciones de tamponamiento sin generar sal no deseada (por ejemplo, NaCl) que de otro modo conduciría a una mayor fuerza iónica, mayor conductividad y una mayor osmolalidad. Uno pueden seleccionar combinaciones alternas de tampones catiónicos y aniónicos cuyos valores de  $pK_a$  están espaciados de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 unidades de K. Inicialmente, se eligen concentraciones aproximadamente iguales. Por supuesto, se pueden añadir ácidos adicionales por ejemplo, HCl), bases (p. ej., NaOH) y sales (p. ej., NaCl) según sea necesario. Son posibles muchas combinaciones binarias, ternarias e incluso más altas. Varios ejemplos de tampones tanto aniónicos como catiónicos se proporcionan con fines ilustrativos, en los que uno cualquiera de los tampones catiónicos se pueden combinar con uno de los tampones aniónicos, para proporcionar tal control del intervalo de tamponamiento. Para tampones bien conocidos (MOPSO, MOPS, CHES, MES, TES, HEPES), consulte las recopilaciones estándar para estructuras químicas y abreviaturas. Para los nuevos tampones catiónicos descritos en el presente documento, véanse las fórmulas estructurales ilustrativas y las abreviaturas casi al fina de la presente memoria descriptiva.

MOGA ( $CO_3^{2-}$ )	MOPSO (H+)	DIMEPA (OH-)	CHES (H+)	
5,6	6,9	8,1	9,4	
CHEMP(OH-)	MES (H+)	MEEPA(OH-)	Ácido bórico	TEXA (OH-)
5,0	6,1	7,3	9,0	10,3
MEDBOC (OH-)	Ácido acético	DIMEQ (OH-)	TES (H+)	DIMEBA (OH-)
3,0	4,6	6,1	7,5	8,9
HEPES ( $pK_{a1}$ )	Ácido acético	DIMEQ (OH-)	HEPES ( $pK_{a2}$ )	DEPA (OH-)
3,0	4,6	6,1	7,5	8,7
MEDBOC (OH-)	Ácido acético	MOPA (OH-)	MOPS (H+)	DEPA (OH-)
3,1	4,6	5,8	7,1	8,7
Ácido metoxiacético	TMP (OH-)			
3,3	4,3			

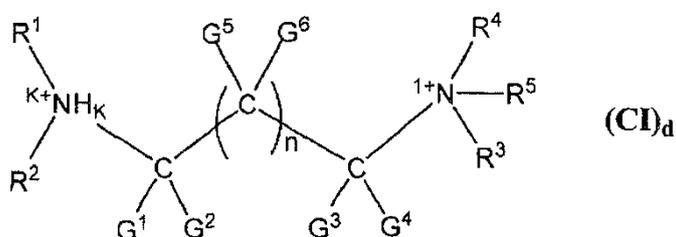
Una propiedad importante de compuestos tampón biológicos útiles es que tienen propiedades de unión baja a metales. Los compuestos tampón de conformidad con la mayoría de formas de realización de la presente invención exhiben poca o ninguna actividad de unión a metales (formación de complejos). Aunque la mayoría de los tampones aniónicos tales como acetato y fosfato se unen a los metales (metales alcalinotérreos y metales de transición), en cierta medida, esto es un problema menor con los tampones catiónicos basados en aminas. Tales tampones no tienen afinidad por el calcio y el magnesio y otros metales alcalinotérreos. Aunque el amoniaco puede ser un buen ligando para algunos metales de transición, las aminas terciarias se unen mucho más débilmente, especialmente las aminas terciarias que contienen grupos alquilo más grandes (de etilo y mayores). Mientras que la quelación de metales puede ser un problema, especialmente para algunas diaminas ordinarias, los ácidos  $\alpha$ -aminocarboxílicos, los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónico y compuestos relacionados, no es cierto para los tampones de amina-cuat. descritos en el presente documento porque uno de los dos átomos de nitrógeno de las aminas di-terciarias se ha "cuaternizado", reemplazando así uno de los átomos de nitrógeno de amina por un átomo de nitrógeno cuaternario. No sólo se elimina la quelación, sino la carga positiva vecina inhibe fuertemente la unión de metales al nitrógeno terciario restante. Aunque por lo general benignos, contiene grupos etanolamina (2-hidroxiethylamino) que a menudo se encuentran en los tampones habituales (por ejemplo, TRIS, HEPES, MOPSO y trietanolamina) pueden, en algunas circunstancias unirse a cationes de metales de transición (por ejemplo,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) en solución acuosa. Los grupos 2-hidroxiethyl mejoran la solubilidad en agua y la bio-compatibilidad, y también reducen los valores de  $pK_a$  valores de la amina unida; sin embargo, estos grupos a veces conducen a una débil unión a metal y a la reducción de la estabilidad química a pH alto. Sin embargo, en la presente invención, los grupos 2-metoxiethyl también mejoran la solubilidad acuosa y tienen efectos similares en la  $pK_a$  de la amina, aunque no se unen a metales en absoluto y son estables a pH alto. En la presente invención, los grupos fosfometilo y los grupos carboximetilo unidos al átomo de nitrógeno terciario pueden aumentar la unión a metales, pero este aumento no suele incrementar la unión a metales cuando estos grupos están unidos al átomo de nitrógeno de amonio cuaternario.

Otra propiedad útil de los tampones biológicos es la baja toxicidad para los seres humanos, animales y microorganismos y una ausencia de inhibición del crecimiento celular. Los compuestos tampón de conformidad con las realizaciones de la presente invención exhiben poca o ninguna toxicidad para los animales y microorganismos y han demostrado poca o ninguna inhibición del crecimiento en dichos sistemas. Medios de crecimiento tradicional para los microorganismos y los medios de fermentación contienen compuestos tampón naturales y añadidos, generalmente de tipo aniónico. Se sabe que ciertos detergentes catiónicos tales como cloruro de miristilbencildimetilamonio, tienen propiedades biostáticas y biocidas. Los compuestos tampón de conformidad con las realizaciones de la presente invención, cuando se analizaron en ensayos de crecimiento microbiano, muestran sustancialmente ninguna inhibición del crecimiento.

Como se ha indicado con más detalle a continuación, cuando se llevan a cabo estudios de dosis-respuesta de inhibición del crecimiento para cuatro microorganismos comunes diferentes utilizando cinco tampones catiónicos de acuerdo con la presente invención y tres tampones aniónicos/ neutros estándar (TRIS, MES, TES) en condiciones de crecimiento optimizadas (temperatura, tiempo, medio, pH) a concentraciones variables para los cinco tampones catiónicos, no se observa ninguna evidencia de toxicidad aguda, y a concentraciones del tampón de 100 mM e inferiores, los tampones catiónicos no muestran inhibición del crecimiento. A 200-500 mM, todos los tampones, incluyendo los tampones estándar, muestran cierta inhibición del crecimiento (véase más adelante). Por lo tanto, estos tampones, de acuerdo con la presente invención, demuestran una baja toxicidad para los microorganismos.

Cabe señalar que no hay problemas de compatibilidad observados entre los compuestos tampón de acuerdo con la presente invención y el medio de crecimiento usado (precipitación, desprendimiento de color, desprendimiento de olor) ya sea antes o después de la esterilización.

Como se ha descrito en el sumario anterior, en varias realizaciones, la presente invención se refiere a un compuesto tampón de de amonio cuaternario-amina protonado o no protonado y a un procedimiento de tamponamiento de una composición química o biológica, que comprende añadir a la composición una cantidad de tamponamiento eficaz de al menos un compuesto tampón de amonio cuaternario-amina protonado o no protonado, en el que el compuesto tampón de amonio cuaternario-amina tiene una fórmula general:



en la que las variables son como se ha definido anteriormente y explicado con más detalle a continuación.

En la determinación del número de átomos de carbono que separan los dos átomos de nitrógeno, n tiene valores enteros en el intervalo de 0-4. Por lo tanto, la molécula que contiene N monocuaternizado puede tener una estructura 1, 2-etilendiamina (n = 0), una estructura 3-propanodiamina 1 (n = 1), una estructura de 1, 4-butanodiamina (n = 2), una 1, la estructura 5-pentanodiamina (n = 3) o una estructura de 1, 6-hexanodiamina (n = 4) (en la que, en cada caso, una de las aminas es cuaternaria). Si menos de dos átomos de carbono separan los átomos de nitrógeno, en el que uno está cuaternizado, la pKa de la átomo de nitrógeno terciario restante cae fuera del intervalo de valores útiles y la estabilidad química se reduce (hidrólisis). Si más de seis átomos de carbono separan los átomos de nitrógeno, los pesos moleculares se vuelven excesivamente grandes, con poco cambio en la pKa.

Como se señala en el preámbulo, el compuesto tampón puede estar protonado o no protonado. Así, cuando k o j es 0, el átomo de nitrógeno terciario del compuesto tampón está no protonado, y cuando k o j o ambos es (son) 1, el átomo de nitrógeno terciario del compuesto tampón está protonado. Por supuesto, como se reconocerá, varios de los grupos G y / o R pueden estar en un estado protonado no protonado también. Sin embargo, cuando los compuestos tampón divulgados y reivindicados en la presente memoria se designan como protonados o no protonados, esta designación se refiere al estado del átomo de nitrógeno terciario (p. ej., amina), y si ha estado protonado. Se observa que, como en la química en general, cuando un compuesto no protonado, tal como una amina, se convierte en protonado, se considera que es un compuesto nuevo y diferente de lo que era el compuesto no protonado. Por ejemplo, los compuestos de aminas protonadas y desprotonadas generalmente tienen diferentes números CAS (Chemical Abstracts).

En los compuestos tampón de acuerdo con la presente invención, cada G<sup>1</sup>, G<sup>3</sup> y G<sup>5</sup> es un resto químico seleccionado independientemente del grupo -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, o es un componente de un resto químico cíclico. Los presentes inventores han descubierto que los compuestos tampón más versátiles y útiles de acuerdo con la presente invención son aquellos en los que cada uno de los G<sup>1</sup>, G<sup>3</sup> y G<sup>5</sup> es un grupo relativamente pequeño, hidrógeno, metilo o etilo. Si bien es posible que puedan usarse los grupos orgánicos más grandes, por ejemplo, propilo o butilo, dado que la longitud o el tamaño del grupo orgánico aumenta más allá de los grupos más pequeños, la utilidad de los compuestos tampón disminuye a medida que aumenta el peso molecular.

En los compuestos tampón de acuerdo con la presente invención, cada grupo G<sup>2</sup> y G<sup>4</sup> presente en el compuesto es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, y -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, o es un componente del resto químico cíclico. Los presentes inventores han descubierto que, al proporcionar este sustituyente con un mayor intervalo de variabilidad, se pueden obtener efectos adversos sobre las características de tamponamiento del compuesto tampón. Mediante la introducción de uno o más de los grupos -H, -

CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, and -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, las propiedades de la formación tamponamiento del compuesto se pueden ajustar y controlar de forma precisa. La definición anterior de G<sup>2</sup> y G<sup>4</sup> proporciona la posibilidad de que algunos grupos G<sup>2</sup> y G<sup>4</sup> en el compuesto sea uno o una mezcla de los grupos -CH<sub>2</sub>OH, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, y -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, mientras que otros de los grupos G<sup>2</sup> y G<sup>4</sup> en el compuesto que es uno o una mezcla de los grupos -H, -CH<sub>3</sub> and -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>.

En los compuestos tampón de acuerdo con la presente invención, cada grupo G<sup>6</sup> presente en el compuesto es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -OH, -CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, and -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Los presentes inventores han descubierto que, al proporcionar este sustituyente con un mayor intervalo de variabilidad, se pueden obtener efectos espectaculares sobre las características de tamponamiento del compuesto tampón. Mediante la introducción de uno o más de los -H, -OH, -CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, y -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, las propiedades de la formación tamponamiento del compuesto se pueden ajustar y controlar de forma precisa. Mediante la combinación de las variaciones proporcionadas anteriormente con el valor de n, el número de grupos G<sup>6</sup> en la molécula puede variar de cero a cuatro, y por lo tanto el número de grupos, en su caso, con excepción de -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> se puede controlar. La definición anterior de G<sup>6</sup> proporciona la posibilidad de que algunos grupos G<sup>6</sup> en el compuesto sea uno o una mezcla de los grupos -OH, -CH<sub>2</sub>OH, -OCH<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, y -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, mientras que otros de los grupos G<sup>6</sup> en el compuesto que es uno o una mezcla de los grupos -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>.

En los compuestos tampón de acuerdo con la presente invención, cada grupo R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> and R<sup>5</sup> puede seleccionarse independientemente para producir una variedad de compuestos, incluyendo uno o más o combinaciones de estructuras acíclicas, estructuras que contienen anillos carbocíclicos, anillos heterocíclicos, y estructuras bicíclicas, y estructuras que incluyen la introducción de grupos funcionales adicionales para cualquiera de los grupos R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> que no se utiliza de otro modo en la formación de estas variaciones, e incluyendo combinaciones de cualquiera de los anteriores. La siguiente divulgación cubre diversas opciones y combinaciones de las opciones, todos los cuales se pueden seleccionar adecuadamente para obtener una gama muy amplia de propiedades de tamponamiento, en todo el intervalo de pH, y que incluye algunos o todos los beneficios específicos descritos anteriormente en el resumen de la invención.

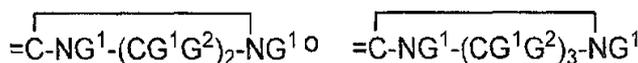
En los compuestos tampón de acuerdo con la presente invención, en algunas realizaciones, cada R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> es un resto químico seleccionado independientemente de CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -ciclohexilo, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-3</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-3</sub>N(CH<sub>3</sub>)C(O)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)NHCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> siendo m 0, 1, 2 o 3, o es un componente del resto químico cíclico, o R<sup>5</sup> es un resto químico -[CG<sup>7</sup>G<sup>8</sup>-(CG<sup>7</sup>G<sup>9</sup>)-CG<sup>7</sup>G<sup>8</sup>-H<sub>1</sub>NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>]<sup>+</sup>, en el que cada G<sup>7</sup> es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, cada G<sup>8</sup> es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, y -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, G<sup>9</sup> es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -OH, -OCH<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, y -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, r tiene valores enteros en el intervalo de 0 - 4, y j es 0 o 1, y cada R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> es un resto químico seleccionado independientemente de -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -ciclohexilo, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-3</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-3</sub>N(CH<sub>3</sub>)C(O)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)NHCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> siendo m 0, 1, 2 o 3. En lo anterior, los grupos G<sup>5</sup> y G<sup>6</sup> se definen como anteriormente en las definiciones generales de los otros grupos G. Los sustituyentes anteriores para R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se puede seleccionar de forma independiente y combinarse con cualquiera de las siguientes combinaciones de grupos R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> y G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup>, G<sup>5</sup> y G<sup>6</sup>, como se define en el presente documento.

Compuestos tampón ejemplares de acuerdo con las realizaciones anteriores incluyen estructuras como se muestra a continuación.

Como se ha señalado anteriormente, en algunas realizaciones, los diversos sustituyentes G y R se pueden combinar en restos químicos cíclicos. A continuación se describen diversos restos químicos cíclicos comprendidos dentro del ámbito de la presente invención. En realizaciones en las que el compuesto tampón de amonio cuaternario-amina comprende un resto químico cíclico, el resto químico cíclico es uno o más seleccionados de (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (g):

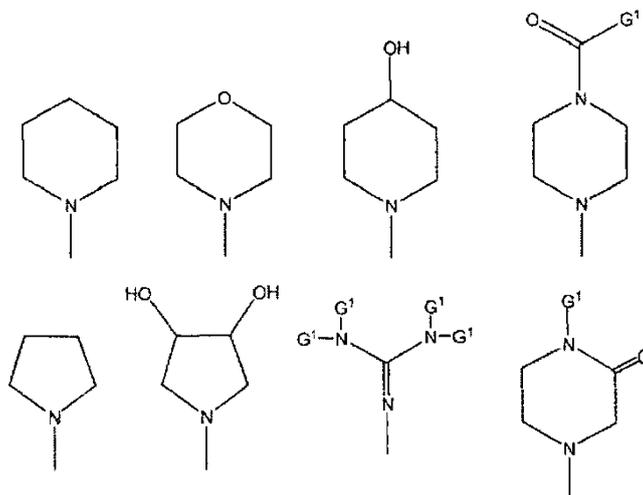
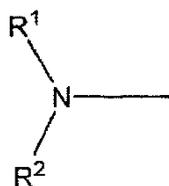
Grupo cíclico (a):

En los compuestos tampón de acuerdo con la presente invención, en algunas realizaciones (a) uno o más par de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, y R<sup>5</sup>, forma un solo resto químico de tal manera que el par R<sup>1</sup>/R<sup>2</sup> y/o el par R<sup>3</sup>/R<sup>4</sup> y/o el par R<sup>3</sup>/R<sup>5</sup> y/o el par R<sup>4</sup>/R<sup>5</sup> es individual e independientemente -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH(OH)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(C(O)G<sup>1</sup>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)N(G<sup>1</sup>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH(OH)CH<sub>2</sub>-, =C(NG<sup>1</sup>)<sub>2</sub>,



5 Así, de acuerdo con estas realizaciones, el par  $R^1 / R^2$  y / o el par  $R^3 / R^4$  y / o el par  $R^3 / R^5$  y / o el par  $R^4 / R^5$  individual e independientemente forma un anillo heterocíclico que contiene N, un anillo de morfolinio, o un grupo guanidinio. En los compuestos tampón de acuerdo con estas realizaciones, cualquiera o ambos del átomo de nitrógeno cuaternizado o del átomo de nitrógeno cuaternario puede ser parte de una estructura de anillo, o puede ser parte de un resto de guanidinio. En los compuestos tampón en estas formas de realización, los sustituyentes anteriores para  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  se puede seleccionar de forma independiente y combinarse con cualquiera de las definiciones anteriores de los grupos  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  y  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$ ,  $G^5$  y  $G^6$ .

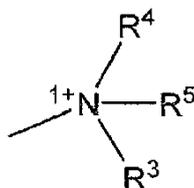
10 Compuestos tampón ejemplares de acuerdo con las realizaciones anteriores incluyen las siguientes, en los que, en la fórmula general para el compuesto de amonio cuaternario-amina presente, para el par  $R^1 / R^2$  el fragmento no protonado:



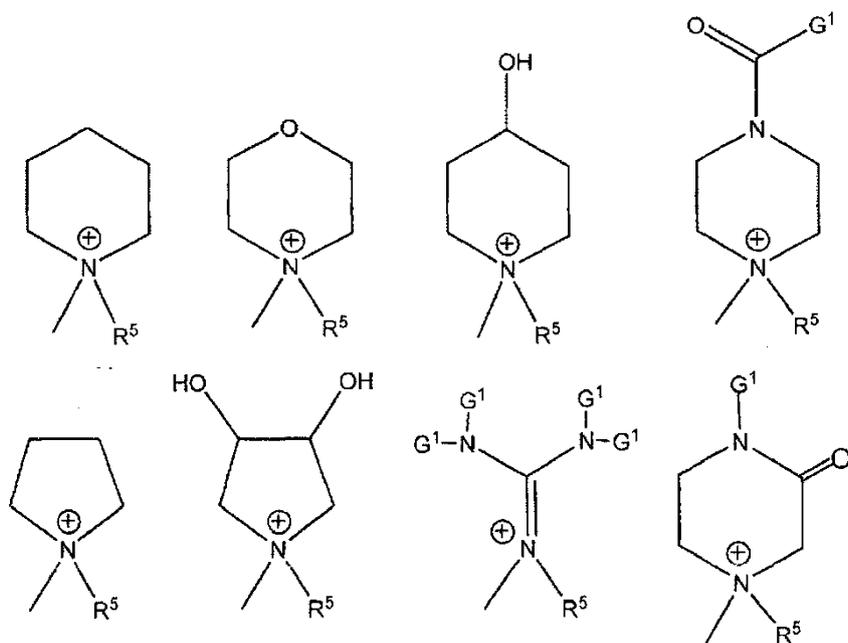
15 el par  $R^1 / R^2$  pueden formar los siguientes grupos ejemplares, y el resto del compuesto de amonio cuaternario-amina pueden ser como se describe en cualquiera de las combinaciones restantes.

Se reconoce que la amina de nitrógeno no protonada en los anteriores grupos ejemplares puede estar protonada, como se describe en otro lugar en el presente documento.

20 Compuestos tampón ejemplares de acuerdo con las realizaciones anteriores incluyen las siguientes, en los que, en la fórmula general para el compuesto de amonio cuaternario-amina presente, para el fragmento cuaternario:



25 el par  $R^3 / R^4$  (o, de manera equivalente, el par formado por  $R^3 / R^5$  o  $R^4 / R^5$ ) se puede combinar para formar los siguientes grupos ejemplares, y el resto del compuesto de amonio cuaternario-amina puede ser como se describe en cualquiera de las combinaciones restantes:

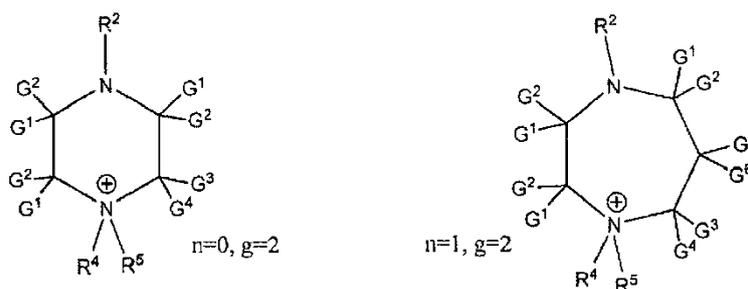


- 5 En algunas formas de realización, de acuerdo con las anteriores descripciones de emparejamiento, tanto el par  $R^1 / R^2$  como uno de los pares  $R^3 / R^4$ , o  $R^3 / R^4$  o  $R^3 / R^4$ , pueden formar un resto químico tal que ambos pares están presentes en el mismo compuesto tampón. Así, de acuerdo con estas realizaciones, tanto el par  $R^1 / R^2$  como uno de los pares de  $R^3 / R^4$ , o  $R^3 / R^5$  o  $R^4 / R^5$ , individual e independientemente pueden formar anillos heterocíclicos que contienen N multicíclicos y uno o ambos de los dos pares pueden formar un resto de guanidina, y cuando un par forma un grupo guanidinio, el otro par pueden formar cualquiera de los grupos cíclicos anteriores.
- 10 En todas las realizaciones anteriores de los pares  $R^1 / R^2$ ,  $R^3 / R^4$ ,  $R^3 / R^5$ , y  $R^4 / R^4$ , el resto del compuesto de amonio cuaternario-amina puede ser como se describe en otra parte en el presente documento, es decir, cualquier  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  desapareado y cada uno de los grupos  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$ ,  $G^5$  y  $G^6$ , y otras variables, se pueden seleccionar adecuadamente como se define en el presente documento.

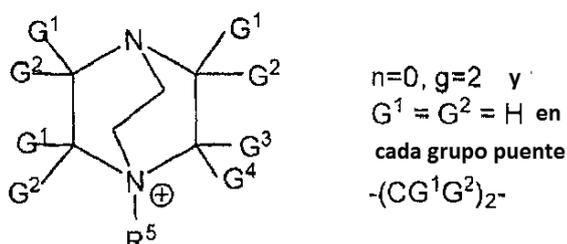
Grupo cíclico (b):

- 15 En los compuestos tampón de acuerdo con la presente invención, en algunas realizaciones, uno o más pares de  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  pueden formar un resto químico único de tal manera que uno o más de  $R^1 / R^3$ ,  $R^1 / R^4$ ,  $R^1 / R^5$ ,  $R^2 / R^3$ ,  $R^2 / R^4$  o  $R^2 / R^5$ , tomados como grupo combinado, es individual e independiente -  $(CG^1G^2)_g$  - siendo  $g$  2 o 3 y  $n$  es 0 o 1. Así, de acuerdo con estas realizaciones, los uno o más pares combinados, junto con el resto de la molécula, forman un anillo de seis miembros ( $g = 2$ ,  $n = 0$ ) o un anillo de siete miembros ( $g = 2$ ,  $n = 1$  o  $g = 3$ ,  $n = 0$ ), o un anillo de ocho miembros ( $g = 3$ ,  $n = 1$ ) que contiene tanto el átomo de nitrógeno no cuaternario como el átomo de nitrógeno cuaternario en el anillo o anillos formados de esta manera. Además, en una realización, cuando tanto el combinado  $R^1 / R^3$  como el combinado  $R^2 / R^4$  (o la combinación  $R^1 / R^4$  y el combinado  $R^2 / R^3$ ) son grupos  $-(CG^1G^2)_g$ , se forma un compuesto tampón bicíclico que puede contener anillos de 6, 7 u 8 miembros. En los compuestos tampón de acuerdo con estas realizaciones, ambos átomos de nitrógeno están incluidos en el anillo o anillos. En los compuestos tampón en estas formas de realización, los sustituyentes anteriores para  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  se puede seleccionar de forma independiente y combinarse con cualquiera de las definiciones anteriores de los grupos  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  y  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$ ,  $G^5$  y  $G^6$ .
- 25

Compuestos tampón ejemplares de acuerdo con las realizaciones anteriores incluyen os siguientes:



Un compuesto tampón bicíclico ejemplar de acuerdo con las realizaciones anteriores incluye la estructura siguiente:



5

En todas las realizaciones anteriores de los pares  $R^1/R^3$ ,  $R^1/R^4$ ,  $R^1/R^5$ ,  $R^2/R^3$ ,  $R^2/R^4$  o  $R^2/R^5$ , el resto del compuesto de amonio cuaternario-amina puede ser como se describe en otra parte en el presente documento, es decir, cualquier  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  desapareado y los grupos  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$ ,  $G^5$  y  $G^6$ , y otras variables, se pueden seleccionar adecuadamente como se define en el presente documento.

10

Grupo cíclico (c):

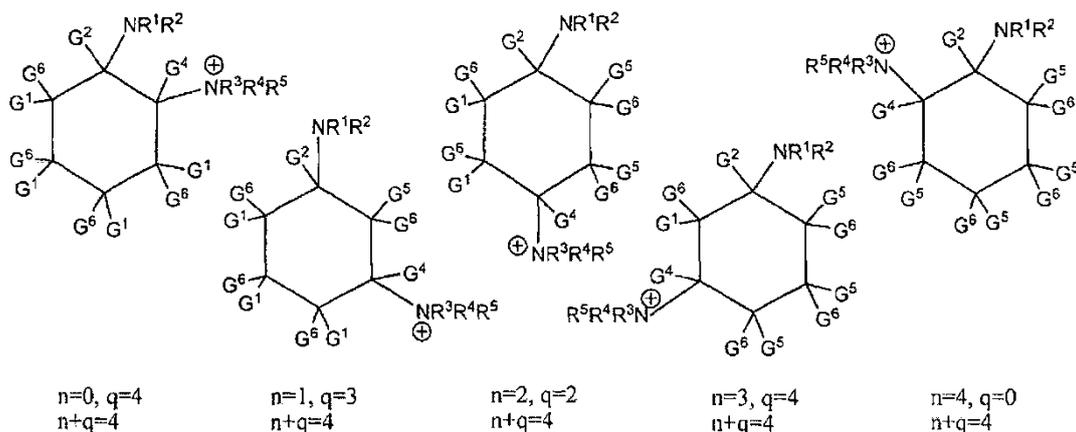
En los compuestos tampón de acuerdo con la presente invención, en algunas realizaciones, un par seleccionado de  $G^1$  y  $G^3$ ,  $G^2$  y  $G^4$ ,  $G^1$  y  $G^4$  o  $G^2$  y  $G^3$ , tomado como un par, pueden formar un solo resto químico  $-(CG^1G^6)_q-$  teniendo  $q$  valores enteros de 0-4,  $n$  como se definió anteriormente en la fórmula general, y la suma de  $q$  y  $n$  tiene valores enteros 3 o 4, y cuando  $q = 0$ ,  $-(CG^1G^6)_q-$  es un enlace sencillo carbono-carbono. Las estructuras formadas en estas realizaciones son anillos carbocíclicos de cinco miembros ( $q + n = 3$ ) o seis miembros ( $q + n = 4$ ). Como se observará, cuando  $n = 0$ , el grupo  $-(CG^1G^6)_q-$  grupo se convierte en un enlace sencillo carbono-carbono, los dos átomos de nitrógeno están separados por dos átomos de carbono, y cuando  $n = 1$ , los dos átomos de nitrógeno están separados por tres átomos de carbono. El número de  $G^6$  grupos será de 3 o 4, igual a la suma de ( $q + n$ ). En los compuestos tampón en estas formas de realización, los sustituyentes para  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  se puede seleccionar de forma independiente y combinarse con cualquiera de las definiciones independientes anteriores de los grupos  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$ ,  $G^5$  y  $G^6$  restantes. Los grupos  $G^1$  and  $G^6$  en los que los grupos  $-(CG^1G^6)_q-$  se definen independientemente como se ha indicado anteriormente para los grupos  $G^1$  y  $G^6$ .

15

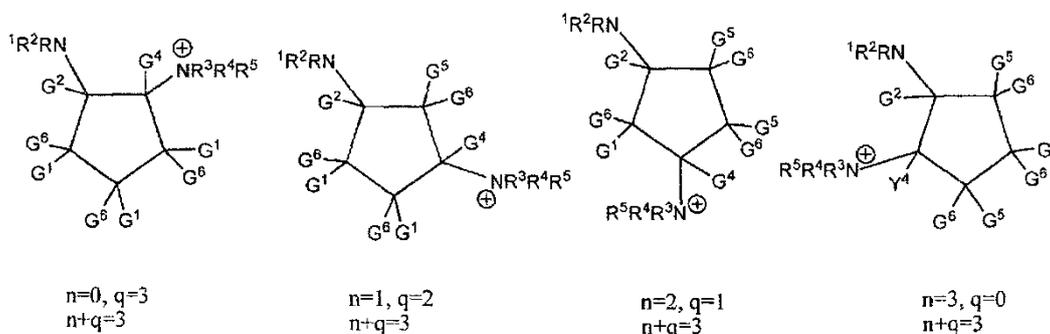
20

Compuestos tampón ejemplares de acuerdo con las realizaciones anteriores, cuando  $G^1$  y  $G^3$ ,  $G^2$  y  $G^4$ ,  $G^1$  y  $G^4$  o  $G^2$  y  $G^3$  se toman como un par como se describe, incluyen los siguientes anillos de seis miembros:

25



e incluyen los siguientes anillos de cinco miembros:



5

En todas las realizaciones anteriores de los pares  $G^1$  y  $G^3$ ,  $G^2$  y  $G^4$ ,  $G^1$  y  $G^4$  o  $G^2$  y  $G^3$ , el resto del compuesto de amonio cuaternario-amina puede ser como se describe en otra parte en el presente documento, es decir, los grupos  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  y los grupos  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$ ,  $G^5$  y  $G^6$  desapareados y otras variables, se pueden seleccionar adecuadamente como se define en el presente documento.

10

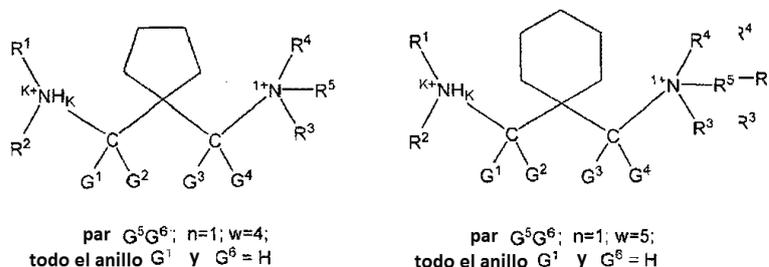
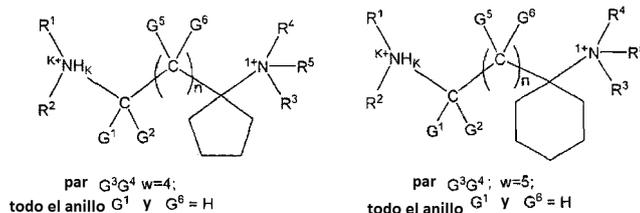
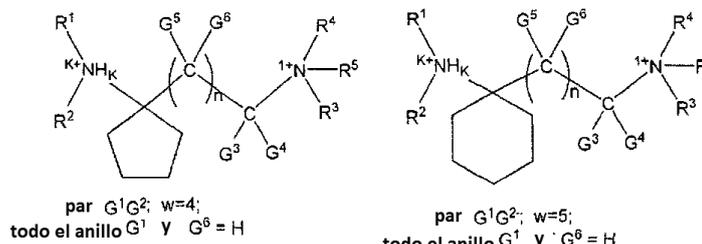
Grupo cíclico (d):

En los compuestos tampón de acuerdo con la presente invención, en algunas realizaciones, uno o más pares de  $G^1$  y  $G^2$ ,  $G^3$  y  $G^4$ , y / o  $G^5$  y  $G^6$  forman un resto químico único de tal manera que el par es individual e independientemente  $-(CG^1G^6)_w$ , teniendo  $w$  los valores enteros 4-5. Como se observará, las estructuras formadas en estas realizaciones son anillos carbocíclicos de 5 ó 6 miembros en los que ni el nitrógeno de la amina ni el nitrógeno cuaternario son miembros del anillo formado de este modo, aunque cada átomo de nitrógeno puede ser un miembro del otro anillo, dependiendo de las definiciones de las variables en la fórmula general anterior para el compuesto tampón de amonio cuaternario-amina. Como se observará, en el par  $G^5$  y  $G^6$ ,  $n$  debe ser uno o más, y si  $n$  es mayor que uno se plantea la posibilidad de tener múltiples anillos  $-(CG^1G^6)_w$ . En una realización, cuando  $n$  es dos o más, todas o menos de los grupos  $-(CG^5G^6)_n$  pueden ser del(los) anillos  $-(CG^1G^6)_w$ .

15

20

Compuestos tampón ejemplares de acuerdo con las realizaciones anteriores cuando  $G^1$  y  $G^2$ ,  $G^3$  y  $G^4$ , o  $G^5$  y  $G^6$  se toman como un par como se describe, incluyen los siguientes los siguientes anillos de cinco miembros ( $w = 4$ ) y seis miembros ( $w = 5$ ):

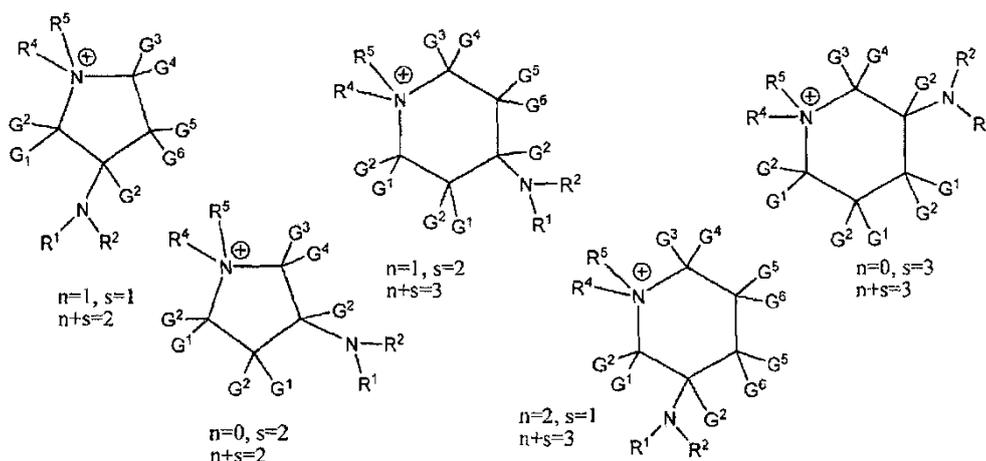


- 5 En todas las realizaciones anteriores de los pares  $G^1$  y  $G^2$ ,  $G^3$  y  $G^4$ , y/o  $G^5$  y  $G^6$ , el resto del compuesto de amonio cuaternario-amina puede ser como se describe en otra parte en el presente documento, es decir, los grupos  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  y los grupos  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$ ,  $G^5$  y  $G^6$  desapareados y otras variables, se pueden seleccionar adecuadamente como se define en el presente documento.

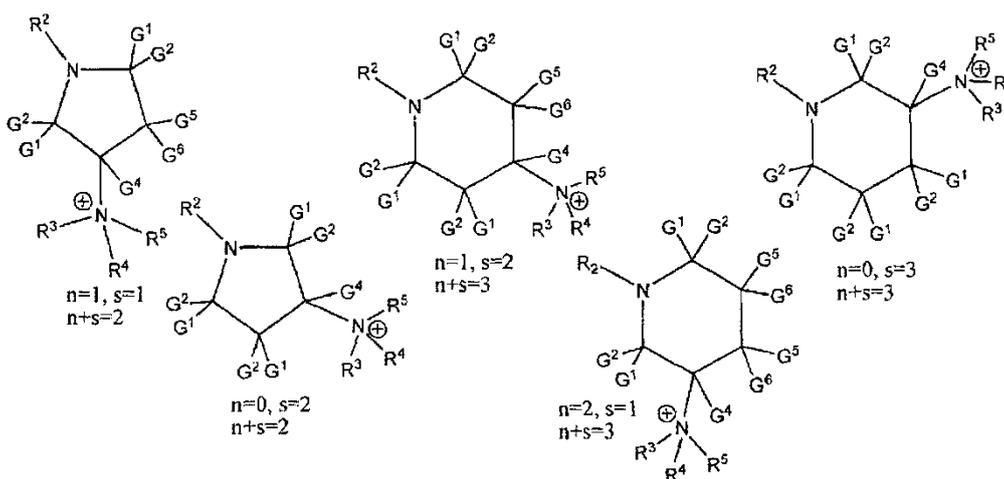
Grupo cíclico (e):

- 10 En los compuestos tampón de acuerdo con la presente invención, en algunas realizaciones, uno o más pares de  $R^1$  y  $G^3$ ,  $R^1$  y  $G^4$ ,  $R^2$  y  $G^3$ ,  $R^2$  y  $G^4$ ,  $R^3$  y  $G^1$ ,  $R^3$  y  $G^2$ ,  $R^4$  y  $G^1$ ,  $R^4$  y  $G^2$ ,  $R^5$  y  $G^1$ , y/o  $R^5$  y  $G^2$  forman un solo resto químico de tal manera que el par es individual e independientemente  $-(CG^1G^2)_s$  -teniendo s los valores enteros 1 - 3, teniendo n los valores enteros 0-2 y la suma de s y n tiene los valores enteros 2-3. Se observa que, en estas realizaciones, el intervalo de n se limita a 0-2, en lugar de a 0-4 para la fórmula general y otras diversas realizaciones.
- 15 Las estructuras formadas en estas realizaciones son anillos heterocíclicos de cinco miembros ( $s + n = 2$ ) o seis miembros ( $s + n = 3$ ) que contienen nitrógeno, en el que cualquiera, pero no ambos del átomo de nitrógeno no cuaternario o el átomo de nitrógeno cuaternario puede estar en cualquier anillo dado. Es decir, de acuerdo con las realizaciones de grupo cíclico (e), no hay ninguna realización en la que tanto el átomo de nitrógeno no cuaternario y el átomo de nitrógeno cuaternario están en el mismo anillo. En algunas formas de realización, cuando un par de cada uno de los dos grupos, por ejemplo, tanto  $R^1 / G^3$  como  $R^3 / G^1$ , son grupos  $-(CG^1G^2)_s$ , se puede formar una estructura bicíclica en la que los anillos pueden ser de cinco, seis o siete miembros, dependiendo de las opciones para los valores de s y n. Como se observará, cuando  $n = 0$ , los dos átomos de nitrógeno están separados como mínimo por dos átomos de carbono, y la molécula no contiene el grupo  $G^6$  y cuando  $n = 1$ , los dos átomos de nitrógeno están separados como mínimo por tres átomos de carbono y la molécula contiene un grupo  $G^6$ . En los compuestos tampón
- 20 en estas formas de realización, los sustituyentes para  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  restantes se pueden seleccionar de forma independiente y combinarse con cualquiera de las definiciones independientes anteriores de los grupos  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$ ,  $G^5$  y  $G^6$  restantes. Los grupos  $G^1$  and  $G^2$  en los que los grupos  $-(CG^1G^2)_s$  se definen independientemente como se ha indicado anteriormente para los grupos  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$  y  $G^5$ .

- 30 Los compuestos tampón ejemplares de acuerdo con las realizaciones anteriores, cuando uno de  $R^1$  y  $G^3$ ,  $R^1$  y  $G^4$ ,  $R^2$  y  $G^3$ ,  $R^2$  y  $G^4$ , se toman como un par y forman un resto químico de tal manera que el par es un grupo  $-(CG^1G^2)_s$  -, incluyen lo siguiente:



5 Los compuestos tampón ejemplares de acuerdo con las realizaciones anteriores, cuando uno de  $R^3$  y  $G^1$ ,  $R^3$  y  $G^2$ ,  $R^4$  y  $G^1$ , o  $R^4$  y  $G^2$ , se toman como un par y forman un resto químico de tal manera que el par es un grupo  $-(CG^1G^2)_s-$ , incluyen lo siguiente:

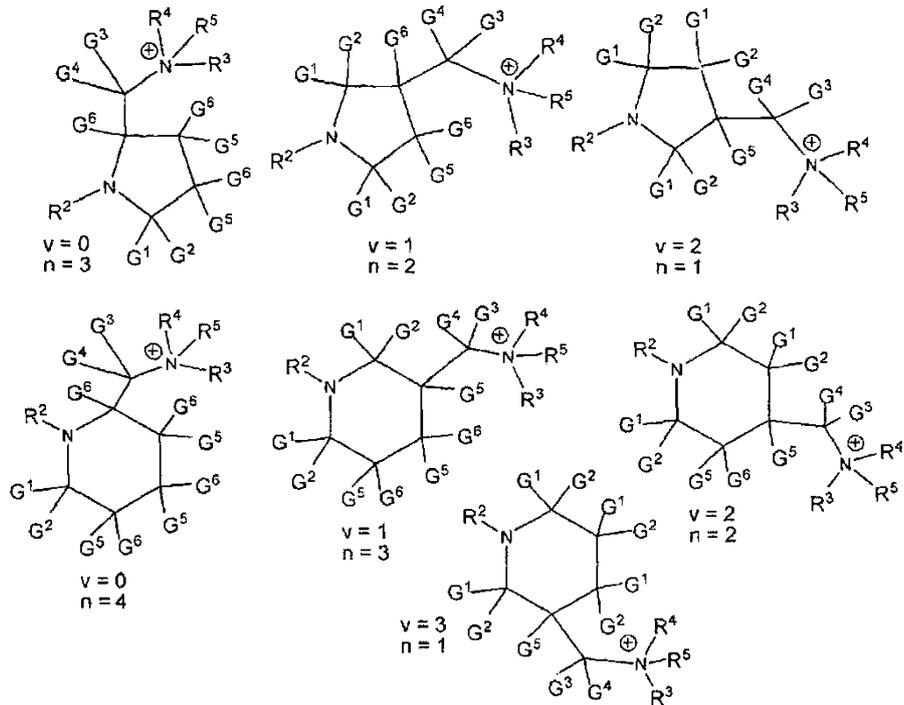


10 En todas las realizaciones anteriores de los pares de  $R^1$  y  $G^3$ ,  $R^1$  y  $G^4$ ,  $R^2$  y  $R^2$  y  $G^4$ , y/o  $R^3$  y  $G^1$ ,  $R^3$  y  $G^2$ ,  $R^4$  y  $G^1$ ,  $R^4$  y  $G^2$ ,  $R^5$  y  $G^1$ , o  $R^5$  y  $G^2$ , el resto del compuesto de amonio cuaternario-amina puede ser como se ha descrito en otra parte en el presente documento, es decir, los grupos  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  y el  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$ ,  $G^5$  y  $G^6$  no apareados, y otras variables, puede seleccionarse adecuadamente como se define en el presente documento.

Grupo cíclico (f):

15 En los compuestos tampón de acuerdo con la presente invención, en algunas realizaciones, uno o más par de uno o más pares de  $R^1$  y  $G^5$ ,  $R^1$  y  $G^6$ ,  $R^2$  y  $G^5$ ,  $R^2$  y  $G^6$ ,  $R^3$  y  $G^5$ ,  $R^3$  y  $G^6$ ,  $R^4$  y  $G^5$ ,  $R^4$  y  $G^6$ ,  $R^5$  y  $G^5$ , y/o  $R^5$  y  $G^6$  forma un resto químico único de tal manera que el par es individual e independientemente  $-(CG^1G^2)_v-$  teniendo  $s$  valores enteros 0-3, teniendo  $n$  tiene valores enteros 1-4 y la suma de  $v$  y  $n$  tiene valores enteros de 3 - 4 y cuando  $v = 0$ ,  $-(CG^1G^2)_0-$  es un enlace sencillo carbono-carbono. Las estructuras formadas en estas realizaciones son anillos heterocíclicos de cinco miembros, de seis miembros o más que contienen nitrógeno, en el que cualquiera, pero no ambos del átomo de nitrógeno no cuaternario o el átomo de nitrógeno cuaternario puede estar en cualquier anillo dado. Es decir, de acuerdo con las realizaciones de grupo cíclico (e), no hay ninguna realización en la que tanto el átomo de nitrógeno no cuaternario y el átomo de nitrógeno cuaternario están en el mismo anillo.

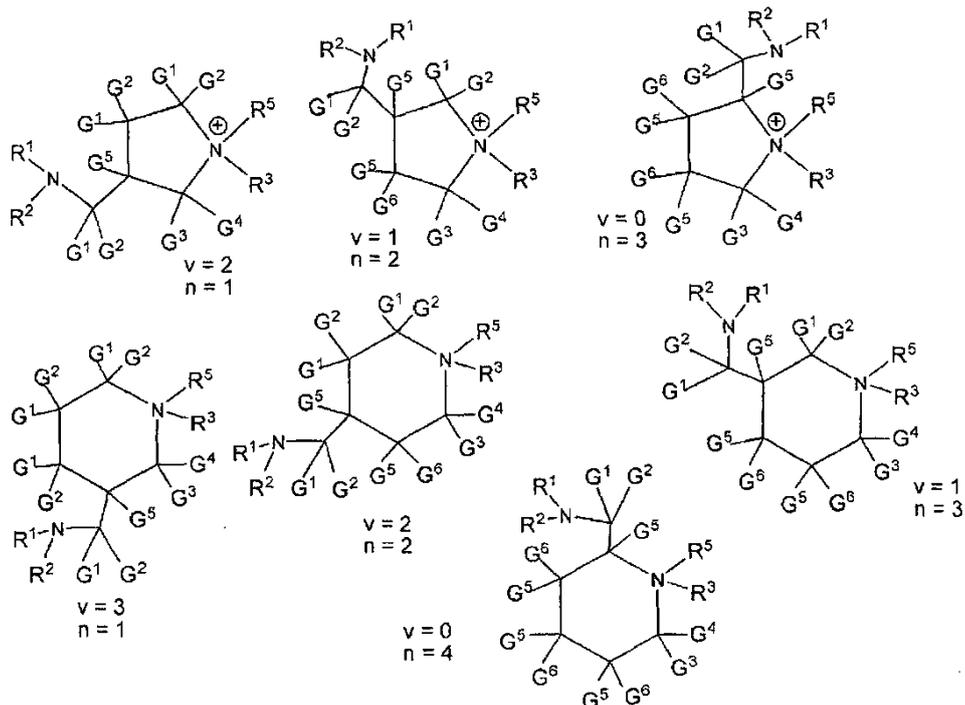
25 Los compuestos tampón ejemplares de acuerdo con las realizaciones anteriores, cuando uno  $R^1$  y  $G^5$ ,  $R^1$  y  $G^6$ ,  $R^2$  y  $G^5$ ,  $R^2$  y  $G^6$ , se toman como un par y forman un resto químico de tal manera que el par es un grupo  $-(CG^1G^2)_v-$ , para los pares que incluyen  $R^1$  (similar para los pares que incluyen  $R^2$ ), incluyen compuestos que tienen las siguientes estructuras:



5 Como se desprende de estas fórmulas estructurales particulares anteriores, en estas realizaciones, el átomo de nitrógeno terciario está en el anillo, y el nitrógeno cuaternario está en una cadena lateral unida al anillo.

Los compuestos tampón ejemplares de acuerdo con las realizaciones anteriores, cuando uno de  $R^3$  and  $G^5$ ,  $R^3$  y  $G^6$ ,  $R^4$  y  $G^5$ ,  $R^4$  y  $G^6$ ,  $R^5$  y  $G^5$ , y/o  $R^5$  y  $G^6$ , se toman como un par y forman un resto químico de tal manera que el par es un grupo  $-(CG^1G^2)_z$ , incluyen lo siguiente:

10

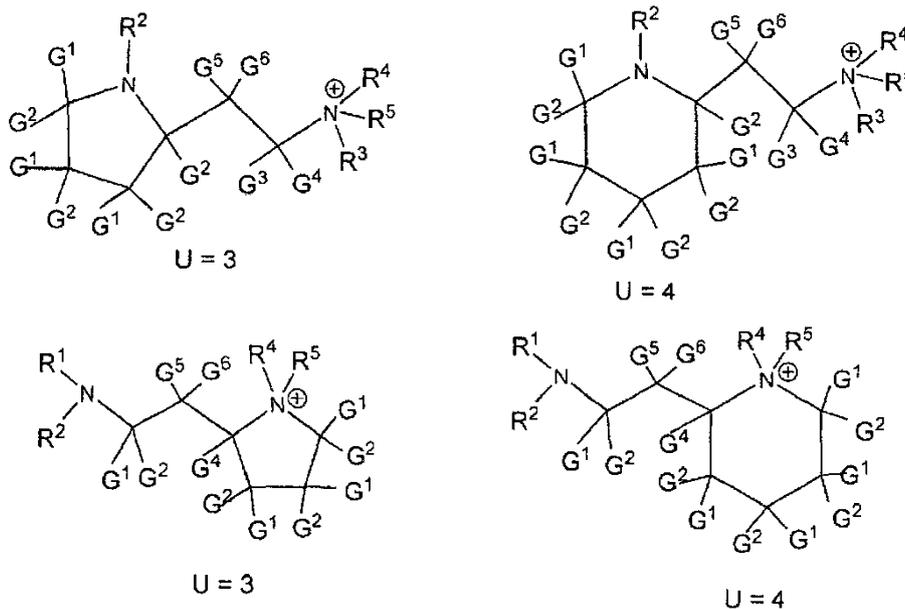


En todas las realizaciones anteriores de los pares  $R^1$  y  $G^5$ ,  $R^1$  y  $G^6$ ,  $R^2$  y  $G^5$ ,  $R^2$  y  $G^6$ ,  $R^3$  y  $G^5$ ,  $R^3$  y  $G^6$ ,  $R^4$  y  $G^5$ ,  $R^4$  y  $G^6$ ,  $R^5$  y  $G^5$ , y/o  $R^5$  y  $G^6$ , el resto del compuesto de amonio cuaternario-amina puede ser como se ha descrito en otra parte en el presente documento, es decir, los grupos  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  y los grupos  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$ ,  $G^5$  y  $G^6$  no apareados, y otras variables, puede seleccionarse adecuadamente como se define en el presente documento.

5 Grupo cíclico (g):

En los compuestos tampón de acuerdo con la presente invención, en algunas realizaciones, uno o más pares de  $R^1$  y  $G^1$ ,  $R^1$  y  $G^2$ ,  $R^2$  y  $G^1$ ,  $R^2$  y  $G^2$ ,  $R^3$  y  $G^3$ ,  $R^3$  y  $G^4$ ,  $R^4$  y  $G^3$ ,  $R^4$  y  $G^4$ ,  $R^5$  y  $G^3$ , y/o  $R^5$  y  $G^4$  forma un único resto químico tal que el par es individual e independientemente  $-(CG^1G^2)_u$ , teniendo u valores enteros 3-4 y teniendo n valores enteros 0-4:

10



15

En todas las realizaciones anteriores de los pares  $R^1$  y  $G^1$ ,  $R^1$  y  $G^2$ ,  $R^2$  y  $G^1$ ,  $R^2$  y  $G^2$ ,  $R^3$  y  $G^3$ ,  $R^3$  y  $G^4$ ,  $R^4$  y  $G^3$ ,  $R^4$  y  $G^4$ ,  $R^5$  y  $G^3$ , y/o  $R^5$  and  $G^4$ , el resto del compuesto de amonio cuaternario-amina puede ser como se ha descrito en otra parte en el presente documento, es decir, los grupos  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  y los grupos  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$ ,  $G^5$  y  $G^6$  no apareados, y otras variables, puede seleccionarse adecuadamente como se define en el presente documento.

20

El compuesto de amonio cuaternario-amina, por definición, incluye una carga positiva en el átomo de nitrógeno cuaternario. Esta carga positiva debe equilibrarse por un resto químico cargado negativamente para obtener la electroneutralidad para el compuesto como un todo. Como se utiliza en el presente documento, el término "electroneutralidad" se refiere al principio reconocido en la técnica de que un compuesto químico debe tener una carga neta de cero, y un compuesto que tiene tal carga neta cero es electroneutro. Por lo tanto, el compuesto de amonio cuaternario-amina como un todo debe tener la electroneutralidad. Para obtener dicha electroneutralidad, cualquiera que sea carga neta que está en la porción de amonio cuaternario-amina del compuesto global debe ser una carga neta cero, por ejemplo, ser internamente electroneutra como un zwitterión, o estar asociado con un grupo designado en el presente documento "CI" (" contraion ") para equilibrar la carga neta diferente de cero en la porción de amonio cuaternario-amina del compuesto en general. Como se comprenderá, puesto que la porción de amonio cuaternario-amina puede tener una carga neta positiva o una carga neta negativa, dependiendo del número y el tipo de sustituyentes cargados presentes, es decir, la protonación o la no protonación del átomo de nitrógeno de la amina, el número de grupos sustituyentes aniónicos, y si estos grupos sustituyentes aniónicos están protonados en la pK del compuesto de amonio cuaternario-amina.

25

30

35

En consecuencia, de acuerdo con la presente invención, el CI es un contraión de no interferencia o una mezcla de contraiones, según sea necesario para mantener la electroneutralidad del compuesto global de amonio cuaternario-amina. La carga neta global en el compuesto de amonio cuaternario-amina es igual al valor de una magnitud  $(j + k - z + 1)$ , en la que z es igual al valor absoluto de la suma numérica de todas las cargas negativas en cada resto carboxilato, sulfonato y fosfonato contenido dentro de  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $G^2$ ,  $G^4$ ,  $G^6$ ,  $G^8$ ,  $G^9$ , y j y k son 0 para el compuesto no protonado, y j y k son 1 para el compuesto totalmente protonado, como se ha definido anteriormente.

El número de grupos de **CI**, se designa "d" en la fórmula general anterior. De acuerdo con la presente invención, d es igual a  $|j + k - z + 1|$  (es decir, el valor absoluto de la cantidad  $(j + k - z + 1)$ ) para contraiones monovalentes,  $|j + k - z + 1| / 2$  para contraiones divalentes,  $|j + k - z + 1| / 3$  para contraiones trivalentes,  $|j + k - z + 1| / 4$  para contraiones tetravalentes. El signo (es decir, + o -) de la cantidad  $(z - j - k - 1)$  refleja la carga en el contraion, lo que significa que cuando  $(z - j - k - 1)$  es negativo o menos (-), **CI** es un anión, y cuando  $(z - j - k - 1)$  es positivo o más (+), **CI** es un catión y cuando  $(z - j - k - 1)$  es cero, entonces d es cero y no hay contraión (**CI**).

En una realización, **CI** es un anión no interferente o una mezcla de aniones no interferentes seleccionados de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{OCH}_3^-$ ,  $\text{HCO}_2^-$ ,  $\text{CH}_3\text{CO}_2^-$ ,  $\text{CF}_3\text{CO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{HSO}_4^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{CH}_3\text{OCO}_2^-$ ,  $\text{CH}_3\text{OSO}_3^-$ ,  $\text{CH}_3\text{SO}_3^-$ ,  $\text{CF}_3\text{SO}_3^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_3^-$ ,  $\text{CH}_3\text{PO}_3\text{H}^-$ ,  $\text{HPO}_3^{2-}$ ,  $\text{CH}_3\text{PO}_3^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ .

10 En una realización, **CI** es un catión no interferente o una mezcla de cationes no interferentes seleccionados de:  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Tl}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{VO}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Eu}^{2+}$ ,  $\text{UO}_2^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Sc}^{3+}$ ,  $\text{Y}^{3+}$ ,  $\text{BiO}^+$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Ce}^{3+}$ ,  $\text{Pr}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ,  $\text{Sm}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$ ,  $\text{Ho}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Lu}^{3+}$  y  $\text{Th}^{4+}$ .

15 En una realización, **CI** es un catión no interferente o una mezcla de cationes no interferentes seleccionados de: una alquil- o hidroxialquil-amina primaria protonada, alquil- o hidroxialquil-amina secundaria protonada, alquil- o hidroxialquil-amina terciaria protonada, una alquil-, alquilen-, hidroxialquil- o hidroxialquilen-diamina diprotonada, un compuesto de alquil- o hidroxialquil-amonio cuaternario, un compuesto de alquil- o hidroxialquil-sulfonio, un compuesto de alquil- o hidroxialquil-sulfoxonio, un compuesto de alquil- hidroxialquil-amonio cuaternario y un compuesto alquil-, alquilen-, hidroxialquil- o hidroxialquilen-amonio dicuaternario, en el que el los grupos alquil-, alquilen-, hidroxialquil- e hidroxialquilen- anteriores contienen de uno a tres átomos de carbono, y en los que el catión o la mezcla de cationes no es un compuesto tampón de amonio cuaternario-amina como se define en el presente documento.

En una realización, **CI** anión tampón no interferente, una mezcla de aniones tampón no interferentes, un catión no tampón no interferente o una mezcla de cationes tampón no interferentes, con valores de  $\text{pK}_a$  en el intervalo de 1 - 13, y en el que **CI** no es un compuesto tampón de amonio cuaternario-amina como se define en el presente documento.

25 En una realización, **CI** anión tampón no interferente, una mezcla de aniones tampón no interferentes, un catión no tampón no interferente o una mezcla de cationes tampón no interferentes, con valores de  $\text{pK}_a$  en el intervalo de 1 - 13, y en el que **CI** no es un compuesto tampón de amonio cuaternario-amina como se define en el presente documento y tiene una carga que confiere la electroneutralidad al compuesto general tampón.

30 Debe ser fácilmente evidente para la persona experta que el compuesto de amonio cuaternario-amina divulgado en el presente documento es capaz de formar un número de diferentes isómeros con la misma conectividad de los átomos. Por lo tanto, la presente divulgación abarca cada isómero diastereomérico, cada cis / isómero trans y cada isómero enantiomérico que puede estar formado por los diversos sustituyentes descritos en el presente documento.

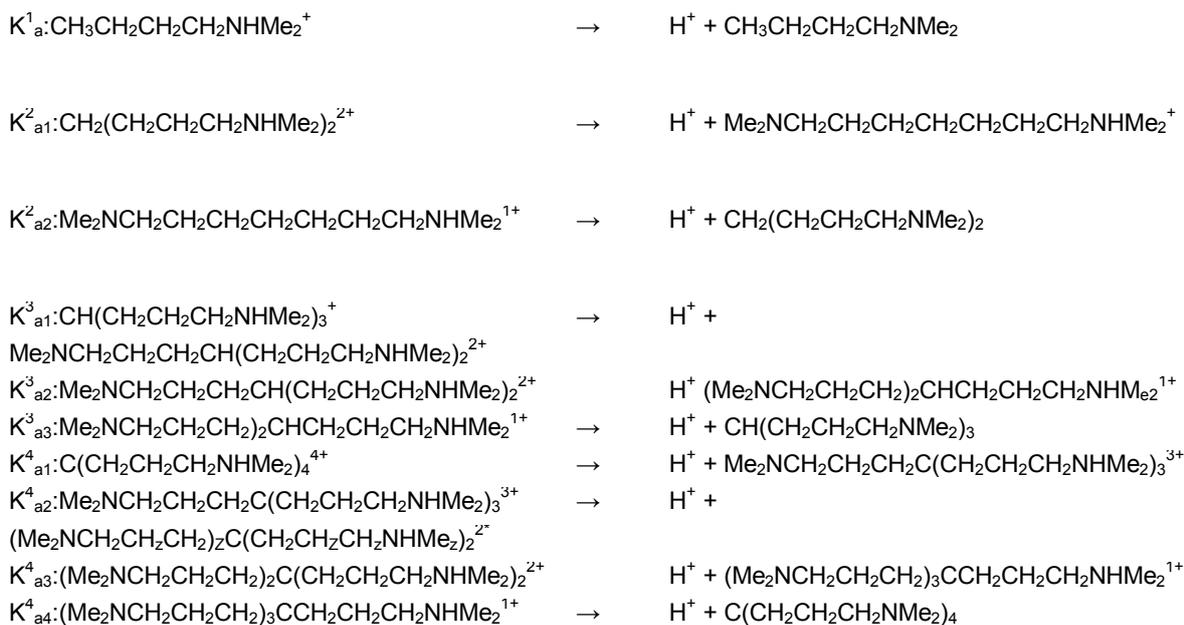
35 Como se ha indicado, en una realización, la presente invención se refiere a un procedimiento de tamponar una composición química o biológica, incluyendo la adición a la composición de una cantidad tampón efectiva de al menos uno de los compuestos de amonio cuaternario-amina anteriormente definidos, en el que el átomo de nitrógeno de la amina puede estar protonado o no protonado. Los compuestos de amonio cuaternario-amina anteriormente definidos son solubles en agua y en sistemas acuosos, tales como composiciones biológicas, y en las composiciones químicas que son acuosas (basadas en agua) y no acuosas (disolvente orgánico polar). En el uso de las composiciones de compuesto tampón divulgados en el presente documento, el compuesto se puede utilizar sustancialmente de la misma manera que cualquier otro compuesto tampón, como es conocido y entendido en la técnica.

#### Dependencia de la temperatura de $\text{pK}_a$ :

45 Dado que los compuestos tampón se utilizan a menudo a diferentes temperaturas, típicamente en el intervalo de 5-45 °C, es deseable disponer de un tampón cuyo cambio de  $\text{pK}_a$  con la temperatura es pequeño, así que el cambio de pH es pequeño como los cambios de temperatura. En base a los sistemas análogos, cabe esperar que los tampones descritos en el presente documento serán ligeramente más ácidos ( $\text{pK}_a$  inferior) a temperaturas más altas con  $\Delta\text{H}$  de la disociación en el intervalo de +2,5 a +6,0 kcal / mol. Esto corresponde a una disminución de 0,09 hasta 0,22 unidades de  $\log K_a$  por 15 grados de aumento de la temperatura (20 °C a 35 °C).

#### Efectos estadísticos

50 En el diseño de compuestos tampón, los efectos estadísticos deben tenerse en cuenta, además de los temas habituales de (a) la afinidad intrínseca de protones y (b) los efectos de solvatación selectivos. Esto se ilustra para una serie de compuestos de poliaminas protonadas siguientes. Tenga en cuenta que para una molécula dada, los valores  $\text{pK}_a$  de amonio (a) son esencialmente los mismos debido a que los sitios ácidos son químicamente idénticos o están relacionados por simetría, y (b) los grupos amino están esencialmente aislados unos de otros (interacción  $<0,2$  unidades  $\log K_a$ ), ya que están separados por siete átomos de carbono. Sin embargo, estos efectos estadísticos siguen siendo operativo (a) cuando los múltiples sitios de amonio son químicamente diferentes pero "accidentalmente" el mismo (valores de  $\text{pK}_a$  muy cercanos) y (b) cuando los sitios de amonio están espacialmente más cerca y por lo tanto pueden estar "acoplados químicamente".



$$pK^1_a = -\log K - \log [1/1] = pK_a$$

$$pK^2_{a1} = -\log K - \log [2/1] = pK_a - 0,30$$

$$pK^2_{a2} = -\log K - \log [1/2] = pK_a + 0,30$$

$$pK^3_{a1} = -\log K - \log [3/1] = pK_a - 0,48$$

$$pK^3_{a2} = -\log K - \log [2/2] = pK_a$$

$$pK^3_{a3} = -\log K - \log [1/3] = pK_a + 0,48$$

$$pK^4_{a1} = -\log K - \log [4/1] = pK_a - 0,60$$

$$pK^4_{a2} = -\log K - \log [3/2] = pK_a - 0,18$$

$$pK^4_{a3} = -\log K - \log [2/3] = pK_a + 0,18$$

$$pK^4_{a4} = -\log K - \log [1/4] = pK_a + 0,60$$

- En los ejemplos dados anteriormente, "K" es la constante de disociación ácida para el ion dimetilamonio alquilo prototípico. Por lo tanto, además de otros factores, los efectos estadísticos solo provocan que los valores de pK<sub>a</sub> medidos se separen de los iones poliamonio poliprotónicos por 0,5- 1 unidades log de K<sub>a</sub> o más. En el caso de los iones de di-amonio, los dos valores de pK<sub>a</sub> serán de aproximadamente 0,6 unidades log de K<sub>a</sub> se separarán más a medida que los dos grupos de amonio empiezan a interactuar cuando están espacialmente más cerca unos de otros. Para iones di-amonio, los factores estadísticos se maximizan cuando los dos afinidades intrínsecas de protones son exactamente las mismas. En este caso, a medida que las afinidades intrínsecas de los protones se separan, los efectos estadísticos se reducen, y cuando las dos afinidades intrínsecas de los protones difieren en 2 unidades log de K<sub>a</sub> o más, los efectos estadísticos pueden ignorarse.

### Principios del diseño del tampón para la invención

- Los principales conceptos en el diseño de compuestos tampón de pH de amonio cuaternario-amina se describen a continuación. La presencia de un grupo amonio cuaternario (cuat) en una molécula que también contiene un grupo amina reducirá la pK<sub>a</sub> de la amina como se mide en medios acuosos y medios no acuosos polares. Las causas y la magnitud de los cambios no se entienden completamente, pero los resultados finales son predecibles y útiles en el diseño del tampón independientemente de otras consideraciones teóricas. Se piensa que los efectos operativos son (1) efectos electrostáticos a través del espacio de la carga positiva, (2) efectos del grupo cuat a través del enlace de electrones y (3) un cambio en la solvatación de la amina libre con respecto a la amina protonada. Los tres efectos como se describe generalmente conducen a una cierta reducción de la pK<sub>a</sub> observada en la molécula de interés. Trimetilamina (pK<sub>a</sub>= 9,8) y pentametilguanidina (pK<sub>a</sub>= 13,8) se utilizan en el presente documento como aminas prototípicas. La cantidad de reducción de la pK<sub>a</sub> depende de (1) el número de grupos cuat, (2) la distancia del grupo(s) cuat partir de la amina y (3) la rigidez de la molécula que contiene el grupo cuat y amina en posición más fija con

respecto a la otra. La aplicación de estos principios se ilustra a continuación para metilaminas. Los números aproximados expuestos se aplican principalmente a los derivados de trimetilamina en agua a 25 °C en modesta fuerza iónica ( $\mu = 0,1$ ).

$\text{Me}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_n-\text{NMe}_3^+$	Cambio en la $\text{pK}_a$ de $\text{Me}_2\text{N}$ -(unidades log K)
$n = 6$ (-CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> CH <sub>2</sub> -)	~-0,3
$n = 5$ (-CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -)	~-0,5
$n = 4$ (-CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -)	~-0,9
$n = 4$ (-CH <sub>2</sub> CH(OH)CH(OH)CH <sub>2</sub> -)	~-1,1
$n = 4$ (trans -CH <sub>2</sub> CH = CHCH <sub>2</sub> -)	~-1,3
$n = 3$ (-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -)	~-1,7
$n = 3$ (-CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> -)	~-1,9
$n = 2$ (-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -)	~-3,7
$n = 1^*$ (-CH <sub>2</sub> -)	~-10,5 Estabilidad hidrolítica limitada
N,N',N'-Me <sub>3</sub> -Homopiperazinio	~-3,6
N,N',N'-Me <sub>3</sub> -Piperazinio <sup>+</sup>	~-5,5
N-Me-Diazabicyclo[2,2,2]octano <sup>+</sup>	~-6,7

- 5 Las tendencias similares se aplican a guanidinas penta-sustituídas, pero la magnitud de los efectos de un solo grupo cuat proximal en el imino-nitrógeno no es tan grande. Aunque sin desear quedar ligado a la teoría, se cree que estas observaciones empíricas son el resultado de la distribución de electrones y la distribución de carga resultante sobre la totalidad del núcleo de N<sub>3</sub>C guanidino en la guanidina protonada y libre. Por lo tanto, una sola sustitución de amonioalquilo ( $\text{Me}_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_n$ ,  $n = 2 - 4$ ) en el nitrógeno imino cambia los valores de  $\text{pK}_a$  de aproximadamente -1,9 ( $n = 2$ ), -0,9 ( $n = 3$ ) y -0,5 ( $n = 4$ ) unidades log K. Del mismo modo, una única sustitución de amonioalquilo en el amino-nitrógeno distal de una guanidina causa cambios más pequeños en los valores de  $\text{pK}_a$  de aproximadamente -0,9 ( $n = 2$ ), -0,4 ( $n = 3$ ) y -0,2 ( $n = 4$ ) unidades log K. La modulación adicional de los valores de  $\text{pK}_a$  de las guanidinas se puede producir mediante la mejora o reducción de la planaridad del núcleo C<sub>5</sub>N<sub>3</sub>C mediante el uso de sustituyentes voluminosos o estructuras cíclicas. El uso de un anillo no planar de cinco miembros en 2-imino-1, 3-dimetilimidazolina puede causar una reducción en la  $\text{pK}_a$  de la guanidina resultante. La  $\text{pK}_a$  de un grupo guanidino se puede ajustar mediante la adición de uno o más grupos amonioalquilo a un solo guanidina penta-sustituída ya sean en el imino-nitrógeno o en uno o ambos amino-nitrógenos. Adicionalmente, los grupos amonioalquilo zwitteriónicos ( $\text{X}(\text{CH}_2)_k\text{Me}_2^+(\text{CH}_2)_n$ ,  $n = 2 - 4$ ,  $k = 1 - 3$ ,  $-\text{X} = ^-\text{O}_2\text{C}$ ,  $^-\text{O}_3\text{S}$ ) tienen efectos sobre la  $\text{pK}_a$  similares a los correspondientes grupos amonioalquilo no zwitteriónico sin embargo, los grupos de prevenir la acumulación de carga total en la molécula. En una realización, uno puede construir guanidinas penta-sustituído con estructuras cíclicas que también contienen grupos de amonio cuaternario que a su vez modulan la  $\text{pK}_a$  de la molécula.

15 Sólo los sistemas de anillos pequeños (anillo de 6/7 miembros) se muestran en la tabla anterior. Tenga en cuenta que el derivado de piperazina cíclico (-5,5) tiene una  $\text{pK}_a$  mucho más reducida en comparación con el derivado no cíclico de etilendiamina (-3,7), sin embargo, el derivado de homopiperazina cíclico (-3,6) no es muy diferente del derivado de etilendiamina. Algunas estructuras monocíclicas conducen a  $\text{pK}_a$  reducida, mientras que otras no lo hacen. Se pueden usar tamaños del anillo grandes y pequeños con resultados variables.

30 Una vez que una estructura de diamina o triamina monocuaternizada se elige con un  $\text{pK}_a$  cerca de la gama deseada, la  $\text{pK}_a$  puede modularse aún más mediante la sustitución de uno o más grupos metilo en el nitrógeno de la amina o guanidina imino-nitrógeno con sustituyentes neutros o aniónicos (véase más adelante). Adicionalmente, dos grupos metilo en el mismo nitrógeno de la amina pueden ser reemplazados con un único grupo bifuncional para formar una estructura cíclica como se ha descrito anteriormente. Cuando los grupos que se muestran a continuación se unen al nitrógeno cuaternario en lugar del nitrógeno de la amina, que tienen poco o ningún efecto sobre la  $\text{pK}_a$  de la amina (s), y en una primera aproximación, su efecto sobre el valor de la  $\text{pK}_a$  de la amina de nitrógeno puede ignorarse en gran medida.

Grupo neutro R	Cambio en la $\text{pK}_a$ cuando el metilo está sustituido por R sobre N (unidades log K)
-H (1 únicamente)	~-1,0
-C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> (ciclohexilo, 1 únicamente)	~+0,9
-CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (1 únicamente)	~+0,7



Grupo aniónico	Cambio en la pK <sub>a</sub> (unidades log K)
-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+0,1 (<-1,0)
-CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0,0 (~2,0)
-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+0,1 (~3,3)
-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+0,2 (-3,9)
-CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-0,1 (-3,8)
-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+0,3 (~4,2)
-CH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+1,1 (~0,4, ~5,2)
-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+1,2 (~1,1, ~6,2)
-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+1,3 (~1,6, ~6,9)
-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	+0,9 (~1,9, ~7,3)

5 El concepto de "aditividad grupo" para la estimación de los valores de pK<sub>a</sub> se deben aplicar sólo a una clase restringida de compuestos relacionados. Los factores que se dan en el presente documento son ilustrativos en cuanto a que son únicos a esta aplicación, son aproximados, se aplican principalmente a las aminas terciarias simples, y a los propios factores no son verdaderamente aditivos.

10 Para ilustrar las inexactitudes en el concepto de aditividad grupo, se proporciona la siguiente tabla para mostrar las variaciones en el cambio en el factor de la pK<sub>a</sub> para la sustitución de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) con un grupo 2-hidroxietilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH) en diferentes aminas del tipo, RNMe<sub>2</sub>, para las aminas que contienen varios grupos R. Aunque un valor de -0.6 se utiliza a veces para -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, para compuestos de amina-cuat un valor de -0.9 parece ser más adecuado.

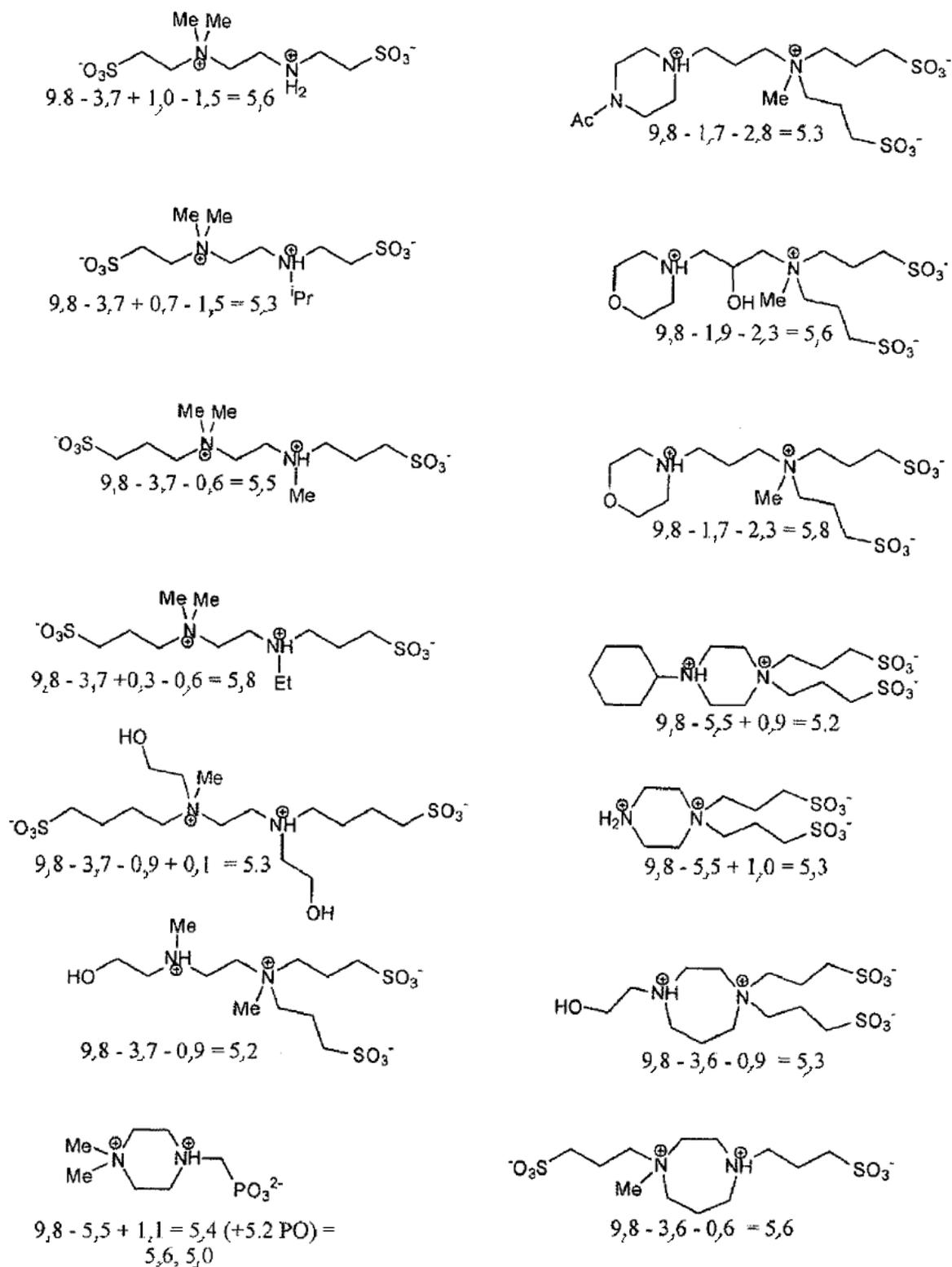
Cambio en la pK<sub>a</sub> para el reemplazo de R en RN(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> en comparación con RN(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH:

R	Factor
-CH <sub>3</sub>	-0,6
-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-0,6
-CH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub>	-0,6
-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	-0,7
-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> H	-0,7
-CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H	-0,85
-H	-0,9
-CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> NMe <sub>3</sub> <sup>+</sup>	-0,9

A pesar de las imprecisiones, este sistema "basado en reglas" puede ser muy útil en la selección de un grupo selecto de moléculas tampón de tipo amonio cuaternario-amina deseado dentro de un intervalo de pK<sub>a</sub>.

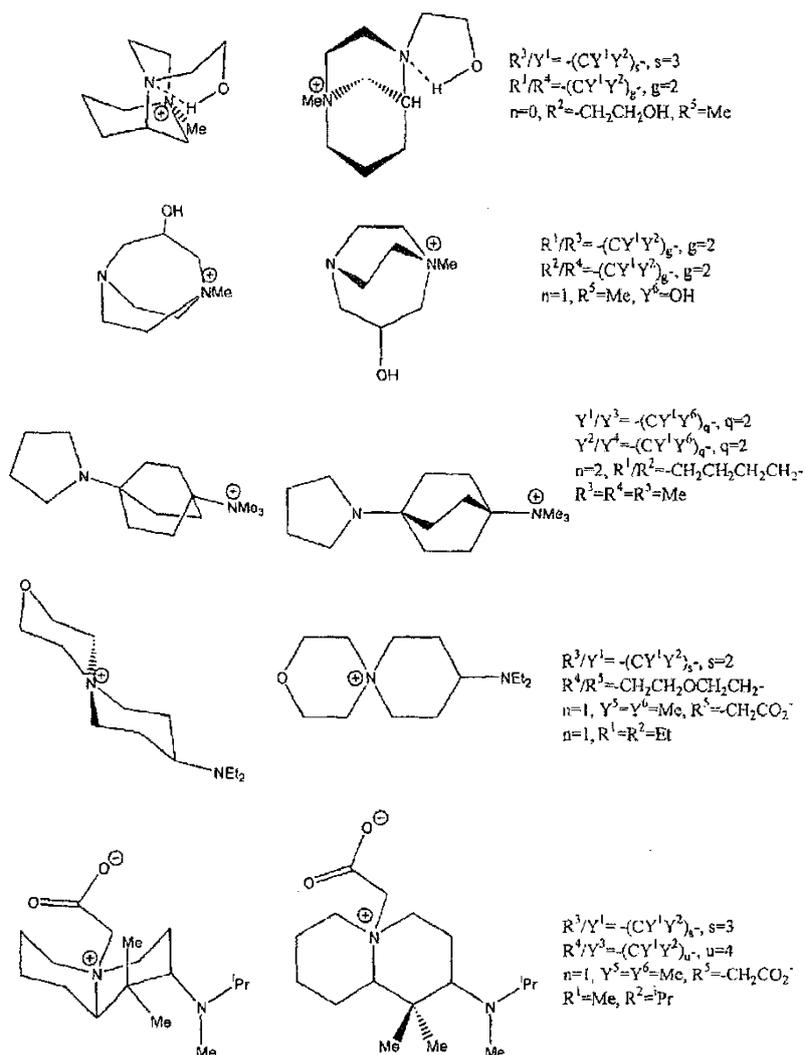
### 15 Ilustración del diseño de tampón de acuerdo con la invención:

20 El proceso de diseño se ilustra a continuación para crear un compuesto tampón aniónico de amina-cuat (0/1<sup>-</sup>) con un valor de pK<sub>a</sub> aproximado en el intervalo de 5,1 -5,9. Para los tampones que contienen residuos carboxilato y fosfonato, sus valores de pK<sub>a</sub> estimados también están incluidos. Tenga en cuenta que algunos de los valores de pK<sub>a</sub> estimados, los valores se desplazan algo debido a los efectos estadísticos cuando los valores intrínsecos de pK<sub>a</sub> son cercanos. Tenga en cuenta también que algunos de estos compuestos putativos tienen una potencial capacidad tampón a múltiples valores de pK<sub>a</sub> espaciados. Se empieza con la pK<sub>a</sub> de trimetilamina (9,8), y a continuación el cambio adecuado en los factores de la pK<sub>a</sub> basándose en las tablas anteriores del cambio en la pK<sub>a</sub> para varios grupos se suman o restan.



**Tampones de amina-cuaternario cíclicos:**

- 5 A partir de la estructura lineal básica se pueden crear muchas estructuras monocíclicas y multicíclicas. Algunas son fáciles de sintetizar; otras no. Algunas son más caras de hacer; otras son menos caras. Algunas son fáciles de purificar; otras no. Algunas tienen propiedades de tampón únicas; otras son redundantes. Algunos tienen estructuras flexibles; otras son más rígidas. A modo de ilustración, a continuación se muestran cinco estructuras multicíclicas. Los "grupos G" que no se han designado contienen entidades  $-CH_2-$ . Para cada una de las siguientes estructuras, se muestran dos representaciones alternativas de lado a lado de la misma molécula.



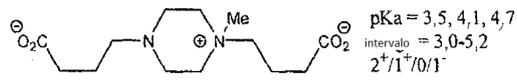
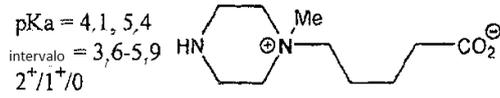
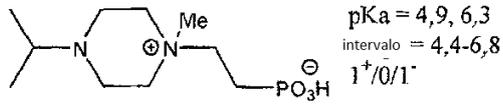
5

### Compuestos tampón de amplia gama

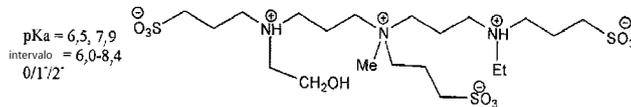
Los compuestos de amonio cuaternario-amina descritos en el presente documento pueden diseñarse con dos o más sitios con múltiples valores de pK<sub>a</sub> espaciados adecuadamente. Los intervalos de tamponamiento solapantes permiten la construcción de compuestos tampón de amplio intervalo (de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 unidades log K) con propiedades de carga variables. Utilizando los principios descritos anteriormente, las moléculas tampón pueden diseñarse con grupos carboxilato o grupos fosfonato (pK<sub>a2</sub>) o con un segundo grupo amina (R<sup>5</sup>) de manera que múltiples valores de pK<sub>a</sub> están separados por aproximadamente 1 -2 unidades de log K. Las estimaciones de los intervalos de tamponamiento se realizan restando 0,5 de la pK<sub>a</sub> inferior y añadiendo 0,5 a la pK<sub>a</sub> superior. Las siguientes estructuras químicas ilustran compuestos de amina cuaternaria que tienen útiles propiedades de tamponamiento en todo el intervalo. Tenga en cuenta que la monocuaternización del nitrógeno central de compuestos triamina conduce a tampones de intervalo amplio con algunas de las propiedades indeseables de las poliaminas ordinarias.

20

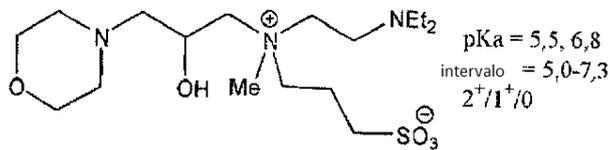
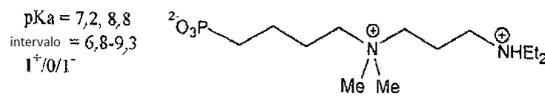
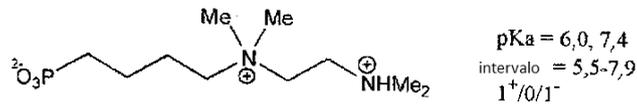
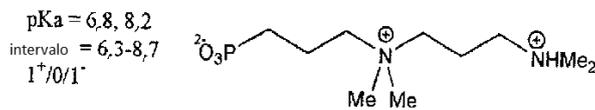
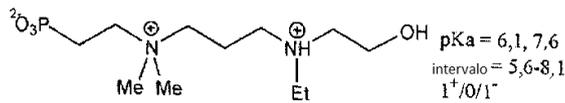




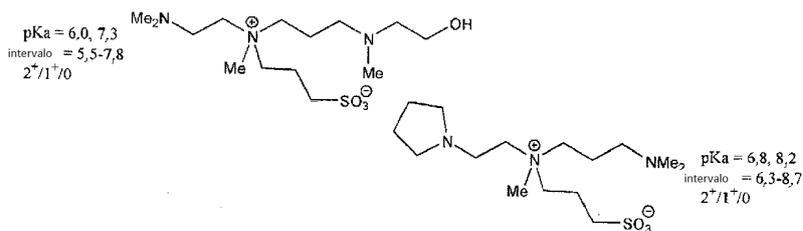
Estructuras adicionales se muestran a continuación

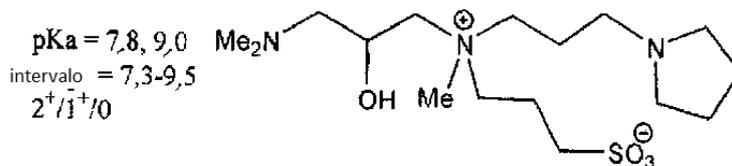


5



10





### Síntesis de tampones de aminas-cuat:

- Debido a sus estructuras asimétricas, los compuestos de amina-cuat requieren un cuidado especial en la preparación. Sin embargo, los procedimientos sintéticos conocidos, cuando se aplican correctamente, pueden conducir a la producción de compuestos de amina-cuat en el rendimiento y la pureza razonable.

### Monoalquilación de diaminas simétricas:

- Como entenderán los expertos en la técnica, la exposición con monoalquilación es para que la reacción proceda, sin embargo se evita la dialquilación. Puede ser necesaria alguna experimentación para optimizar las condiciones para una reacción dada. Se elige un disolvente en el que los materiales de partida son solubles, pero en el que la sal monoalquilada o zwitterión sea insoluble. La adición lenta del agente de alquilación a un exceso de la diamina en agitación, por ejemplo, a partir de 1:10, o quizás 1:3 y hacia una relación molar<sup>1</sup>:1,1 reducirá la posibilidad de dialquilación. Este proceso de adición es particularmente importante cuando se utilizan gases reactivos. Si la segunda reacción de alquilación es suficientemente lenta o se ha inhibido, a veces se pueden usar relaciones molares de casi 1: 1. Se eligen tiempos de reacción razonables no rápidos y una temperatura de reacción mínima de modo que haya una exotermia mínima; temperaturas más altas generalmente estimulan la dialquilación. La adecuada selección de los disolventes puede dar velocidades de reacción razonables y una dialquilación reducida. Por ejemplo, disolventes tales como éter dietílico y / o acetona estimulan la monoalquilación porque el producto monoalquilado normalmente precipita en estos disolventes y similares. En muchos casos, la monoalquilación inhibe la dialquilación en diversos grados. Por ejemplo, la dimetilación de N,N,N',N'-tetrametil-1,2-etanodiamina se inhibió fuertemente mientras que la dimetilación de N, N, N', N'-tetrametil-1, 6-hexanodiamina solo se inhibe moderadamente. En general, cuanto más cerca estén los átomos de nitrógeno en la diamina objetivo, más fácil es obtener monoalquilación. Aplicaciones específicas de estas directrices generales se proporcionan en los ejemplos de síntesis que figuran a continuación. Véase, por ejemplo, el ejemplo 5b.

### Monoalquilación de diaminas asimétricas:

- Las diaminas terciarias asimétricas presentan un problema adicional porque hay dos posibles isómeros monoalquilados. En algunos casos, puede llevarse a cabo una monoalquilación limpia produciendo un solo isómero y poca dialquilación cuando una de las aminas terciarias está impedida estéricamente. La alquilación regioselectiva de un grupo dimetilamino es suficientemente más rápida que los grupos dietilamino o metilciclohexilamino-que la monoalquilación limpia.

### Protección / desprotección de diaminas asimétricas:

- La protección y desprotección de los compuestos intermedios y productos de aminas asimétricas es una metodología sintética bien establecida. Sin embargo, se evita generalmente porque introduce dos etapas sintéticas adicionales. Sin embargo, la síntesis y cristalización de compuestos de amonio cuaternario de bencilo son tan convenientes, y la eliminación del grupo protector de bencilo por hidrogenación catalítica es tan eficiente y conveniente que esta secuencia de reacción puede ser útil.

### Ensamblaje de la amina-cuat a partir de un compuesto cuat y una amina:

- Ocasionalmente, los compuestos amino-cuat reactivos o compuestos cuat-alquilantes se sintetizan o se adquieren fácilmente. En este caso, las partes de la amina-cuat se preparan de forma independiente y después o se juntan formando un compuesto de amina-cuat no asimétrica.

### Cristalización selectiva:

- Las solubilidades de los dicaciones orgánicos y los monocaciones orgánicos relacionados en disolventes orgánicos pueden ser bastante diferentes. La detección selectiva de disolventes orgánicos puede dar lugar a un medio de recristalización en el que la indicación cristaliza en la solución mientras que el monocación permanece en solución o viceversa. Esto es particularmente útil para los compuestos zwitteriónicos en disolventes tales como metanol, etanol absoluto, isopropanol o, a veces, acetona y acetonitrilo. Se ajusta el pH (ácido, neutro, básico) de modo que el producto deseado esté en su forma neutra global; esto reduce la solubilidad en disolventes orgánicos y conduce a la cristalización de la solución mientras que las especies cargadas (impurezas) permanecerán en solución. Este proceso puede ser una manera conveniente para separar el producto monoalquilado neutro de los materiales de partida

cargados solubles y el producto dialquilado. Del mismo modo, el pH puede reajustarse para solubilizar el producto deseado, pero no subproductos indeseados que luego se eliminan mediante filtración.

Otro procedimiento de recristalización útil es suspender el producto deseado con agitación, etanol caliente absoluto o mezclas de etanol/isopropanol. Lentamente se añaden pequeñas cantidades de agua destilada hasta que el compuesto de amina-cuat apenas se disuelve en la mezcla de disolvente caliente que puede filtrarse y después se deja enfriar lentamente hasta la temperatura ambiente y luego a 4 °C. A menudo se producen bonitos cristales del producto monocuatenario purificado.

**Ejemplo 1:** Preparación de Bromuro de 2-(3-trimetilamonio)propil)-1,1,3,3-tetrametilguanidina bromhidrato (76, fw = 376,19)

26,61 g de bromuro de (3-bromopropil)trimetilamonio (100 mmol, fw = 261,01) se suspenden en 200 ml de acetonitrilo en agitación (agitación magnética) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Se añaden 34,56 g de 1,1,3,3-tetrametilguanidina recién destilada (300 mmol, fw = 115,18) y la suspensión se agita a temperatura ambiente durante la noche (18 horas). Durante este tiempo, la mezcla de reacción se vuelve homogénea. La reacción se calienta a 70 °C durante dos horas para dirigir la reacción hasta su finalización. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente; el lado interior del matraz de vidrio se raspó para inducir la cristalización, y después la mezcla se agita a temperatura ambiente durante alrededor de tres horas durante las cuales los cristales comienzan a formarse. Se añaden 100 ml de acetona a la mezcla en agitación, y después se agita durante la noche (18 horas) a temperatura ambiente hasta completar la cristalización. La mezcla se filtra y el producto cristalino blanco se lava con 25 ml de acetonitrilo seguido de acetona. El producto higroscópico se seca haciendo pasar nitrógeno seco a su través seguido de secado en un horno de vacío a 50 °C durante la noche (18 horas). Este proceso proporciona un producto (19,6 g, rendimiento del 60%, FW = 295,28) que es típicamente 90-92% de pureza mediante HPLC, siendo las principales impurezas bromuro de tetrametilguanidinio y el subproducto "dialquilado". El lavado con acetonitrilo (25 ml) se añade a la solución de filtrado junto con 125 ml de acetona. Esta mezcla se agita de nuevo a temperatura ambiente durante 24-36 horas para dar una segunda cosecha de cristales que se filtran, se lavan con acetona y se secan como antes, obteniéndose 10,4 g (26%) de producto adicional (74-76% de pureza mediante HPLC). Rendimiento total aislado es 86%.

La recristalización se realiza usando etanol caliente. Se disuelven 20,0 g de producto bruto libre de base (85-95% de pureza) o 25,5 g de producto bruto bromhidrato en 30 ml de etanol absoluto caliente. Cuidadosamente se hace burbujear HBr gaseoso en la solución caliente de etanol hasta que el pH es <0,0 1 (papel de pH), y luego se continuó durante 1-2 minutos, con aumento de la temperatura asociado debido a la naturaleza exotérmica del burbujeo de HBr gaseoso en etanol absoluto. Se deja que el matraz cubierto se enfríe hasta la temperatura ambiente durante un periodo de aproximadamente 3 horas. Se forman preciosos cristales blancos. Si los cristales no se forman, el interior del matraz de vidrio puede rayarse brevemente con una espátula de metal (acero inoxidable) para inducir cristalización. El matraz se enfría a continuación durante la noche a 4 °C. Los cristales blancos se filtran rápidamente a temperatura ambiente usando un filtro de vidrio sinterizado, se lavan con 25 ml de acetona / i-propanol (50/50 v / v) y después con acetona pura. Debido a que el producto es delicuescente, está protegido de la humedad en el aire usando una manta de nitrógeno seco. El producto se seca en un horno de vacío durante la noche a 50 °C y se almacena sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en un vaso desecador. Este procedimiento de recristalización produce 17,5 g (76% de rendimiento de recristalización) de producto con una pureza mediante HPLC de 99,0% -99,8% cuando la pureza inicial es aproximadamente 90%.

**Ejemplo 2 (Procedimiento 2):** Preparación de Cloruro de N(2-(1',3'-dimetilimidazolin-2'-iminato)etil)trimetilamonio clorhidrato (77, fw = 271,24).

27,73 g de cloruro de (2-aminoetil)trimetilamonio (200 mmol, fw = 138,64) se suspenden en 480 ml de acetonitrilo seco en agitación (10°C) (agitación magnética) en un matraz Erlenmeyer de 1.000 ml. La reacción se lleva a cabo bajo una atmósfera de N<sub>2</sub> seco. Se añaden 33,82 g de cloruro de 2-cloro-1,3-dimetilimidazolinio (200 mmol, fw = 169,06) como un sólido en tres porciones iguales durante un periodo de 30 minutos. La mezcla se agita a 10 °C durante 30 minutos durante los cuales se añaden 26,11 g de diisopropiletilamina seca (202 mmol, fw = 129,25) gota a gota. La mezcla de reacción se agita y se calienta lentamente a temperatura ambiente (23 °C) durante un periodo de aproximadamente 30 minutos. Finalmente, la mezcla de reacción se calienta a reflujo (~ 80 °C) durante aproximadamente tres horas. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, a la mezcla de reacción se añaden 8,40 g de LiOH H<sub>2</sub>O (200 mmol, fw = 41 0.96) en 240 ml de etanol absoluto, que se agita a continuación a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se filtra a través de vidrio sinterizado, y los disolventes y la amina libre se eliminan al vacío usando un evaporador rotatorio. La mezcla se disuelve en 400 ml de etanol absoluto, se calienta a 70 °C durante 30 minutos, después se enfría a temperatura ambiente y después el disolvente se elimina de nuevo a vacío. Finalmente, la mezcla se disuelve en una cantidad mínima de etanol absoluto caliente (80- 100 ml), se enfría a temperatura ambiente y luego se añade HCl gaseoso cuidadosamente hasta que el pH es ácido (pH <10,0 usando papel de pH). Se añaden 50 ml de acetona y la mezcla se deja en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas y después a 4 °C durante la noche (18 horas). La mezcla se filtra y el producto cristalino blanco se lava con acetona seguido de éter dietílico. El producto higroscópico se seca haciendo pasar nitrógeno seco a su través seguido de secado en un horno de vacío a 50 °C durante la noche (18 horas). Este procedimiento produce un producto (42,8 g, 79%) que tiene una pureza de ~95 % mediante HPLC.

La recristalización se realiza usando etanol caliente. 40,0 g del producto clorhidrato bruto se disuelven en 60 ml de etanol absoluto caliente. Cuidadosamente se hace burbujear HCl gaseoso en la solución caliente de etanol hasta que el pH es <0,0 1 (papel de pH), y luego se continúa durante 1 -2 minutos. Recuerde que la introducción de burbujas de HCl gaseoso en etanol absoluto es un proceso exotérmico.. Se deja que el matraz cubierto se enfríe hasta la temperatura ambiente durante un periodo de aproximadamente 3 horas. Se forman cristales blancos. El matraz se enfría a continuación durante la noche a 4 °C. Los cristales blancos se filtran rápidamente a temperatura ambiente usando un filtro de vidrio sinterizado, se lavan rápidamente con 50 ml de acetona / i-propanol (50/50 v / v) y después con meter dietílico. Debido a que el producto es delicuescente, está protegido de la humedad en el aire usando una manta de nitrógeno seco. El producto se seca en un horno de vacío durante la noche a 50 °C y se almacena sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en un vaso desecador. Este procedimiento de recristalización produce 31,5 g (83 % de rendimiento de recristalización) de producto con una pureza mediante HPLC de 98,5 % -99,5 % cuando la pureza inicial es aproximadamente 95 %.

**Ejemplo 3 (Procedimiento 3):** Preparación de N,N',N'-trimetil-N,N'-bis(3-sulfopropil)-etilendiamonio, sal di-interna (66, fw = 346,47).

20,44 g de N, N, N'-trimetiletilendiamina recién destilada (200 mmol, fw = 102,18) y 120 ml de acetonitrilo de grado reactivo seco se colocan en un matraz de 250 ml Erlenmeyer tapado y con una barra de agitación magnética. La mezcla de reacción se enfría a aproximadamente 10 °C. 49,32 g de 1,3- propanosultona (404 mmol, fw = 122,14) se separan en cuatro porciones iguales de 12,33 g cada una, y la primera porción se añade en porciones a la mezcla reacción en agitación a una velocidad tal que la temperatura no aumente por encima de los 20 °C (aproximadamente 30 min.). Después, la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 120 minutos. Una pequeña muestra (10 µl) de la mezcla de reacción se toma para el análisis de HPLC, y después se añade la segunda porción de 12,33g de la propanosultona utilizando el mismo procedimiento. La mezcla de reacción se agita de nuevo a temperatura ambiente durante 120 minutos tiempo durante el cual la mezcla de reacción se separa en dos capas. La mezcla de reacción se agita para crear una suspensión homogénea, y una segunda muestra representativa de 10 µl de la mezcla de reacción se toma para el análisis HPLC. La mezcla de reacción en agitación se vuelve completamente homogénea después de añadir 26,11 g de diisopropiletilamina seca (202 mmol, fw = 129,25). La tercera porción de 12,33 g de propanosulfona se añade a la mezcla de reacción enfriada en agitación de nuevo usando el mismo procedimiento de adición. Después, la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 120 minutos. Una tercera muestra de 10 µl de la mezcla de reacción se toma para el análisis HPLC. La cuarta porción de 12,33 g de propanosultona se añade de una sola vez a la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agita a continuación a temperatura ambiente durante aproximadamente 22 horas. Finalmente, la mezcla de reacción se calienta brevemente a 50 °C (aproximadamente 20 minutos), se enfría y se toman muestras por cuarta vez para el análisis HPLC. En esta etapa, se añaden 200 ml de etanol absoluto y 3,5 g de carbón activado (Darco KB, 100 mesh) a la mezcla de reacción que se agita durante una hora adicional a temperatura ambiente. Esta mezcla se filtra a través de papel en un matraz de 2 l que contiene 830 ml de etanol absoluto. El filtro se lava con 150 ml de etanol absoluto. La mezcla de reacción con etanol en el matraz de 2 l se agita magnéticamente mientras que el ácido metanosulfónico (aproximadamente 19,7 g, fw = 96,10) se añade lentamente gota a gota hasta que la mezcla es ácida (pH = 1 -2 usando papel de pH). Durante la adición de ácido se forman cantidades copiosas de un sólido blanco. Esta mezcla se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante aproximadamente 18 horas facilitar la cristalización completa del producto. La mezcla de reacción se calienta brevemente a aproximadamente 50 °C y luego se filtra en caliente usando vidrio fritado en una atmósfera de nitrógeno seco para proteger el producto higroscópico de la humedad. El sólido blanco se lava dos veces con etanol absoluto caliente, luego éter dietílico (temperatura ambiente) y se seca en el filtro por succión de nitrógeno o aire seco a su través. El sólido se seca completamente colocándolo en un horno de vacío durante la noche (50 °C, 3,3 kPa). El rendimiento es de 65,9 g (95%) de un polvo cristalino fino de color blanquecino.

El análisis mediante HPLC después de la adición de 100 mmol, 200 mmol y 300 mmol de sultona muestra la presencia de dos productos monoalquilados y un producto dialquilado junto con trimetiletilendiamina sin reaccionar incluso durante las primeras etapas de reacción. Parece que hay poca discriminación en la alquilación de los dos átomos de nitrógeno de la diamina de partida. Además, hay poca discriminación en las tasas de dialquilación entre los dos intermedios monoalquilados. Hay poca evidencia de la formación del producto trialquilado, incluso en etapas posteriores de la reacción. El análisis mediante HPLC de los cristales finales muestra una pureza de aproximadamente 93%. La pureza del producto depende en gran medida de la pureza de la diamina de partida.

La recristalización se lleva a cabo mediante la suspensión de la 50,3 g del producto en bruto seco en 1000 ml de etanol absoluto en agitación. Ligeramente menos de un equivalente (138 mmol) de una base adecuada (LiOH H<sub>2</sub>O, 5,79 g) se añade en porciones y la mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añade 2,5 g de carbón activado (Darco KB, 100 mesh) y la mezcla se agita durante una hora más. La mezcla se filtra a través de Celite® sobre papel de filtro fino usando un embudo Buechner (Celite® 545, Whatman # 5). A la solución de filtrado claro en agitación se añade ácido metanosulfónico (aproximadamente 13,5 g, FW = 96,10) gota a gota hasta que la mezcla es ácida (pH = 1 -2 usando papel de pH). La mezcla blanca resultante se agita durante dos horas a 50 °C. La mezcla caliente se filtra, se lava (etanol absoluto, a continuación, éter) y se seca como antes obteniéndose 46,8 g (93%) de un sólido cristalino blanco. La pureza mediante HPLC es de aproximadamente 98%. Una segunda recristalización, la conversión a la forma básica soluble seguida de cristalización de la forma ácida de etanol absoluto mediante la adición de ácido, se lleva a cabo con una recuperación de aproximadamente 96% y pureza de aproximadamente 99%. Se puede usar ácido fórmico o HBr acuoso al 48% en lugar de ácido metanosulfónico.

**Modificaciones:** El mismo procedimiento con poca modificación se utiliza para llevar a cabo la N,N'-dialquilación de N-metilpiperazina, N-metilhomopiperazina, N'-etil-N,N-dimetiletildiamina, N'-bencil-N,N-dimetiletildiamina, N,N,N'-trimetiltrimetildiamina. La 1,4-butanosulfona se sustituye fácilmente por propanosulfona. Con algunas modificaciones, los ácidos bromoalcanosulfónicos y sus sales, ácidos bromoacanosulfónicos y sus sales / ésteres así como ácidos bromoalcanoicos y sus sales / ésteres se utilizan con éxito como agentes alquilantes.

**Ejemplo 4 (Procedimiento 4a):** Preparación de cloruro de N-(2-hidroxi-3-trimetilamonio-propil)dietilamina (10, fw = 224,78).

Estas reacciones utilizan una solución acuosa concentrada (70-75%) de cloruro 2,3-epoxipropil-trimetilamonio de calidad técnica (GMAC). Es importante tener preparaciones frescas de este material con una concentración conocida y una pureza conocida. Generalmente, estas reacciones son limpias y muy eficientes (buen rendimiento y buena pureza). Sin embargo, las impurezas en GMAC conducen a pérdida de rendimiento y a la degradación de la pureza. Las propias impurezas, incluso cuando son inertes, inhiben la cristalización y complican la purificación. El material de calidad técnica puede variar de pureza entre 75-95% (determinado mediante HPLC, sin titulación); solo se usa el material con la pureza real en el intervalo de 90-95%. Mientras la concentración real de GMAC (determinada mediante HPLC) esté en el intervalo de 70-75%, y se conozca el valor real hasta el 0,2% más cercano, es aceptable. El GMAC de buena calidad se debe almacenar en frío (a 4 °C) y usar dentro en los 2 meses siguientes al análisis. Para estas reacciones, la concentración de GMAC es del 72,9% y la pureza de GMAC es del 92%.

329,13 g dietilamina recién destilada (4,5 mol, fw = 73,14) se introducen en un matraz de 2 litros equipado con un agitador mecánico y después se enfrían a 5 °C. Lentamente se añaden 667,2 g de GMAC (4,4 mol, fw = 151,64, 915,2 g 72,9%) en agua se gota a gota a la amina agitada. La temperatura se controla cuidadosamente, y la velocidad de adición se ajusta para mantener la temperatura de reacción por debajo de 10 °C. Después de la adición completa de GMAC (aproximadamente 3 horas), la mezcla de reacción se agita durante la noche (18 horas) a temperatura ambiente. De vez en cuando, se añade etanol absoluto para (1) mantener una sola fase líquida y (2) reducir la viscosidad para facilitar la agitación; en esta reacción, se añadieron aproximadamente 400 ml de etanol absoluto. La mezcla de reacción se calienta a 50 °C durante aproximadamente dos horas y, después, los disolventes (agua, etanol, exceso de amina) se eliminan al vacío usando un evaporador rotatorio hasta que el producto de reacción esté casi seco. Se disuelve la masa de reacción ámbar claro en una cantidad mínima de acetonitrilo caliente (750 a 950 ml). La solución caliente se filtra rápidamente a través de vidrio sinterizado y después se enfría lentamente a temperatura ambiente (aproximadamente 4 horas) durante las cuales comienzan a formarse cristales blancos. Si los cristales no se forman de manera espontánea, el matraz de reacción se raspa con una espátula de acero inoxidable o se añaden semillas de cristales del mismo producto purificado. Por lo general, la formación de cristales comienza en 1 a 2 horas, pero puede tardar hasta dos días sin cristales de siembra. A continuación, se deja reposar la mezcla a 4 °C durante la noche (18 horas), y se produce una masa cristalina blanca. Los cristales blancos se recogen mediante filtración a través de vidrio sinterizado, se lavan con acetona y después se secan sobre el filtro por succión de nitrógeno o aire seco a su través. El sólido se seca completamente colocándolo en un horno de vacío durante la noche (50 °C, 3,3 kPa) y se almacena sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en un desecador de vidrio. El rendimiento es de 614 g (62%) de un sólido blanco cristalino delicuescente con una pureza típica de 92-96% (HPLC). La recristalización de 500 g de este material en una cantidad mínima de acetonitrilo caliente utilizando el mismo procedimiento proporcionó 418 g (88% de rendimiento de recristalización) de un producto que tiene un 98-99% de pureza.

**Aducto del clorhidrato (Procedimiento 4b)** (fw = 261,24): Este procedimiento es el mismo que el del procedimiento 4a con la adición de HCl cerca del final y la cristalización del aducto de clorhidrato de manipulación más fácil.

329,13 g de dietilamina recién destilada (4,5 mol, fw = 73,14) se introducen en matraz de 3 litros equipado con un agitador mecánico y después se enfría hasta 5 °C. Lentamente se añaden 682,4 g de GMAC (4,5 mol, fw = 151,64, 936,1 g 72,9%) en agua gota a gota a la amina agitada. La temperatura se controla cuidadosamente, y la velocidad de adición se ajusta para mantener la temperatura de reacción por debajo de 10 °C. Después de la adición completa de GMAC (aproximadamente 3 horas), la mezcla de reacción se agita durante la noche (18 horas) a temperatura ambiente. De vez en cuando, se añade etanol absoluto durante el curso de la reacción para (1) mantener una sola fase líquida y (2) reducir la viscosidad para facilitar la agitación; en esta reacción, se añade un total de aproximadamente 400 ml de etanol absoluto. La mezcla de reacción se calienta a 50 °C durante aproximadamente dos horas, y la mezcla se deja enfriar a temperatura ambiente. Se añaden 400 ml de ácido clorhídrico reactivo al 37% (fw = 36,46, den = 1,020 g / ml, 4,87 mol.) en porciones a la solución en agitación durante un período de 60 minutos; se observa una exotermia suave. Todos los disolventes (agua, etanol, exceso de ácido) se eliminan al vacío usando un evaporador rotatorio hasta que el producto de reacción está casi seco. Se disuelve la masa de reacción ámbar claro en una cantidad mínima de etanol absoluto caliente / isopropanol (50/50 v / v) (1,5- 1,9 l). La solución caliente se filtra rápidamente a través de vidrio sinterizado y después se enfría lentamente a temperatura ambiente (aproximadamente 4 horas) durante las cuales comienzan a formarse cristales blancos. Si los cristales no se forman de manera espontánea, el matraz de reacción se raspa con una espátula de acero inoxidable o se añaden semillas de cristales del mismo producto purificado. Por lo general, la formación de cristales comienza en 1 a 2 horas, pero puede ser necesario más tiempo sin cristales de siembra. Después de reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 42 horas, la mezcla se deja reposar a 4 °C durante 48 horas, produciendo una masa cristalina blanca. Los cristales blancos se recogen mediante filtración a través de vidrio sinterizado, se lavan con acetona y después secan sobre el filtro haciendo pasar nitrógeno o aire seco a su través. El sólido se seca completamente

colocándolo en un horno de vacío durante la noche (50 °C, 3,3 kPa) y se almacena sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en un desecador de vidrio. El rendimiento es de 846 g (72%) de un sólido blanco cristalino deliquescente con una pureza típica de 90-95% (HPLC). La recristalización de 500 g de este material a partir de una cantidad mínima de etanol absoluto caliente / isopropanol con adición de HCl gaseoso (pH <1 con papel de pH) utilizando el procedimiento análogo anterior  
5 proporcionó 398 g (86% de rendimiento de recristalización) de un producto que tiene una pureza del 98,5 - 99,5%.

**Modificaciones:** los procedimientos 4a y 4b se utilizan con una amplia gama de aminas secundarias y se llevan a cabo en pequeña escala (0,5 moles) y / o a gran escala (4,5 moles): dimetilamina (40% acuosa, 30% en etanol absoluto), acetato de metilamina, N-metil-2-metoxietilamina, dietilamina, pirrolidina, piperidina, morfolina, piperidina 4-hidroxi-  
10 (50% en etanol absoluto), N-metiletanolamina, N-etiletanolamina, N-isopropiletanolamina, dietanolamina, N-acetilpiperazina (50% en etanol absoluto), bis(2-metoxietil)amina. Los disolventes de recristalización para las aminas cuaternarias desprotonadas son acetonitrilo caliente o acetonitrilo/ 2-butanona caliente (75/25 v / v). Los disolventes de recristalización para los aductos de clorhidrato son etanol absoluto caliente o etanol / isopropanol absoluto caliente (50/50 v / v).

El procedimiento 4b también se utiliza con aminas primarias utilizadas en exceso (2X): metilamina (40% acuosa, 30% de etanol absoluto), etilamina (70% acuosa, 50% de etanol absoluto), isopropilamina, etanolamina, 2-metoxietilamina. El exceso, amina primaria sin reaccionar puede reciclarse para su uso posterior.  
15

**Ejemplo 5a (Procedimiento 5a):** Preparación de cloruro de N-(2-trimetilamonio)propil)-dietilamina (27, fw = 166,70).

348,63 g de N,N,N',N'-tetrametiletildiamina recién destilada (3,0 mol, fw = 166,21) y 750 ml de acetona se introducen en un recipiente de presión de vidrio de 1 litro y de paredes pesadas que está equipado con una barra de agitación magnética, un termopar y un cabezal de presión con válvula de seguridad. Periódicamente se introduce ventilación con cloruro de metilo en gas en la mezcla de reacción cerrada en agitación a 379 kPa a fin de mantener una exotermia suave por debajo de 35 °C. La cantidad de adición de cloruro de metilo en el sistema se mide periódicamente mediante el control de gravimétrico del aumento de peso adicional con el tiempo. El recipiente de reacción sellado puede estar desconectado de la fuente de gas. El peso inicial del recipiente cerrado y el contenido se miden antes de la adición de cloruro de metilo, y las posteriores mediciones de peso indican los pesos de cloruro de metilo añadido. La adición de cloruro de metilo se mide también mediante la pérdida de peso del cilindro presurizado de cloruro de metilo. Los dos procedimientos de medición suelen dar aproximadamente mismo valor de ± 0,5 g. Durante un período de 3 a 6 horas, se añade un total de 121,1 g de cloruro de metilo (2,4 mol, FW = 50,49). Durante este tiempo comienza a formarse un sólido blanco cristalino. La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante la noche (18 horas), el recipiente de reacción se ventila en una campana y, después, la mezcla de reacción se filtra a través de vidrio sinterizado. El producto bruto se suspende en una cantidad mínima de acetonitrilo caliente (~600 ml). La mezcla en agitación caliente se deja enfriar lentamente, y cuando la temperatura alcanza los 65 °C, se filtra rápidamente a través de vidrio sinterizado para eliminar algo del producto desmetilado. La mezcla se enfría más y se deja reposar a temperatura ambiente durante 24 horas. La mezcla se filtra para obtener la primera cosecha de cristales. En este ejemplo, no hay eliminación del disolvente en este punto (véase más adelante). Se añaden 300 ml de acetona al filtrado, que después se deja en reposo a 4 °C durante 24 horas para obtener una segunda cosecha de cristales. La mezcla de acetonitrilo / acetona fría se filtra a través de vidrio sinterizado, y los dos cultivos de cristales se combinan para producir 328,0 g (82%) de un sólido higroscópico cristalino blanco con una pureza (HPLC) de 90-94%.  
20  
25  
30  
35  
40 La impureza principal es el subproducto dimetilado inerte. Una o dos recristalizaciones en acetonitrilo caliente o isopropanol caliente conduce al material puro (98-99%).

**Ejemplo 5b: (Procedimiento 5b)** Preparación de bromuro de 4-(N-etilisopropilamino)-1,1-dietil-piperidinio (74, fw = 307,33)

14,23 g de 4-(isopropilamino)piperidina recién destilada (100 mmol, fw = 142,25), 28,43 g de diisopropiletilamina (DIPEA, 220 mmol, FW = 129,25) y 75 ml de acetonitrilo se introducen en un recipiente de presión de vidrio de 200 ml y de paredes pesadas que está equipado con una barra de agitación magnética, un termopar y un cabezal de presión con válvula de seguridad. Se añaden 35,96 g de bromuro de etilo (330 mmol, fw = 108,97) a la mezcla en agitación y el recipiente de presión se sella. Inicialmente hay una exotermia suave. La mezcla de reacción se calienta y se agita a 40 °C durante 24 horas y después se enfría a temperatura ambiente. Durante el enfriamiento, los cristales blancos de bromhidrato de DIPEA se empiezan a formar. El recipiente de reacción se ventila en una campana y después la mezcla de reacción se filtra a través de vidrio sinterizado para eliminar el sólido no deseado. El disolvente se elimina en un evaporador rotatorio, y después se añaden solo suficiente NaOH acuoso al 50% (~28 g) hasta que la mezcla estaba fuertemente básica. El líquido (acetonitrilo, agua, DIEPA) se elimina utilizando un evaporador rotatorio y después una bomba de vacío (0,06 kPa). El residuo se extrae dos veces con 100 ml de acetonitrilo caliente, y los líquidos se combinan. Se añade sulfato de magnesio anhidro (~15 g), el líquido se filtra y luego se coloca en un evaporador rotatorio para eliminar la mayor parte del disolvente. Se añaden pequeñas cantidades de acetonitrilo de nuevo para asegurar una solución homogénea y, a continuación, se añade éter dietílico peróxido libre para inducir la cristalización. La mezcla se deja en reposo a temperatura ambiente durante aproximadamente 4 horas y después a 4 °C durante la noche. La mezcla fría de acetonitrilo / éter se filtra a través de vidrio sinterizado, se lava con éter y luego se seca haciendo pasar N<sub>2</sub> seco a través del filtro. El sólido de color blanco se seca en una estufa de vacío durante la  
45  
50  
55  
60

noche, obteniéndose 22,1 g (72%) de un sólido pegajoso cristalino blanco con una pureza (HPLC) de aproximadamente 97%. La recrystalización en mezclas de acetonitrilo / isopropanol / éter da un producto purificado (~99%). Esta reacción ilustra un procedimiento para llevar a cabo múltiples alquilaciones de aminas primarias y secundarias en presencia de una base fuerte soluble no reactiva. A pesar del exceso de agente alquilante, no había pruebas (HPLC) de la impureza tetraalquilada en la mezcla de reacción o en el producto trialquilado final.

**Modificaciones:** el procedimiento 5 es un procedimiento general para la monoalquilación de una amplia variedad de diaminas terciarias simétricas y, en algunos casos, diaminas terciarias asimétricas. En condiciones más forzadas (tiempo, temperatura), este procedimiento también funciona bien para la dialquilación de diaminas simétricas y asimétricas; en este caso, se usan disolventes tales como acetonitrilo, etanol absoluto o mezclas de los mismos. Las diaminas terciarias más pequeñas (dimetilpiperazina, tetrametiletendiamina) dan lugar a mayores rendimientos y purezas. Las diaminas más grandes (tetrametilhexametiltendiamina) producen mayores cantidades de dialquilación, requieren más recrystalización y conducen a la disminución de los rendimientos de producto monoalquilado puro. En los casos en que la dialquilación es más problemática, se usan cantidades menores de cloruro de metilo, y la diamina sin reaccionar se recicla. En algunos de los casos, el disolvente se cambia a éter dietílico / acetona (50/50 v / v) y el nivel de dialquilación se reduce. Cuando se prepara la solución de filtrado para obtener un segundo lote de cristales por enfriamiento, a veces el filtrado se reduce primero en el volumen a la mitad; a veces se añaden 100-900 ml de acetona. A veces, ambos procedimientos se llevan a cabo, eliminación parcial de acetonitrilo y adición de acetona.

**Ejemplo 6 (Procedimiento 6):** Preparación de N,N,N',N'-tetrametil N-(3-sulfopropil)-1,3-propanodiamina, sal interna (57, fw = 252,38).

273,50 g de N,N,N',N'-tetrametil-1,3- propanodiamina recién destilada (2,1 mol, fw = 130,24) y 600 ml de acetona se colocan en un matraz de 2 l que está equipado con una barra de agitación mecánica y un termómetro. Una solución de 244,28 g de 1, 3-propanosulfona (2,0 mol, fw = 122,14) en 200 ml de acetona se añade lentamente durante un período de aproximadamente tres horas para la solución de amina en agitación. Se observa una exotermia moderada (~ 10 °C), y un sólido cristalino blanco sale de la solución. La mezcla se agitó durante la noche (18 horas) a temperatura ambiente, se filtra a través de vidrio sinterizado, se lava con pequeñas cantidades de acetona y se seca en el filtro.

**Procedimiento (a):** El sólido blanco se disuelve en una cantidad mínima de acetonitrilo caliente (~1400 mL), y después la solución caliente se filtra a través de una almohadilla de Celite® para eliminar el subproducto dialquilado poco soluble. El filtrado caliente se enfría a temperatura ambiente durante aproximadamente tres (3) horas y después se deja en reposo a 4 °C durante 48 horas. Los cristales blancos se recogen mediante filtración a través de vidrio sinterizado, se lavan con acetona y después se secan sobre el filtro pasando por nitrógeno o aire seco a su través. El sólido se seca completamente colocándolo en un horno de vacío durante la noche (50 °C, 2 kPa). El rendimiento es de 308 g (61 %) de un sólido cristalino blanco con una pureza típica de ~96 % (HPLC). La recrystalización de 300 g de este material a partir de una cantidad mínima de acetonitrilo caliente utilizando el mismo procedimiento anterior proporcionó 259 g (90% de rendimiento de recrystalización) de un producto que tiene un 98-99% de pureza

**Procedimiento (b):** El sólido blanco se suspendió en 700 ml de etanol absoluto caliente (60 °C) y se burbujea HCl gaseoso cuidadosamente a través de la mezcla hasta que es ácido (pH <2,0 por papel de pH). La mezcla se calienta brevemente a aproximadamente 75 °C y luego se filtra a través de una almohadilla de Celite® para eliminar el subproducto dialquilado poco soluble. El filtrado caliente se enfría a temperatura ambiente durante aproximadamente tres (3) horas y después se deja en reposo a 4 °C durante 48 horas. Los cristales blancos de la sal clorhidrato (fw = 288,84) se recogen mediante filtración a través de vidrio sinterizado, se lavan con acetona y después se secan sobre el filtro pasando por nitrógeno o aire seco a su través. El sólido se seca completamente colocándolo en un horno de vacío durante la noche (50 °C, 2 kPa) y se almacena sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en un desecador de vidrio. El rendimiento es de 416 g (72 %) de un sólido cristalino blanco con una pureza típica de ~97 % (HPLC). La recrystalización de 400 g de este material a partir de una cantidad mínima de acetonitrilo caliente utilizando el mismo procedimiento anterior proporcionó 326 g (84 % de rendimiento de recrystalización) de un producto que tiene un 98-99% de pureza

**Procedimiento (c):** El sólido blanco se suspendió en 700 ml de etanol absoluto caliente (60 °C) y se burbujea HCl gaseoso cuidadosamente a través de la mezcla hasta que es ácido (pH <2,0 por papel de pH). La mezcla se calienta brevemente a aproximadamente 75 °C y luego se filtra a través de una almohadilla de Celite® para eliminar el subproducto dialquilado poco soluble. Se añade suficiente LiOH·H<sub>2</sub>O en porciones al filtrado caliente (60°C) en agitación hasta que el pH es básico (pH > 11,0 por papel de pH). La amina libre neutral es poco soluble en etanol absoluto y se recrystaliza de la solución. La mezcla se enfría hasta la temperatura ambiente, se agita durante la noche (18 horas) y finalmente se deja reposar a 4 °C durante 24 horas. El sólido blanco se recoge mediante filtración a través de vidrio sinterizado, se lavan con acetona y después se secan sobre el filtro pasando por nitrógeno o aire seco a su través. El sólido se seca completamente colocándolo en un horno de vacío durante la noche (50 °C, 2 kPa). El rendimiento es de 403 g (80 %) de un sólido cristalino blanco con una pureza típica de ~96 % (HPLC). La recrystalización de 400 g de este material se lleva a cabo en suspensión en etanol absoluto caliente, que convierte la sal clorhidrato soluble, filtrando la solución caliente, convirtiendo de nuevo la amina libre con la base neutra y recrystalizando en etanol frío. Este procedimiento proporciona 349 g (91% de rendimiento de recrystalización) de un producto que tiene un 98-99% de pureza

**Ejemplo 7 (Procedimiento 7): Preparación de N-(2-hidroxi-3-trimetilamoniopropil)-N-(2-hidroxietil)homotaurina, sal interna (51, fw = 252,38).**

**Etapa 1 (Procedimiento 7a):** N-(2-hidroxietil)homotaurina, sal interna (fw = 183,23) 219,89 g de etanolamina recién destilada (3,6 mol, fw = 61,08) y 1.200 ml de etanol absoluto se colocan en un matraz Erlenmeyer de 2 l seco que está equipado con una gran barra de agitación magnética y un termómetro. Se añaden 146,57 g licuado (pf = 31 °C) 1, 3-propanosultona (1,2 moles, fw = 122,14) lentamente durante un periodo de aproximadamente tres (3) horas a la solución de amina en agitación enérgica. El uso periódico de un baño de refrigeración junto con la adición lenta de sultona permite que la temperatura de la reacción exotérmica se mantenga en el intervalo de 20-30 °C. La mezcla se agitó durante dos horas más a temperatura ambiente. Finalmente se añade ácido metanosulfónico (~231 g, 2,4 mol, fw = 96,11) gota a gota a la mezcla en agitación hasta que se vuelve ácida (pH <2,0, papel de pH). La mezcla se agita a continuación a temperatura ambiente durante 2 horas y durante la noche (18 horas) a 4 °C. Tras la acidificación, el producto sale de la solución como un aceite incoloro que se convierte en un sólido cristalino blanco con agitación (<1 hora si se sembraron o 2-24 horas si no). El líquido se elimina por decantación o filtración, y añaden 1000 - 1200 ml de etanol absoluto. La mezcla se agita enérgicamente a temperatura ambiente durante 6 horas, se filtra a través de vidrio sinterizado en un manto de N<sub>2</sub> seco o se seca al aire, se lava con etanol absoluto y acetona y se seca en el filtro.

El producto se suspende en aproximadamente 800 ml de etanol absoluto, y aproximadamente un equivalente de una base soluble (trietilamina, LiOH, H<sub>2</sub>O, tetrametilguanidina etc) se añade gota a gota hasta que la mayoría de la taurina se disuelve. La mezcla (temperatura ambiente) se filtra para eliminar las sales y otras sustancias insolubles, y se añade aproximadamente un equivalente de un ácido soluble (metanosulfónico, HCl gaseoso) gota a gota hasta que el pH es ácido. Los cristales blancos del producto comienzan a cristalizar en la solución, y la mezcla se agita durante la noche a temperatura ambiente. Los cristales blancos se recogen mediante filtración a través de vidrio sinterizado, se lavan con etanol absoluto y acetona y después se pasando por nitrógeno o aire seco a su través. El sólido se seca completamente colocándolo en un horno de vacío durante la noche (50 °C, 2 kPa). El rendimiento es de 196 g (89 %) de un sólido cristalino blanco con una pureza típica de ~99 % (HPLC). La purificación por cristalización se basa en el hecho de que la amina de partida (libre y protonada) y el subproducto dialquilado (libre y protonado) son ambos solubles en etanol absoluto básico y ácido. En contraste, el producto es soluble en etanol absoluto básico pero poco soluble en etanol absoluto ácido. Además, las sales de sodio (NaCl, NaBr, etc.), si están presentes, tienen solubilidad limitada en etanol absoluto básico y ácido.

**Modificaciones:** Este procedimiento se usa con una variedad de aminas primarias: metilamina (40% acuoso, 30% en etanol absoluto), etilamina (70% acuosos, 50% de etanol absoluto), isopropilamina, 2-metoxietilamina, glicinamida. Si se utilizan soluciones acuosas de aminas primarias, a continuación, se pueden utilizar soluciones acuosas de un ácido fuerte (HCl conc.). En este caso, los disolventes (agua, etanol) se eliminan por completo a presión reducida, y el residuo se disuelve / suspende en etanol absoluto. Cuando se utilizan aminas volátiles, una base apropiada (por ejemplo, Et<sub>3</sub>N, LiOH·H<sub>2</sub>O, 50% de NaOH acuoso) se añade al final de la secuencia de reacción, y después el disolvente y la amina sin reaccionar se eliminan a vacío. La mezcla de reacción se disuelve en etanol absoluto, se filtra la solución, y luego se añade ácido metanosulfónico (u otro ácido). En este caso, se necesita mucho menos ácido porque gran parte de la amina sin reaccionar se retira. En esta preparación, se usa un exceso (3X) de la amina para retardar dialquilación. El exceso de amina que no ha reaccionado se recupera fácilmente para su reutilización, si es necesario. Otros agentes alquilantes funcionan bien. Se puede usar 1,4- butanosultona sin modificaciones. El 3-cloro-2-hidroxiopropanosulfonato sódico tiene una solubilidad limitada pero suficiente en etanol absoluto; los tiempos de reacción son típicamente de 12-24 horas con agitación a temperatura ambiente. La baja solubilidad de 2-bromoetanosulfonato sódico en etanol absoluto requiere que el etanol / agua (70/30 v / v) se use; además se necesita un exceso de 10-20% debido a su hidrólisis parcial en el disolvente de reacción.

**Etapa 2 (Procedimiento 7b):** 183,23 g N-(2-hidroxietil) homotaurina, sal interna (1,0 moles, fw = 183,23) se disuelven en una solución de 142,2 g de diisopropiletilamina (1,1 mol, fw = 129,25) y 700 ml de etanol absoluto contenidos en un matraz Erlenmeyer de 2 L equipado con un agitador mecánico y un termómetro. Se añaden 151 0,6 g de GMAC (1,0 mol, fw = 151,64, 208,1 g 72,9 %) en el agua lentamente gota a gota a una solución fría (5-10 °C) agitada vigorosamente de N-hidroxietil-homotaurina solución de durante un periodo de alrededor de tres (3) horas. Durante el curso de la reacción, un sólido cristalino blanco o un líquido oleoso transparente (que más tarde se solidifica) se separa de la solución. La temperatura se controla cuidadosamente, y la velocidad de adición se ajusta para mantener la temperatura de reacción por debajo de 10 °C. Después de la adición completa de GMAC, la mezcla de reacción se agita durante una noche (18 horas) a temperatura ambiente. Finalmente, la mezcla de reacción se calienta a 50 °C durante aproximadamente 1 a 2 horas, y después los disolventes (agua, etanol) se eliminan a vacío usando un evaporador rotatorio hasta que la mezcla de reacción está casi seca. La masa de reacción se volvió a suspender en etanol absoluto caliente (750 ml), el pH se verifica que es > 10,0 (papel de pH), y la mezcla se agita vigorosamente mientras se enfría a la temperatura ambiente (~ 2 horas) para facilitar la cristalización. Los cristales blancos se recogen mediante filtración a través de vidrio sinterizado, se lavan con etanol absoluto y acetona y después mediante succión con nitrógeno o aire seco a su través.

El producto se recristaliza suspendiéndolo en 750 ml de etanol absoluto y añadiendo suficiente ácido metanosulfónico (76-92 g) u otro ácido tal como HCl gaseoso para formar el producto protonado que es soluble en etanol. La solución se filtra a través de una almohadilla de Celite® en un filtro de Büchner, y luego una base (80- 102g Et<sub>3</sub>N u otro soluble hidróxido) se añade gota a gota de una manera que conduce a la cristalización del producto no protonado. La

mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente 3 horas, se filtra a través de vidrio sinterizado, se lava con etanol absoluto y acetona y finalmente se seca sobre el filtro haciendo pasar nitrógeno seco o aire seco a su través. El sólido se seca completamente colocándolo en un horno de vacío durante la noche (50 °C, 2 kPa). El rendimiento es de 192 g (76 %) de un sólido microcristalino blanco seco que tiene una pureza típica de 98 - 99 % (HPLC). La purificación por cristalización se basa en el hecho de que la taurina de partida y el producto secundario dialquilado son ambos solubles en etanol absoluto básica. En contraste, el producto es soluble en etanol absoluto ácido pero poco soluble en etanol absoluto básico. Además, las sales de sodio (NaCl, NaBr, etc.), si están presentes, tienen solubilidad limitada en etanol absoluto básico y ácido.

**Modificaciones:** Este es un procedimiento general para la fabricación de una gama de compuestos a partir de N-monosustituido taurinas, homotaurinas, ácidos aminoalcanosulfónico relacionados y ácidos aminoalcanoicos cuando la monosustitución es un grupo neutro, sin carga (no aniónico, no catiónico). Si la monosustitución contiene un resto carboxamida, se tiene cuidado de no hidrolizar en condiciones excesivamente ácidas o básicas excesivamente. En lugar de GMAC, también se utilizan con éxito sales de amonio cuaternario bromoalquilo.

**Etapa 3 (Procedimiento 7C):** El cloruro de N-(3-hidroxiopropil trimetilamonio-2-)etanolamina clorhidrato (78a) se preparó por el Procedimiento 4b anterior. 249,19 g de este compuesto (1,0 moles, fw = 249,19) se disuelven en una solución de 122,8 g de diisopropiletilamina (0,95 mol, fw = 129,25) y 750 ml de etanol absoluto contenidos en un matraz Erlenmeyer de 2 L equipado con un agitador mecánico y un termómetro. Se añaden 122,14 g licuado (pf = 31 °C) 1, 3-propanosultona (1,0 moles, fw = 122,14) lentamente durante un periodo de aproximadamente tres (3) horas a la solución en agitación de la amina secundaria. El uso periódico de un baño de refrigeración junto con la adición lenta de sultona permite que la temperatura de la reacción exotérmica se mantenga en el intervalo de 20-30 °C. La mezcla de reacción se agita durante una noche (18 horas) a temperatura ambiente, y luego se añade más diisopropiletilamina (~ 6 g) gota a gota hasta el punto de precipitación incipiente del producto. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante un período adicional de 4-6 horas. El producto se pone entonces fuera de la solución (aceite incoloro o sólido blanco) por adición de una base suficiente (-130 g iPr<sub>2</sub> NEt; o, alternativamente, tetrametilguanidina, Et<sub>3</sub>N, 50% acuosa de NaOH, NaOEt, LiOEt, LiOH H<sub>2</sub>O) de modo que la solución es básica (pH > 10,0, papel de pH). La mezcla de reacción se agita durante la noche de nuevo (18 horas) a temperatura ambiente que conducen a la formación de un producto cristalino blanco. El producto se recoge mediante filtración a través de vidrio sinterizado, se lavan con etanol absoluto y acetona y después mediante succión con nitrógeno o aire seco a su través. Se recrystaliza acuerdo con el Procedimiento 7a - Etapa 2. La mezcla de reacción se filtra a través de vidrio sinterizado, se lava con etanol absoluto y acetona y finalmente se seca sobre el filtro haciendo pasar nitrógeno seco o aire seco a su través. El sólido se seca completamente colocándolo en un horno de vacío durante la noche (50 °C, 2 kPa). El rendimiento es de 215 g (85 %) de un sólido microcristalino blanco seco que tiene una pureza típica de 98 - 99 % (HPLC).

**Modificaciones:** Este es un procedimiento general para esta clase de aminas zwitteriónicas. Otros agentes alquilantes funcionan de forma similar. Se puede usar 1,4-butanosultona sin modificaciones. El 3-cloro-2-hidroxiopropanosulfonato sódico tiene una solubilidad limitada pero suficiente en etanol absoluto; los tiempos de reacción se extienden de 12-24 horas a temperatura ambiente. La baja solubilidad de 2-bromoetanosulfonato sódico en etanol absoluto requiere que el etanol / agua (70/30 v / v) se use; además se necesita un exceso de 10-20% debido a su hidrólisis parcial en el disolvente de reacción. También se utilizan bases orgánicas e inorgánicas alternativas además de diisopropiletilamina. Además del derivado de N-(2-hidroxietil) anterior se puede usar una amplia gama de materiales de partida, compuestos de amina cuat secundarias que contienen grupos N-metilo, N-etilo, isopropilo N-, N-(2-metoxietil).

**Ejemplo 8 (Procedimiento 8):** Preparación de 1,1,5,9-tetrametil-2-hidroxi-5,9-bis(2-sulfoetil)-1,5,9-ditriazanonano, sal di-interna (82, fw = 419,57).

**Etapa 1 (Procedimiento 8a):** N,N'-dimetil-N,N'-bis (2-sulfoetil)-1, 3-propanodiamina, sal di-interna (fw = 318,42, [185305-85-5])

102,18 g de N,N'-dimetil-1, 3-propanodiamina recién destilada (1,0 mol, fw = 102,18, [111-33-1]) y 1500 ml de etanol / agua (70/30 v / v) se introducen en un matraz Erlenmeyer de 3 l equipado con el agitador mecánico y un termómetro. 258,5 g de diisopropiletilamina (2,0 mol, FW = 129,25) y 422,1 g de sal sódica del ácido 2-bromoetanosulfónico (2,0 mol, f = 21 0.01 1) se añaden en porciones durante un período de aproximadamente siete (7) horas a la solución de diamina en agitación enérgica.. La mezcla de reacción se agita a la temperatura ambiente durante aproximadamente 42 horas, y un seguimiento periódico mediante HPLC. La tasa de reactividad está limitada por la solubilidad de la sal de sodio del ácido sulfónico. Una vez que la reacción ha finalizado (-42 horas) y se ha consumido el bromoetilsulfonato, la cantidad de agente de agente alquilante adicional que se necesita para completar la reacción se estimó a partir de los datos de HPLC. Después, se añaden diisopropiletilamina adicional (0,3 moles, ~39 g) y bromoetilsulfonato (0,3 moles, ~64 g) porque algo de bromoetilsulfonato se pierde para la hidrólisis. La mezcla de reacción se agita de nuevo a temperatura ambiente durante aproximadamente 22 horas. Este proceso se repite hasta que toda la amina de partida se ha dialquilado limpiamente con poca evidencia de trialquilación. La mezcla de reacción se calienta a 60 °C durante aproximadamente 1 hora y luego se filtra para eliminar cualquier sólido. El disolvente (agua, etanol) se elimina en vacío hasta que el residuo es casi seco. El residuo se disuelve / suspende en 1500 ml de etanol absoluto, el pH se verifica que es básico (pH > 10,0, papel de pH), la mezcla se agita a 70 °C durante aproximadamente 3 horas y después se deja enfriar a temperatura ambiente mientras se agitaba. La mezcla

de reacción se filtra de nuevo para eliminar los sólidos, y después se añade ácido metanosulfónico ~220 g, fw = 96,11) en porciones a la mezcla en agitación hasta que se vuelve ácida (pH <2,0, papel de pH). Durante la acidificación, el producto sale de la solución, inicialmente como sólidos pegajosos y luego como cristales blancos finos. La mezcla se agita a continuación a temperatura ambiente durante 3 horas y durante la noche (18 horas) a 4 °C. La mezcla de reacción se filtra a través de vidrio sinterizado bajo un manto de N<sub>2</sub> o aire seco, se lava con etanol absoluto y acetona y se seca en el filtro.

El producto se recrystaliza suspendiendo el sólido en 1200 ml de etanol absoluto y añadiendo suficiente base (Et<sub>3</sub>N) hasta que la mayoría se disuelve. La solución se filtra para eliminar los sólidos y se añade suficiente ácido (ácido metanosulfónico o HCl gaseoso) al filtrado en porciones hasta que el pH es ácido (pH <2,0, papel de pH). La adición de ácido provoca una masa de microcristales blancos que salen de la solución. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante la noche (18 horas), se filtra a través de vidrio sinterizado en un manto de N<sub>2</sub> seco o se seca al aire, se lava con etanol absoluto y acetona y se seca en el filtro. El sólido se seca completamente colocándolo en un horno de vacío durante la noche (50 °C, 2 kPa). El rendimiento es de 252 g (79%) de un sólido microcristalino blanco seco que no tiene ninguna impureza detectable (> 99%, HPLC).

**15 Etapa 2 (Procedimiento 8b):** Preparación de 1-bencil-1,1,5,9-tetrametil-3-hidroxi-5,9-bis(2-sulfoetil)-1,5,9-ditriazanonano, sal di-interna (fw = 509,69).

251 0,6 g de N,N'-dimetil-N,N'-bis (2-sulfoetil) trimetileno-diamina, sal di-interna recién cristalizado (0,79 mol, fw = 318,42, [185305-85-5]) se disuelve en una mezcla en agitación de 1000 ml de etanol / agua (80/20 v / v) y diisopropiletilamina (0,80 mol, 103,4g, fw = 129,25) a temperatura ambiente. Durante un periodo de aproximadamente seis (6) horas, se añaden cuidadosamente 198,15 g de N-(3-cloro-2-hidroxipropil) cloruro de bencildimetilamonio recrystalizado (0,75 mol, Reactivos de "bencilo", > 99,5% de pureza, FW = 264,20, [67304-25-0]) y 100,9 g diisopropiletilamina individualmente en porciones a la mezcla de reacción en agitación a temperatura ambiente. Se observa una exotermia suave. La temperatura se aumenta lentamente hasta aproximadamente 60 °C durante 60 minutos, y la temperatura se mantiene a esa temperatura durante la noche (~18 horas). La reacción se siguió mediante HPLC para monitorear la desaparición de los reactivos de bencilo material de partida. El disolvente se elimina completamente a vacío usando un evaporador rotatorio, se añaden 850 ml de etanol absoluto, se ajusta el pH (si es necesario) de modo que es básico (pH > 9,5, papel de pH), y la mezcla se agita a 60 °C durante una hora. La mezcla se deja enfriar a aproximadamente 30 °C, y luego se filtra usando de vidrio poroso y se lavó con etanol absoluto y acetona El sólido blanco se suspende en 800 ml de etanol absoluto en agitación a 40 °C, y el ácido metanosulfónico (~72 g) se añade gota a gota hasta que se disuelve la mayor parte o todo el producto. La mezcla se filtra en caliente para eliminar el sólido sin disolver gota a gota, y después se añade a la base de filtrado en agitación hasta que es básico (pH > 9,5, papel de pH) tiempo durante el cual el los cristales del producto se cristalizan en la solución. La solución se enfría a 4 °C durante la noche y luego se filtra a través de vidrio sinterizado, se lava con etanol absoluto y acetona y luego se seca en el filtro. El sólido se seca completamente colocándolo en un horno de vacío durante la noche (50 °C, 2 kPa). El sólido se seca completamente colocándolo en un horno de vacío durante la noche (50 °C, 2 kPa). El rendimiento es de 322 g (81 %) de un sólido microcristalino blanco seco que tiene una pureza típica de ~94 % (HPLC). La recrystalización en etanol absoluto caliente dio un producto con una pureza > 98% (90% de rendimiento de recrystalización).

**40 Etapa 3 (Procedimiento 8c):** Preparación de 1,1,5,9-tetrametil-3-hidroxi-5,9-bis (2-sulfoetil)-1,5,9-ditriazanonano sal di-interna (fw = 419,57).

305,8 g de 1-bencil-1, 1, 5,9-tetrametil-3-hidroxi-5,9-bis (2-sulfoetil)-1, 5,9-triazanonano, sal di-interna de (fw = 509,69), 9,61 g de ácido metanosulfónico (0,10 moles, 96,1 fw = 1) y 900 ml de etanol / agua (90/10 p / p) se introducen en una recipiente a presión de paredes fuertes equipado con una barra de agitación magnética, un termopar y un cabezal de presión con una válvula de alivio. Se añade catalizador (6.0 g 5% de Pd / C) a la mezcla, el recipiente de presión se sella y después se presuriza a 241 kPa con hidrógeno gaseoso (H<sub>2</sub>) y se evacua tres veces. Finalmente, la mezcla en agitación se presuriza y se mantiene a 241 kPa de hidrógeno con la temperatura de 40 °C durante aproximadamente cuatro (4) horas. La reacción de agitación se continua durante la noche (~18 horas) a temperatura ambiente con 241 kPa H<sub>2</sub>. La botella de presión se ventila, la mezcla de reacción se filtra a través de una almohadilla de Celite® para eliminar el catalizador insoluble, y el volumen del filtrado se reduce a aproximadamente 800 ml usando un evaporador rotatorio. Esta solución se calienta a 60 °C, se añade base (~13 g diisopropiletilamina) hasta que el pH es aproximadamente neutro (pH = 7,0, papel de pH). El producto comienza a salir de la solución en forma de cristales blancos. La mezcla se enfrió lentamente a temperatura ambiente (~ 3 horas), y se deja a continuación la mezcla en reposo a 4 °C durante la noche (18 horas). Los cristales blancos se recogen mediante filtración a través de vidrio sinterizado, se lavan con acetona y después se secan sobre el filtro por succión de nitrógeno o aire seco a su través. Una segunda cosecha de cristales se obtiene del siguiente modo. El filtrado se redujo en volumen a aproximadamente 500 ml, el pH se comprueba y se ajusta si es necesario (pH ~ 7,0), la mezcla se siembra con cristales del producto, se enfría a 4 °C durante la noche y se filtra y se lava como antes. El sólido se seca completamente colocándolo en un horno de vacío durante la noche (50 °C, 2 kPa) y se almacena sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en un desecador de vidrio. El rendimiento total es de 237 g (94%) de un sólido cristalino blanco con una pureza típica de 98-99% (HPLC). Por lo general no es necesaria la recrystalización del producto.

**Ejemplo 9: (Procedimiento 9):** Preparación de cloruro de (3-trimetilamonio)propil)dimetilamina clorhidrato (29a, fw =

217,19)

30,53 g de cloruro de (3-aminopropil)trimetilamonio (200 mmol, fw = 152,67) se añade cuidadosamente en porciones a 48,5 g 95% de ácido fórmico (1000 mmol, fw = 46,03). La mezcla caliente se agita magnéticamente en un matraz Erlenmeyer de 250 ml en atmósfera de nitrógeno y después se enfría a temperatura ambiente usando enfriamiento externo. 40,6 g 37% de formaldehído (500 mmol, fw = 30,03) se añaden a la mezcla de reacción, que se calienta a 65 °C durante la noche (18 horas). Cuando la temperatura alcanza aproximadamente 50 °C, las burbujas de CO<sub>2</sub> empiezan a salir de la solución. La temperatura de la mezcla de reacción se eleva después a 95 °C durante una (1) hora y después se deja enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, se añaden aproximadamente 22 g de ácido clorhídrico 37% (220 mmol, fw = 36,46) gota a gota a la mezcla en agitación hasta que se vuelve ácida (pH < 2,0 papel de pH). El disolvente y los materiales de partida sin reaccionar se eliminan completamente al vacío usando un evaporador rotatorio. La mezcla se suspende en 100 ml de etanol absoluto, se calienta a 70 °C durante 30 minutos, se filtra a través de un vidrio sinterizado, se enfría a temperatura ambiente y después el disolvente se elimina completamente de nuevo a vacío. Finalmente, la mezcla se disuelve en una cantidad mínima de etanol absoluto caliente (80- 100 ml) de una mezcla caliente de etanol/isopropanol absoluto ((50/50 v/v), se filtra rápidamente a través de un vidrio sinterizado, se enfría a temperatura ambiente y luego se añade HCl gaseoso cuidadosamente hasta que el pH es ácido (pH <10,0 usando papel de pH). La mezcla se deja reposar durante la noche y luego se filtra para obtener la primera cosecha de cristales. Se añaden 50 ml de acetona al filtrado, la mezcla se deja en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas y después a 4 °C durante la noche (18 horas). La mezcla se filtra de nuevo para obtener una segunda cosecha de un producto microcristalino blanco. Las dos cosechas se combinan, se lavan con isopropanol / acetona (50/50 v / v), luego con acetona seguido de éter dietílico. El producto algo higroscópico se seca haciendo pasar nitrógeno seco a su través seguido de secado en un horno de vacío a 50 °C durante la noche (18 horas). Este procedimiento produce un producto (38,6 g, 89 %) que tiene una pureza de 96 - 98 % mediante HPLC. La recristalización en seco, etanol caliente / isopropanol que contiene HCl produce un producto que tiene un ~99 % de pureza mediante HPLC.

**Modificaciones:** Se obtienen resultados razonables si 200 mmol de cloruro de (2-aminoetil) trimetilamonio cloruro-clorhidrato se utilizan como material de partida. En este caso, 200 mmol de NaOH (50% acuoso) también se añaden al principio. Esta es una técnica general (metilación de Eschweiler-Clarke) para la metilación de aminas primarias y secundarias. En el caso de aminas secundarias, se añaden la mitad de las cantidades de ácido fórmico y la solución de formaldehído; a veces se necesita un poco de agua adicional para la solubilidad adecuada.

**Ejemplo 10: (Procedimiento 10):** Preparación de bromuro de N-(3-trimetilamonio)propil)-dietilamina bromhidrato (17, fw = 334,14).

26,10 g de bromuro de (3-bromopropil)trimetilamonio (100 mmol, fw = 261,01) se suspenden en 200 ml de acetonitrilo en agitación (agitación magnética) en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Se añaden 21,95 g de dietilamina (300 mmol, fw = 73,14) y la suspensión se agita a temperatura ambiente durante la noche (18 horas). Durante este tiempo, la mezcla de reacción se vuelve homogénea. La reacción se calienta a 55°C durante dos horas para dirigir la reacción hasta su finalización. La mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente, se añade HBr gaseoso hasta que la mezcla se vuelve ácida (pH <2,0, papel pH), y el producto se cristaliza en forma de cristales blancos. Si la cristalización no se produce o si se forma un aceite transparente, el lado interior del matraz de vidrio se raya para inducir la cristalización o se añaden cristales de siembra, y luego la mezcla se agita a temperatura ambiente durante aproximadamente tres horas durante las cuales los cristales comienzan a formarse. Se añaden 200 ml de acetona a la mezcla en agitación, y después se agita durante la noche (18 horas) a 4°C hasta completar la cristalización. La mezcla se filtra y el producto cristalino blanco se lava con 25 ml de acetonitrilo. El producto se seca haciendo pasar nitrógeno seco a su través seguido de secado en un horno de vacío a 50 °C durante la noche (18 horas). El proceso produce un producto microcristalino blanco (30,4 g, rendimiento del 91%) que es típicamente 96-98% de pureza mediante HPLC.

La recristalización se lleva a cabo utilizando una mezcla caliente de etanol absoluto e isopropanol (50/50 v / v). 30,0 g de producto bromhidrato en bruto se disuelve en una cantidad mínima de etanol /isopropanol caliente (aproximadamente 45 ml). Cuidadosamente se hace burbujear HBr l gaseoso en la solución de disolvente caliente de etanol hasta que la solución es fuertemente ácida (pH <2,0, papel de pH), y luego se continúa durante 1 -2 minutos. La introducción de burbujas de HBr gaseoso en etanol absoluto es un proceso fuertemente exotérmico. Se deja que el matraz cubierto se enfríe hasta la temperatura ambiente durante un periodo de aproximadamente 3 horas. Se forman preciosos cristales blancos. El matraz se enfría a continuación durante la noche a 4 °C. Los cristales blancos se filtran rápidamente a temperatura ambiente usando un filtro de vidrio sinterizado, se lavan con 25 ml de acetona / isopropanol (50/50 v / v) y luego con acetona pura y éter dietílico. El producto se seca en un horno de vacío durante la noche a 50 °C y se almacena sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en un vaso desecador. Este procedimiento de recristalización produce 26,1 g (87 % de rendimiento de recristalización) de producto con una pureza mediante HPLC de 99+ % cuando la pureza inicial es aproximadamente > 95 %.

**Ejemplo 11: N,N,N',N'-tetrametil N-(3- fosfonopropil)-1,3- propanodiamonio, sal di-interna (60, fw = 252,38)**

**Procedimiento 11a:** Preparación de éster dietílico de bromuro de N,N,N,N'-tetrametil-N-(3-dietilfosfonopropil)-1,3-propanodiamina bromhidrato (79a, fw = 470,24).

260,5 g de N,N,N',N'-tetrametil-1,3- propanodiamina recién destilada (2,0 mol, fw = 130,24) y 520 ml de acetona se colocan en un matraz de 2 l que está equipado con una barra de agitación mecánica y un termómetro. La temperatura se mantiene a aproximadamente 45 °C. Una solución de 259,1 g de bromopropanofosfonato de dietilo (1,0 mole, fw = 259,09) en 260 ml de acetona se añade lentamente durante un período de aproximadamente siete (7) horas a la solución de amina en agitación. Un aceite pegajoso, blanco sólido cristalino o claro viscoso sale de la solución varios minutos en la reacción. La mezcla se agitó durante la noche (18 horas) a temperatura ambiente y se enfría brevemente a 4 °C. O bien el sólido se filtra a través de vidrio sinterizado o el líquido de reacción se decanta del aceite viscoso. El disolvente se puede eliminar de la solución de filtrado o el sobrenadante, y el exceso de diamina sin reaccionar se puede recuperar. El producto en bruto se disuelve en una cantidad mínima de etanol absoluto caliente (450-500 ml). La solución se filtra en caliente, y se introducen cuidadosamente burbujas de HBr gaseoso en la mezcla hasta que la solución es ligeramente ácida (pH = 4-5, papel de pH). La solución se deja enfriar hasta la temperatura ambiente, y luego se enfría a 4 °C y se deja reposar durante la noche. Se añaden 400 ml de acetona / éter dietílico frío (50/50 v / v) y la mezcla se deja en reposo a 4 °C durante tres (3) horas más. La mezcla de reacción se filtra rápidamente a temperatura ambiente usando un filtro de vidrio sinterizado, y la masa sólida se lava con éter dietílico. El sólido blanco delicuescente se seca en un horno de vacío durante la noche a 50 °C y se almacena sobre P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> en un vaso desecador. Este procedimiento produce aproximadamente 430 g de producto en bruto que es 94-98% de pureza mediante HPLC.

#### Procedimiento 11b:

423,3 g del producto anterior (0,90 mol, fw = 470,24) y 900 ml de ácido clorhídrico al 37% se colocan en un recipiente de vidrio de presión de 1 litro de paredes pesadas que está equipado con una barra magnética de agitación-y un tapón roscado de teflón. La mezcla se calienta a 80 °C, se agitó durante aproximadamente 21 horas, se filtra a través de vidrio sinterizado y se enfrió a temperatura ambiente. El disolvente y los ácido volátiles se separan al vacío usando un evaporador rotatorio. Se añaden 800 ml de etanol absoluto, y la mezcla se calienta brevemente hasta casi la ebullición con agitación y, finalmente, se enfría a temperatura ambiente. El etanol y los demás volátiles se eliminan por completo de nuevo al vacío. El residuo de color amarillo pálido se disuelve en una cantidad mínima de etanol absoluto caliente (400-500 ml), y luego trietilamina se añade gota a gota con agitación hasta que el pH de la solución es casi neutro (pH = 7,0, papel de pH). La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y luego se deja reposar durante la noche (18 horas) a 4 °C. Se forma un sólido cristalino blanco. Los cristales blancos se obtienen mediante filtración rápida a temperatura ambiente usando un filtro de vidrio sinterizado y se lavan con acetona / éter dietílico (50/50 v / v). El producto se seca inicialmente haciendo pasar nitrógeno seco a través del lecho de filtro y luego se seca en un horno de vacío durante la noche a 50 °C. Este procedimiento de hidrólisis y cristalización produce sobre 202 g (89%) de producto purificado con HPLC pureza de 98-99%.

Modificaciones: El HBr acuoso al 48% puede usarse en lugar de HCl al 37% para la hidrólisis del éster de fosfonato. Este es un procedimiento general para la preparación de compuestos de amina-cuat fosfonoalquilo sustituido. El uso de los ésteres de dibencilo más caros de ácidos fosfónicos permite la eliminación conveniente de los grupos bencilo por hidrogenación catalítica suave.

**Ejemplo 12: (Procedimiento 12)** Preparación de hidróxido de N-(3-trimetilamoniopropil)dimetilamina (29d, fw = 350,56)

108,6 g de cloruro de N-(3-trimetilamoniopropil) dimetilamina clorhidrato recristalizado (500 mmol, 29a, fw = 217,19) se disuelve en 425 ml de agua desionizada desgasificada en atmósfera de N<sub>2</sub> sin CO<sub>2</sub> en un matraz de polipropileno sin vidrio. A la solución se añaden 117,0 g de óxido de plata (505 mmol, fw = 231 0.74) y se agita vigorosamente con una hélice mecánica de polipropileno a temperatura ambiente durante 48 horas. La mezcla se filtró a través de un filtro de polipropileno / fieltro en un filtro Buechner de polipropileno en un matraz receptor de polipropileno bajo un manto de gas nitrógeno. La solución transparente como el agua se coloca en un evaporador rotatorio, y el agua se separa parcialmente bajo vacío durante un período de 36-48 horas, mientras que el producto (líquido viscoso) se mantiene a aproximadamente 50 °C usando un baño de calentamiento externo. La valoración ácido-base (hidróxido) y el análisis de HPLC (cationes) muestran que la solución final contiene 36 % del hidróxido cuat muestra que los residuos de Ag<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> son inferiores a 10 ppm. La solución se almacena a temperatura ambiente en un contenedor sellado, de polipropileno limpio. El rendimiento es casi cuantitativo.

Modificaciones: Este procedimiento es generalmente aplicable a la mayoría de los tampones de amina cuat descritos en el presente documento. En general, los tampones que contienen grupos amida o grupos 2-hidroxietilo tienen una estabilidad limitada en condiciones fuertemente básicas. Estos mismos compuestos tampón tales como sales cloruro / bromuro son adecuados para la conversión en sales de hidróxido utilizando procedimientos de intercambio iónico, electrólisis y electrodiálisis.

**Ejemplo 13: (Procedimiento 13)** Preparación de bis [N-(3-trimetilamoniopropil) dimetilamina]carbonato (29e, fw = 162,28)

108,6 g de cloruro de N-(3-trimetilamoniopropil) dimetilamina clorhidrato recristalizado (500 mmol, fw = 217,19) se disuelve en 425 ml de agua desionizada desgasificada en atmósfera de N<sub>2</sub> sin CO<sub>2</sub> en un matraz de polipropileno sin vidrio. A la solución se añaden 139,0 g de óxido de plata (600 mmol, fw = 231 0.74) y se agita vigorosamente con una

hélíce mecánica de polipropileno a temperatura ambiente durante 48 horas. La mezcla se filtró a través de un filtro de polipropileno / fieltro en un filtro Buechner de polipropileno en un matraz receptor de polipropileno bajo un manto de gas nitrógeno. Se introdujeron burbujas de gas CO<sub>2</sub> a través del filtrado en agitación para convertir el hidróxido en el carbonato. Un medidor de pH con un electrodo de vidrio calibrado se utiliza para supervisar periódicamente el pH de la solución. La reacción se considera completa cuando el pH final es  $11,9 \pm 0,1$ . A este pH, la reacción con dióxido de carbono es mucho más lenta, debido a la reacción de carbonato con CO<sub>2</sub> es lenta, mientras que la reacción de hidróxido con CO<sub>2</sub> es rápida. Esta solución transparente como el agua se coloca en un evaporador rotatorio, y el agua se separa parcialmente bajo vacío durante un período de 36-48 horas, mientras que el producto (líquido viscoso) se mantiene a aproximadamente 50 °C usando un baño de calentamiento externo. La valoración ácido-base (carbonato) y el análisis de HPLC (cationes) muestran que la solución final contiene 38% del carbonato de cuat; la absorción atómica muestra que los residuos de Ag<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> son inferiores a 1 ppm. La solución se almacena a temperatura ambiente en un contenedor sellado, de polipropileno limpio. El rendimiento es casi el 100%.

#### Ejemplo 14: Ensayos de inhibición del crecimiento microbiano

Los ensayos de inhibición de crecimiento microbiano se realizan en placas de 96 pocillos con un volumen de pocillo de 400 µl. En manos de los presentes inventores, los datos obtenidos de esta manera son casi equivalentes a los obtenidos en matraces de agitación tradicionales, mientras que la recogida de datos es más precisa y conveniente. Se usan dos lectores de placas calibradas de modo que dos placas, que corresponden a un solo organismo, se puedan leer al mismo tiempo. Cada placa contiene 80 células de un organismo y cuatro tampones cada uno a cinco concentraciones (25, 50, 100, 225, 500 mM) estando cada combinación de concentración del tampón (20) repetida cuatro veces. Cada una de estas células contenía 50 µl de un cultivo celular calibrado fresco más 250 µl de cultivo celular estéril fresco. Además, cada placa contenía ocho células idénticas con 250 µl de medio estéril, de medio de crecimiento sin tampón más 50 µl de cultivo celular fresco y ocho células con 300 µl de medio de crecimiento estéril y ningún organismo. El crecimiento microbiano se mide por medio de mediciones de la dispersión de luz / absorbancia a 600 nm cada 15 a 60 minutos para que el plazo señalado. Cada 15 minutos, cada placa se somete a agitación / vibración que resuspende los organismos y estimula la aireación; este proceso se repite justo antes de cada lectura de la absorbancia. Para cada medio, se preparan seis botellas de los medios estériles, uno para cada concentración de tampón (0, 30, 60, 120, 270, 600 mM) de modo que cuando cada uno se diluye en la placa, se pueden obtener las concentraciones deseadas. Los componentes de los medios (véase más adelante), el tampón añadido y el agua se mezclan, y se ajusta el pH en el valor adecuado. Cada botella de medio se esteriliza por calor (121 °C, 103,4 kPa, 20 minutos), se enfría y, si es necesario, el pH se reajusta al valor adecuado de una manera estéril con HCl al 37% o 50% de NaOH.

Basado en la experiencia previa con estos organismos, se llevan a cabo una serie de mediciones de crecimiento microbiano para determinar las condiciones óptimas de crecimiento. Cuatro composiciones de medios diferentes únicas para cada organismo a cuatro valores de pH (6,0, 6,5, 7,0, 7,5) se miden a tres temperaturas (23 °C, 30 °C, 37 °C). Afortunadamente, se han encontrado combinaciones condiciones de crecimiento casi óptimas para que el mismo pH de  $7,0 \pm 0,1$  pueda usarse para los cuatro organismos que se enumeran a continuación

Organismo	NºATCC	Temp (°C)	pH	Tiempo	Medio	Cultivo inicial (ufc/ml)
<i>E. coli</i>	ATCC 13525	37 ± 1	7,0 ± 0,1	36 h	Caldo TS	1,7 x 10 <sup>10</sup>
<i>P. fluorescens</i>	ATCC 19020	30 ± 1	7,0 ± 0,1	48 h	Caldo PM	2,1 x 10 <sup>10</sup>
<i>Pichia pastoris</i>	ATCC 20864	30 ± 1	7,0 ± 0,1	45 h	Caldo ME	1,3 x 10 <sup>10</sup>
<i>S. cerevisiae</i>	ATCC 18824	30 ± 1	7,0 ± 0,1	33 h	Caldo ME	5,2 x 10 <sup>7</sup>

*E. coli*: *Escherichia coli*

*P. fluorescens*: *Pseudomonas fluorescens*

*P. pastoris*: *Pichia pastoris* (también llamado *Komagataella pastoris*)

*S. cerevisiae*: *Saccharomyces cerevisiae*

Las composiciones de los medios de cultivo se enumeran a continuación para un litro de medio. El pH se ajusta a  $7,0 \pm 0,1$ , tanto antes como después de la esterilización por calor. Se obtienen resultados similares de crecimiento cuando se añade el tampón catiónico añadido antes de la esterilización térmica y después de la esterilización térmica a través de filtración estéril. Se conocen varios medios de crecimiento útiles que contienen metanol para *Pichia*, pero el caldo ME es igualmente bueno en las condiciones actuales, y, después, la evaporación de metanol no es un problema. Las cantidades siguientes se proporcionan como g / l en medio de crecimiento esterilizado.

45

## ES 2 525 752 T3

Caldo ME modificado	15,0 g de glucosa 5,0 g de peptona de carne 20,0 g de extracto de malta 2,0 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Caldo TS modificado	2,5 g de glucosa 17,0 g de peptona de caseína 3,0 g de peptona de soja 5,0 g de NaCl 2,5 g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Caldo PM modificado	2,5 g de glucosa 10,0 g de peptona de carne 10,0 g de peptona de caseína 10,0 g de glicerina 1,5 g de K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,5 g de NH <sub>4</sub> Cl 0,5 g de MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O

Los tampones en estas pruebas son DEAGA, Meaga, Moga, DIMEGA, DEGA, TRIS, MES y TAPS. Las estructuras de DEAGA, Meaga, MOGA, DIMEGA y DEGA, todos los cuales están dentro del ámbito de la presente invención, se proporcionan en el presente documento. TRIS, MES y TAPS son tampones convencionales conocidos en la técnica.

- 5 Las cepas bacterianas y de levaduras se cultivan y se cuentan varias veces en cada medio de crecimiento respectivo obteniendo cultivos estables, frescos y reproducibles de densidad conocida como una función de tiempo. El recuento microbiano se lleva a cabo de la manera habitual mediante el uso de diluciones en serie seguido de recuento en placa. Cada cultivo se diluye y se siembra tres veces, y los valores se promedian. Cuando un cultivo alcanza la densidad microbiana adecuada (ufc / ml), dos placas de 96 pocillos se cargan rápidamente como se describe anteriormente, y la
- 10 lectura de las placas se inicia mediante dos lectores de placas coincidentes.

Los resultados del crecimiento se muestran en las Figuras 1 -4, que son gráficos que representan el crecimiento comparativo de cuatro especies diferentes de microorganismos en medios de crecimiento que contienen compuestos tampón dentro y no dentro del ámbito de la presente invención, a diversas concentraciones de los compuestos tampón.

- 15 Se debe tener precaución en la interpretación de los estudios biológicos comparativos de este tipo. En este caso, la comparación de diferentes tampones con diferentes valores de pK<sub>a</sub> al mismo pH significa que algunos tampones están principalmente en la forma básica (MES, DEAGA), algunos están principalmente en forma ácida (TAPS, DEGA) y algunos están en el medio. Adicionalmente, algunos tampones son catiónicos, algunos son aniónicos, algunos son neutros y algunos son neutros-zwiteriónicos. Sin embargo, una situación aún peor surgiría por comparación del
- 20 crecimiento de mismo organismo a diversos valores de pH donde cada pH = pK<sub>a</sub> para cada tampón respectivo.

Teniendo en cuenta las precauciones anteriores, se pueden realizar algunas generalizaciones útiles acerca de los resultados de crecimiento microbiano.

- (a) No hay ninguna indicación de toxicidad aguda para ninguno de los ocho tampones (5 catiónicos) en ninguno de los tres medios de crecimiento.
- 25 (b) Los cinco tampones catiónicos son totalmente compatibles con los tres medios de crecimiento sin evidencia de precipitación, formación de color o formación de olor, ya sea antes o después de la esterilización.
- (c) Los tampones catiónicos son tolerantes a las condiciones de tratamiento en autoclave estándar y a los procedimientos de filtración estériles.
- (d) De los tres tampones estándar probados, la inhibición del crecimiento a concentraciones más altas siempre sigue el orden TRIS > MES > TAPS, siendo TAPS consistentemente el mejor de los ocho tampones ensayados.
- 30 (e) *Escherichia* es único; existen pequeñas diferencias, pero en general hay poca inhibición del crecimiento por cualquier tampón en cualquier concentración.
- (f) En contraste, *Saccharomyces* es más sensible a las altas concentraciones de todos los tampones.
- (g) Los cuatro organismos muestran que los cinco tampones catiónicos en su conjunto son similares entre sí, siendo mejor que TRIS (1<sup>+</sup>/0) y aproximadamente igual que MES (0/1) y no tan buena como TAPS (0/1).
- 35 (h) Los cinco tampones catiónicos no muestran inhibición del crecimiento significativa para ninguno de los organismos a concentraciones de 100 mM o menos.

(l) Pseudomonas muestra una discriminación significativa entre los tampones catiónicos: DEAGA y Meaga son claramente mejores que DIMEGA y DEGA, estando MOGA entremedias, y siendo los 5 tampones catiónicos mejores que TRIS.

5 (j) La comparación de los tampones con valores de  $pK_a$  no muestra las nuevas tendencias, sólo el refuerzo de las tendencias ya señaladas anteriormente: DEAGA (6.1) y MES (6.1) tienen aproximadamente el mismo comportamiento, DIMEGA (7,9) es mejor que TRIS (8,1), TAPS (8,4) es mejor que DEGA (8.5).

### Ejemplo 15: Medidas de precisión de los valores $pK_a$ para los tampones de pH

10 En estos estudios se estudian reactivos analíticos de calidad de alta pureza: cloruro de potasio, hidróxido de potasio, ftalato ácido de potasio estándar primario (KAP, Baker), 18 meg ohm de agua desionizada - agua doblemente destilada (sin  $CO_2$ ). Los tampones como sales de clorhidrato o bromhidrato se recristalizan cuidadosamente en disolventes orgánicos que contenían un pequeño exceso de cloruro de hidrógeno gaseoso o bromuro de hidrógeno hasta que la pureza, medida mediante HPLC fue del 99,5% o mayor. Se secan en un horno de vacío a 50 °C durante 18-24 horas y se almacenaron en un desecador de vidrio sobre  $P_2O_5$ . Las impurezas restantes son sólo agua inerte / disolvente y trazas de HCl o HBr residual. La mayoría de los tampones son estables en el aire atmosférico; unos pocos son algo higroscópicos. Durante el pesaje de los compuestos tampón, se debe tener cuidado de evitar o minimizar la absorción de humedad atmosférica. Las soluciones que contienen tampón 10 mM y KCl 80 mM se preparan cuidadosamente utilizando agua desionizada desgasificada y matraces aforados estandarizados. Se llevan a cabo seis titulaciones de pH independientes para cada compuesto tampón usando KOH 100 mM sin que está cuidadosamente estandarizada frente a CAP. Las valoraciones se llevan a cabo utilizando un valorador automático equipado Mettler-Toledo (Columbus, OH) Modelo T50 con una celda de valoración de vidrio con camisa de 75 ml, Modelo DG-15 1-SC de electrodo combinado de pH (Ag / AgCl de referencia) y una precisión de bureta automática de 10 ml. El valorador se controla y los datos se recogen mediante el software de titulación LabX, versión 2.5. La célula de valoración se controla por termostato a 10,00 ± 0,05 °C, 25,00 ± 0,05 °C o 40,00 ± 0,05 °C. Las temperaturas se miden usando un termómetro de mercurio-NIST trazable. Las valoraciones se ajustan de modo que el punto final se encuentra cerca de 5 ml el punto de liberación de la bureta. Las titulaciones incrementales se llevan a cabo con un volumen de incremento de 100 µl y con agitación continua; se permite que el sistema repose después de cada adición incremental (10-30 s) antes de que se registre una lectura. Se usan tampones precisos trazables con NIST (± 0,001 unidades de pH) con valores conocidos con precisión a 2, 4, 7, 10, 12 en el intervalo de temperatura de 10-40 °C (Oakton Instruments, Vernon Hills, IL). El electrodo es calibrado a pH = 2, 4, 10 y 12. El tampón a pH = 7 se mide de forma independiente. Si la medición de pH = 7 es precisa a ± 0,002 unidad de pH, una valoración se lleva a cabo; si no, se repite la calibración. Una calibración de pH se lleva a cabo antes de cada experimento de valoración. Para tampones con valores de  $pK_a$  inferiores a 3,5 o superior a 10,5, las concentraciones (tampón, KOH, KCl) se incrementó en 5 veces o 10 veces. En estas condiciones, sólo una o dos valoraciones se llevaron a cabo, y el valor de la  $pK_a$  valor se estimó en ± 0,2 unidad logK. Los datos experimentales volumétricos se analizaron mediante el paquete de software pKas de Martell y Motekaitis (Martell, AE; Motekaitis, R. J., Determination and Use of Stability Constants, 2nd ed., VCH Publishers, New York, 1992; ISBN 1-56081-5116-7.). Una fuente abierta g77 compilador Fortran para Fortran 77 (descargado de [www.neng.usu/cee/faculty/gurro/Classes/Classes\\_Fall2002/Fortran77/Fortran77Course.html](http://www.neng.usu/cee/faculty/gurro/Classes/Classes_Fall2002/Fortran77/Fortran77Course.html)) se utiliza para ejecutar el software PKAS en un ordenador de sobremesa. Los datos de cada carrera se transfieren (cortar / pegar) desde el software valorador a una hoja de cálculo en formato Excel, y luego se transfieren (cortar / pegar) a un formulario debidamente formateado en un archivo de entrada de datos para PKAS. Para cada titulación, la concentración del tampón se refina, así como la cantidad de ácido fuerte residual. En el intervalo de  $pK_a$  de 3,5 - 10,5, los puntos de datos utilizados en el refinamiento de  $pK_a$  se limitan al intervalo de equivalencia de 0,1 - 1 0,2 cuando están disponibles. Para los compuestos seleccionados, los resultados de  $pK_a$  precisos y completamente refinados con los límites de confianza se dan a continuación.

Tabla 2 Valores de pH medidos

Tampón	Med. $pK_a$	$pK_a$ Pred.	Dv.Est. <sup>c</sup>	GOFProm. <sup>d</sup>	Int.Sigma <sup>d</sup>	Conc.tampón	Multiplicador	H <sup>+</sup> Resid. <sup>a</sup>
MOGA HCl	5,597	5,6	± 0,006	± 0,002	0,3 - 0,6	0,967		0,03 %
DEAGA HCl	6,049	6,1	± 0,007	± 0,002	0,3 - 0,7	0,977		0,02 %
MEAGA HCl	7,097	7,0	± 0,004	± 0,008	1,0 - 1,7	0,984		0,02 %
DIMEGA HCl	7,894	7,9	± 0,002	± 0,002	0,2 - 0,4	0,994		0,07 %
PIGA HCl	8,277	8,3	± 0,004	± 0,009	0,8 - 1,0	0,944		0,04 %
DEGA HCl	8,467	8,5	± 0,002	± 0,002	0,2 - 0,4	0,983		0,03 %

Tampón	Med. pK <sub>a</sub>	pK <sub>a</sub> Pred.	Dv.Est. <sup>c</sup>	GOFProm. <sup>b</sup>	Int.Sigma <sup>b</sup>	Conc.tampón	Multiplicador	H <sup>+</sup> Resid. <sup>a</sup>
Carnitina HCl	3,825	3,8	± 0,005	± 0,003	0,5 - 0,8		0,985	0,02 %
MES	6,088	6,1 <sup>d</sup>	± 0,005	± 0,003	0,6 - 0,9		0,996	<0,01 %
MOPS	7,099	7,0 <sup>d</sup>	± 0,003	± 0,003	0,6 - 1,2		0,999	<0,01 %
TAPS	8,410	---	± 0,002	± 0,003	0,7 - 0,8		0,998	<0,01 %

a) 100\*(moles de exceso de H<sup>+</sup>)/(moles de tampón)

b) Véase la ref. 3; GOF = bondad de ajuste

c) Calc. de seis experimentos repetidos

d) añadir 0,2 porque no hay cuat

### Ejemplo 16: Medidas aproximadas de los valores pK<sub>a</sub> para los tampones

Este procedimiento se utiliza cuando las impurezas no reactivas son > 5% (HPLC), cuando las impurezas reactivas son > 1% (HPLC), cuando se dispone de tampón insuficiente o cuando se ve un ajuste de la curva notablemente malo en el procedimiento anterior. El procedimiento experimental es casi el mismo que en el procedimiento anterior, pero los datos experimentales volumen - pH se procesan de manera diferente. Por lo general, sólo una o dos valoraciones se llevan a cabo. Se estimó que el pK<sub>a</sub> era el mismo que el pH de la curva de titulación en el punto de semiequivalencia. Los valores de pK<sub>a</sub> estimados pueden ser tan buenos a ± 0,1 o tan pobres como ± 0,5 en función de la naturaleza y cantidades de impurezas.

### 10 Ejemplo 17. Análisis HPLC de la pureza del tampón.

**Procedimiento 17a Modo mixto débil – Intercambio de cationes de fase inversa** Los análisis de la pureza se llevaron a cabo utilizando Aguas Corp. (Milford, MA) HPLC gradiente equipado con un detector Waters 996 PDA en tándem con un Dionex / ESA Biosciences (Chelmsford, MA) detector Corona Plus CAD y una columna de 5 µm, 100 A, 4,6 x 150 mm PrimeSep 200 de cromatografía de modo mixto (Tecnologías SIELC, Prospect Heights, IL). Los tampones catiónicos y la mayor parte de sus impurezas tienen poca absorción UV así que se necesita el detector CAD; sin embargo, el anión bromuro y algunas impurezas del tampón absorben en UV. Inyección de la muestra: 5 µl de 5 mg / ml de solución de muestra en un tampón A

Caudal: 1,0 ml/min.

20 Tampón **A**: 95% H<sub>2</sub>O + 5% CH<sub>3</sub>CN (v / v) con 0,2% (v / v) de ácido trifluoroacético.

Tampón **B**: 25 % H<sub>2</sub>O + 75 % CH<sub>3</sub>CN (v / v) con 0,2% (v / v) de ácido trifluoroacético.

Procedimiento de gradiente:	100 % de A	0 - 1 min
	100 % A a 50 % de A/50 % de B	1 - 21 min
	50 % de A/50 % de B	21 - 26 min
	50 % de A/50 % de B a 100 % de B	26 - 27 min
	100 % de B	27 - 30 min

25 **Procedimiento 17b Modo mixto fuerte – Intercambio de cationes de fase inversa** Los análisis de la pureza se llevaron a cabo utilizando Aguas Corp. (Milford, MA) HPLC gradiente equipado con un detector Waters 996 PDA en tándem con un Dionex / ESA Biosciences (Chelmsford, MA) detector Corona Plus CAD y una columna de 5 µm, 100 A, 4,6 x 150 mm PrimeSep A de cromatografía de modo mixto (Tecnologías SIELC, Prospect Heights, IL).

Inyección de la muestra: 5 µl de 5 mg de solución de muestra / ml en un tampón A

Caudal: 1,0 ml/min.

Tampón **A**: 100 % H<sub>2</sub>O + 0 % CH<sub>3</sub>CN (v / v) con 0,2% (v / v) de ácido trifluoroacético.

Tampón **B**: 25 % H<sub>2</sub>O + 75 % CH<sub>3</sub>CN (v / v) con 0,2% (v / v) de ácido trifluoroacético.

Procedimiento de gradiente:	100 % de A	0 - 1 min
	100 % de A a 100 % de B	1 - 21 min
	100 % de B	21 - 26 min

**Procedimiento 17c -HILIC:** Los análisis de la pureza se llevaron a cabo utilizando Aguas Corp. (Milford, MA) HPLC gradiente equipado con un detector Waters 996 PDA en tándem con un Dionex / ESA Biosciences (Chelmsford, MA) detector Corona Plus CAD y una columna de 5  $\mu\text{m}$ , 100 A, 4,6 x 250 mm Obelisc N de cromatografía de modo mixto (Tecnologías SIELC, Prospect Heights, IL).

5 Inyección de la muestra: 5  $\mu\text{l}$  de 5 mg de solución de muestra / ml en un tampón **A**

Caudal: 1,0 ml/min.

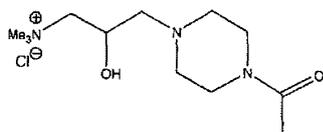
Tampón **A:** 25 %  $\text{H}_2\text{O}$  + 75 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  (v / v) con 0,1 % (v / v) de ácido trifluoroacético.

Tampón **B:** 70 %  $\text{H}_2\text{O}$  + 30 %  $\text{CH}_3\text{CN}$  (v / v) con 0,1 % (v / v) de ácido trifluoroacético.

Procedimiento de gradiente:	100 % de A	0 - 10 min
	100 % de A a 100 % de B	10 - 20 min
	100 % de B	20 - 25 min

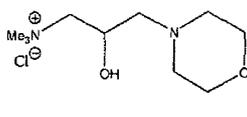
10 Las estructuras y los nombres de los compuestos tampón ejemplares de acuerdo con diversas realizaciones de la presente invención se muestran en las páginas siguientes. Todos los compuestos tampón se identifican por su nombre y algunos se identifican por un número de compuesto y un acrónimo, el acrónimo creado de conformidad con las prácticas comunes en la técnica de los tampones.

15 Ejemplos de reacciones y compuestos de acuerdo con varias realizaciones de la presente invención se muestran en la **Tabla 1** siguiente. Los números de los compuestos de la Tabla 1 corresponden a los números de los compuestos en las páginas anteriores que muestran las estructuras y los nombres de los compuestos. Los números del Procedimiento corresponden a los ejemplos que tienen el mismo número.



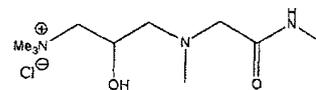
**40 APAGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-N'-acetilpiperazina



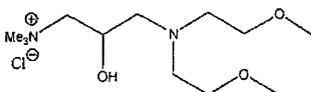
**1 MOGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-morfolina



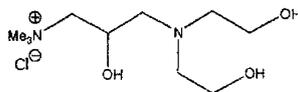
**41 MAGGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-N,N'-dimetilglicinamida



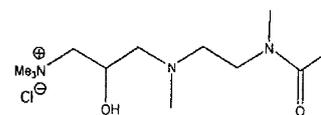
**2 BIMEGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-bis(2-metoxietil)amina



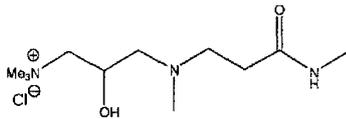
**3 DEAGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-dietanolamina



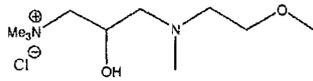
**42 DIMAGEA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-N,N'-dimetil-N'-acetil-etilendiamina



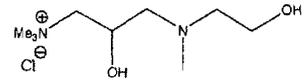
**43 MALAGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-N,N'- dimetil-β-alanamida



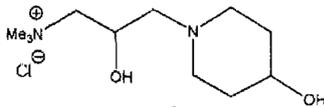
**4 MEMGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-N-metil-2-metoxietilamina



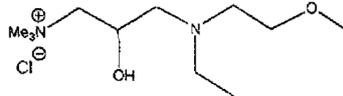
**5 MEAGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-N-metiletanolamina



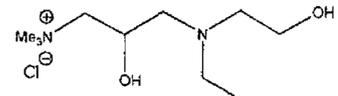
**44 OPIGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-piperidine



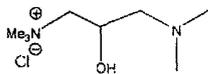
**6 MEEGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-N-etil-2-metoxietilamina



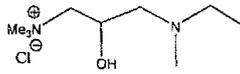
**7 TEAGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-N-etiletanolamina



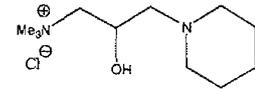
**8 DIMEGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-dimetilamina



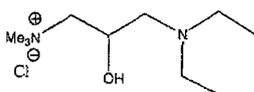
**45 EMGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-dimetilamina



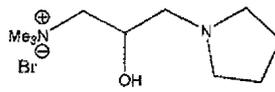
**9 PIGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-piperidina



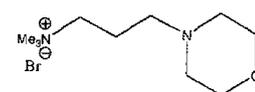
**10 DEGA**

Cloruro de N-(2-hidroxi-3-trimetilamonio propil)-dietilamina



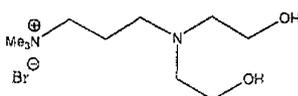
**11 PIRGA**

Bromuro de N-(3-trimetilamonio-propil) pirrolidina



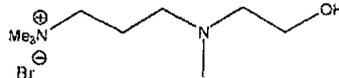
**12 MOPA**

Bromuro de N-(3-trimetilamonio-propil) morfolina



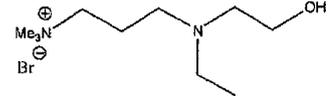
**13 DEAPA**

Bromuro de N-(3-trimetilamonio-propil) dietanolamina



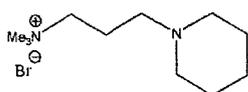
**14 MEAPA**

Bromuro de N-(3-trimetilamonio-propil)-N-metiletanolamina



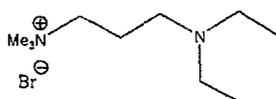
**15 TEAPA**

Bromuro de N-(3-trimetilamonio-propil)-N-etiletanolamina



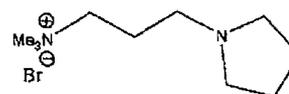
**16 PIPA**

Bromuro de N-(3-trimetilamonio-propil)-piperidina



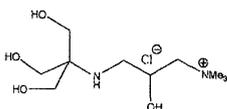
**17 DEPA**

Bromuro de N-(3-trimetilamonio-propil)-dietilamina



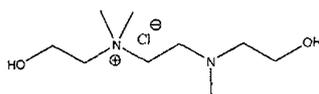
**18 PURPA**

Bromuro de N-(3-trimetilamonio-propil)-pirrolidina



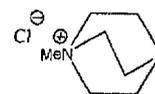
**19 TRIGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-tris(hidroximetil)-aminometano



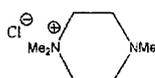
**20 TIMDOD**

Cloruro de 3,3,6-Trimetil-3,6-diazaocclano-1,8-diol



**21 MEDBOC**

Cloruro de N-Metildiazo biciclooctano



**22 TIMEP**

Cloruro de 1,1,4-Trimetil piperazinio



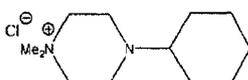
**23 TEP**

Bromuro de 1,1,4-Trietil piperazinio



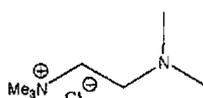
**24 IPEMP**

Cloruro de 1,1-Dimetil-4-isopropil-piperazinio



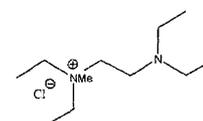
**25 CEMP**

Cloruro de 1,1-Dimetil-4-ciclohexil-piperazinio



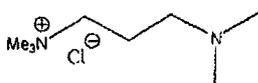
**27 DIMEO**

Cloruro de N-(2-trimetilamonio-etil) dimetilamina



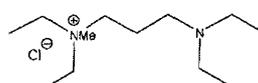
**28 TEEQ**

Cloruro de N-(2-Dietilmetil amonio-etil) dietilamina



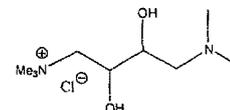
**29 DIMEPA**

Cloruro de N-(3-Trimetilamonio-propil) dimetilamina



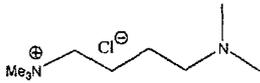
**30 TEPA**

Cloruro de N-(3-Dietilmetilamonio-propil) dietilamina



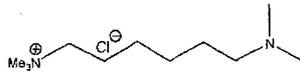
**31 TEMBOQ**

Cloruro de N-(4-Trimetilamonio-2,3-dihidroxitul) dimetilamina



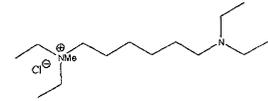
**32 DIMEBA**

Cloruro de N-(4-Trimetilamonio butil)-  
dimetilamina



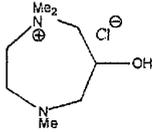
**33 DIMEXA**

Cloruro de N-(6-Trimetilamonio hexil)-  
dimetilamina



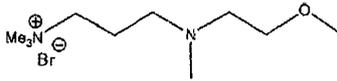
**34 TEXA**

Cloruro de N-(6-Dietilmetilamonio-hexil) dietilamina



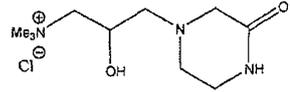
**37 TIMOHOP**

Cloruro de 1,1,4-Trimetil-6-  
hidroxi-homopiperazinio



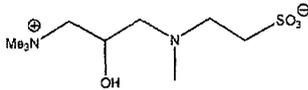
**38 MEMPA**

Bromuro de N-(3-Trimetilamonio propil)-N-  
metil-2-metoxietilamina



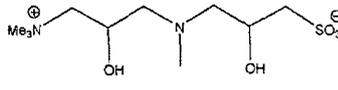
**39 OPAGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetil-  
amonio propil)-3-  
cetopiperazina



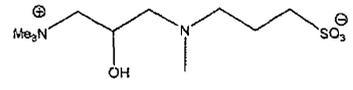
**46**

N-(2-Hidroxi-3-  
trimetilamonio propil)-  
N-metiltaurina



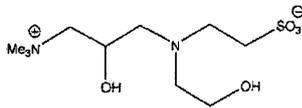
**47**

N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-  
N-metil-2-hidroxi homotaurina



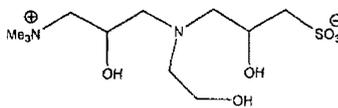
**48**

N-(2-Hidroxi-3-trimetilamonio propil)-  
N-metil homotaurina



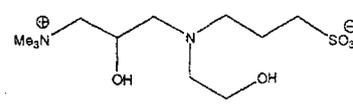
**49**

N-(2-Hidroxi-3-  
trimetilamonio propil)-  
N-(2-hidroxi etil) taurina



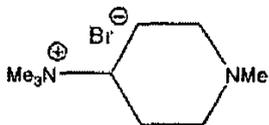
**50**

N-(2-Hidroxi-3-  
trimetilamonio propil)-  
N-(2-hidroxi etil)-2-  
hidroxi homotaurina



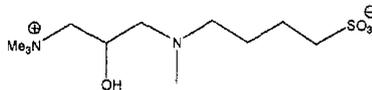
**51**

Sal interna de N-(2-hidroxi-3-  
trimetilamonio propil)-  
N-(2-hidroxi etil) homotaurina



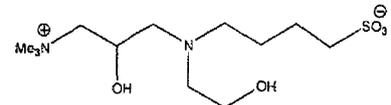
**26 TEMAP**

Bromuro de 4-(Trimetilamonio)-  
1-metilpiperidina



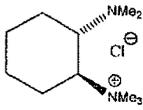
**52**

N-(2-Hidroxi-3-  
trimetilamonio propil)-  
N-(4-sulfoetil)metilamina



**53**

N-(2-Hidroxi-3-  
trimetilamonio propil)-  
N-(4-sulfoetil) etanolamina



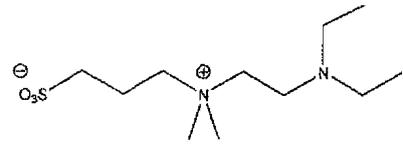
**35 PEMDAC**

Cloruro de trans-1-Dimetilamino-2-trimetilamonio-ciclohexane



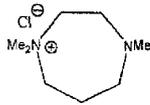
**54**

Sal interna de N,N,N',N'-Tetrametil-N-(3- sulfopropil)etilen-diamina



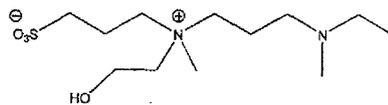
**55**

Sal interna de N,N'-Dietil-N,N'-dimetil-N-(3-sulfopropil)etilendiamina



**36 TIMHOP**

Cloruro de 1,1,4-Trimetilhomopiperazinio



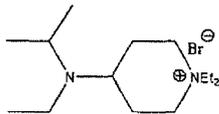
**56**

Sal interna de N,N'-Dimetil-N,N'-bis(2-hidroxietil)-N-(3-sulfopropil)-1,3-propanodiamina



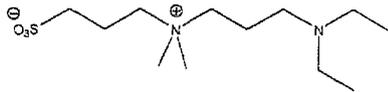
**57**

Sal interna de N,N,N',N'-tetrametil-N-(3-sulfopropil)-1,3-propanodiamina



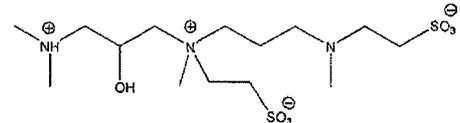
**74 ITEAP**

Bromuro de 4-(N-etilisopropilamino)-1,1-dietilpiperidinio



**58**

Sal interna de N',N'-Dietil-N,N-dimetil-N-(3-sulfopropil)-1,3-propanodiamina



**59**

Di-sal interna de 1,1,5,9-Tetrametil-2-hidroxi-5,9-bis(2-sulfoetil)-1,5,9-triazanonano



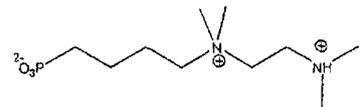
**79a**

DiBromuro de N,N,N',N'-Tetrametil-N-(3-dietilfosfonopropil)-1,3-propanodiamonio



**60**

Di-sal interna de N,N,N',N'-tetrametil-N-(3-fosfonopropil)-1,3-propanodiamonio



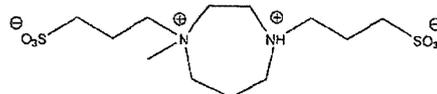
**61**

Di-sal interna de N,N,N',N'-Tetrametil-N-(4-fosfonobutil)etilen-diamonio



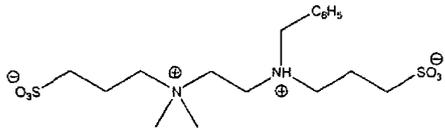
**62**

Di-sal interna de N-Metil-N,N'-bis(3-sulfopropil)piperazinio



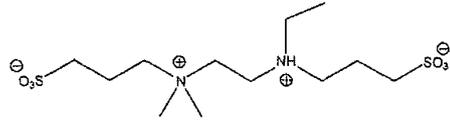
**63**

Di-sal interna de N-Metil-N,N'-bis(3-sulfopropil)homopillerazinio



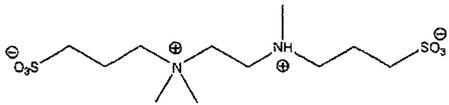
**64**

Di-sal interna de N,N'-Dimetil-N'-bencil-N,N'-bis-  
(3-sultopropil) etilendiamonio



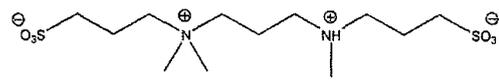
**65**

Di-sal interna de N,N'-Dimetil-N'-etil-N,N'-bis-  
(3-sulfopropil) etilendiamonio



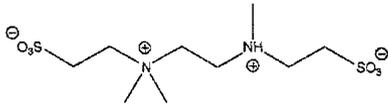
**66**

Di-sal interna de N,N,N'-Trimetil-N,N'-bis(3-sulfopropil)-  
etilendiamonio



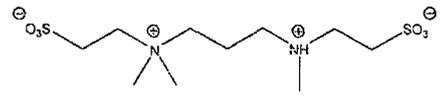
**67**

Di-sal interna de N,N,N'-Trimetil-N,N'-bis(3-sulfopropil)-  
1,3-propanodiamonio



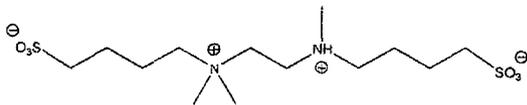
Di-sal interna de **68**

N,N,N'-Trimetil-N,N'-bis-  
(2-sulfoetil)etilendiamonio



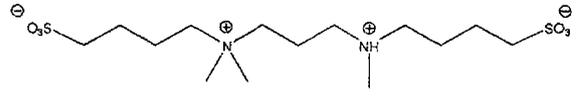
**69**

Di-sal interna de N,N,N'-Trimetil-N,N'-bis(2-sulfoetil)-  
1,3-propanodiamonio



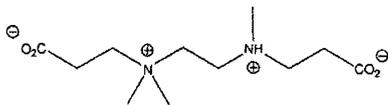
**70**

Di-sal interna de N,N,N'-Trimetil-N,N'-bis- (4-sulfobutil)-  
etilen-diamonio



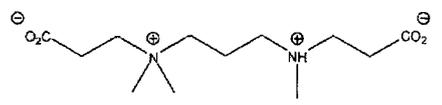
**71**

Di-sal interna de N,N,N'.Trimetil-N,N'-bis(4-sulfobutil)-1,3-  
propanodiamonio



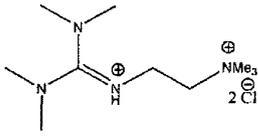
**72**

Di-sal interna de N,N,N'-Trimetil-N,N'-bis(2-carboxietil)-  
etilendiamonio



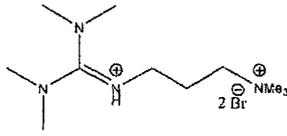
**73**

Di-sal interna de N,N,N'.Trimetil-N,N'-bis(2-carboxietil)-  
1,3-propanodiamonio



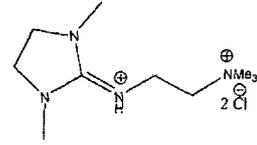
**75 GEQ**

Cloruro de 2-(2-Trimetilamonioetil)-1,1,3,3-tetrametilguanidina clorhidrato



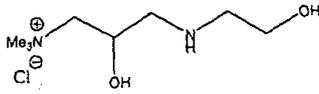
**76 GUPA**

Bromuro de 2-(3-trimetilamoniopropil)-1,1,3,3-tetrametilguanidina bromhidrato



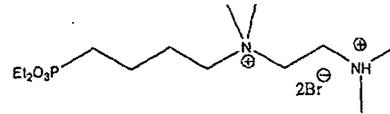
**77 MEGEO**

Cloruro de N(2-(1',3'-dimetilimidazolina-2'-iminato)etil)trimetilamonio clorhidrato



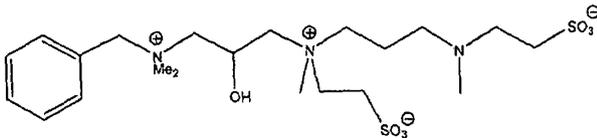
**78 EAGA**

Cloruro de N-(2-Hidroxi-3-trimetilamoniopropil)-etanolamina



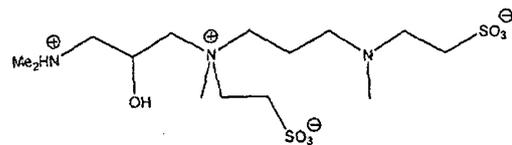
**80a**

Dibromuro de N,N,N',N'-Tetrametil-N-(4-dietilfosfonobutil)-etilendiamonio



**81**

Di-sal interna de 1-Bencil-1,1,5,9-tetrametil-3-hidroxi-5,9-bis-(2-sulfoetil)-1,5,9-triazanonano



**82**

Di-sal interna de 1,1,5,9-tetrametil-2-hidroxi-5,9-bis(2-sulfoetil)-1,5,9-triazanonano

Tabla 1 Reacciones y compuestos

Comp.	Procedimiento	Amina	Agente alquilante	Est. pK <sub>a</sub>	Fórmula química	Peso Molecular
1	4	Morfolina [110-91-8]	gmac	---	C <sub>10</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl	238,78
1a		1-HCl		-5,6	C <sub>10</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	275,22
2	4	Bis(2-metoxietil)amina [111-95-5]	gmac	---	C <sub>12</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Cl	283,83
2a		2-HCl		-5,9	C <sub>12</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	320,29
3	4	Dietanolamina [111-42-2]	gmac	---	C <sub>10</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Cl	258,78
3a		3-HCl		6,1	C <sub>10</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>	293,24
4	4	N-Metil(2-metoxietil)amina [38256-93-8]	gmac	---	C <sub>10</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl	240,78
4a		4-HCl		7,0	C <sub>10</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	277,24
5	4	N-Metiletanolamina [109-83-1]	gmac	---	C <sub>9</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl	226,75
5a		5-HCl		-7,1	C <sub>9</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	263,21
6	4	N-Etil-2-metoxietilamina [34322-82-2]	gmac	---	C <sub>11</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl	254,81
6a		6-HCl		7,3	C <sub>11</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	291,27
7	4	N-Etiletanolamina [110-73-6]	gmac	---	C <sub>10</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl	240,78
7a		7-HCl		-7,4	C <sub>10</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	277,24
8	4	Dimetilamina [124-40-3]	gmac	---	C <sub>8</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> OCl	196,73
8a		8-HCl		-7,9	C <sub>8</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> OCl <sub>2</sub>	233,19
8	5	N,N,N',N'-Tetrametil-2-hidroxi-1,3-diaminopropano [5886-51-9]	CH <sub>3</sub> Cl	---	C <sub>8</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> OCl	196,73
9	4	Piperidina [110-89-4]	gmac	---	C <sub>11</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> OCl	236,79
9a		9-HCl		-8,3	C <sub>11</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> OCl <sub>2</sub>	273,25
10	4	Dietilamina [109-89-7]	gmac	---	C <sub>10</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> OCl	224,78
10a		10-HCl		-88,5	C <sub>10</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> OCl <sub>2</sub>	261,24
11	4	Pirrolidina [123-75-1]	gmac	---	C <sub>10</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> OCl	222,76
11a		11-HCl		-88,7	C <sub>10</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> OCl <sub>2</sub>	259,22
12	10	Morfolina [110-91-8]	bptab	---	C <sub>10</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> OBr	267,22
12a		12-HBr		-5,8	C <sub>10</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> OBr <sub>2</sub>	348,13

(continuación)

13	10	Dietanolamina [111-42-2]	bptab	—	C <sub>10</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Br	285,23
13a		13-HBr		-6,3	C <sub>10</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>	366,14
14	10	N-Metiletanolamina [109-83-1]	bptab	—	C <sub>9</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> OBr	255,20
14a		14-HBr		-7,3	C <sub>9</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> OBr <sub>2</sub>	336,12
15	10	N-Etiletanolamina [110-73-6]	bptab	—	C <sub>10</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> OBr	269,23
15a		15-HBr		-87,6	C <sub>10</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> OBr <sub>2</sub>	350,14
16	10	Piperidina [110-88-4]	bptab	—	C <sub>11</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> Br	281,24
16a		16-HBr		-88,5	C <sub>11</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>	362,15
17	10	Dietilamina [109-89-7]	bptab	—	C <sub>10</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> Br	253,23
17a		17-HBr		-8,7	C <sub>10</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>	334,14
18	10	Pirrolidina [123-75-1]	bptab	—	C <sub>10</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> Br	251,21
18a		18-HBr		-8,9	C <sub>10</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>	332,13
19	4	Tris(hidroximetil)aminometano [77-86-1]	gmac	—	C <sub>10</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Cl	272,77
19a		19HCl		-6,8	C <sub>10</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	309,24
20	5	N,N'-Dimetil-N,N'-bis(2-hidroxietil)etilenediamina [14037-83-3]	CH <sub>3</sub> Cl	—	C <sub>9</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	271,20
20a		20HCl		-6,2	C <sub>9</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	352,12
21	5	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octano [280-57-6]	CH <sub>3</sub> Cl	—	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> Cl	150,66
21a		21HCl		-3,1	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	187,12
22	5	1,4-Dimetilpiperazina [106-58-1]	CH <sub>3</sub> Cl	—	C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> Cl	164,68
22a		22HCl		-4,3	C <sub>7</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	201,14
23	5	1,4-Dietilpiperazina [9483-50-7]	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> Br	—	C <sub>10</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> Br	164,68
23a		23HBr		-4,6	C <sub>10</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>	201,14
24	5	1-Metil-4-isopropilpiperazina [13480-33-6]	CH <sub>3</sub> Cl	—	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> Cl	164,68
24a		24HCl		-6,0	C <sub>9</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	201,14
25	5	1-Metil-4-ciclohexilpiperazina [7560-86-3]	CH <sub>3</sub> Cl	—	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> Cl	232,80
25a		25HCl		-6,2	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	269,26
26	5/8c <sup>a</sup>	4-(dimetilamino)-1-bencilpiperidina [94168-08-7] C <sub>3</sub> Br	(2 eq)	—	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> Br	237,19

(continuación)

26a	26HBr		-8,2	C <sub>9</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>	318,11
27	N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina [110-18-6]	CH <sub>3</sub> Cl	--	C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> Cl	166,70
27a	27HCl		-8,1	C <sub>7</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	203,16
27b	12 27 como la sal hidróxido		--	C <sub>7</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O	148,25
27c	13 27 como la sal hemicarbonato		--	C <sub>15</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	322,50
28	5 N,N,N',N'-Tetraetiletilendiamina [150-77-6]	CH <sub>3</sub> Cl	--	C <sub>11</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> Cl	222,81
28a	28HCl		-8,7	C <sub>11</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	259,27
29	5 N,N,N',N'-Tetrametil-1,3-diaminopropano [110-95-2]	CH <sub>3</sub> Cl	--	C <sub>8</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> Cl	180,73
29a	29HCl		-8,1	C <sub>8</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	217,19
29b	10 Dimetilamina [124-40-3]	bptab	--	C <sub>8</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> Br	225,18
29c	29bHBr		-8,1	C <sub>8</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>	306,09
29a	9 Cloruro de N-(3-Aminopropil)trimetilamonio [19223-69-6]	fo+fa (xs)	-8,1	C <sub>8</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	217,19
29d	12 29 como la sal hidróxido		--	C <sub>8</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O	162,28
29e	13 29 como la sal hemicarbonato		--	C <sub>17</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	350,56
30	5 N,N,N',N'-Tetraetil-1,3-diaminopropano [80558-96-5]	CH <sub>3</sub> Cl	--	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> Cl	238,94
30a	30HCl		-8,7	C <sub>12</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	273,30
31	5 N,N,N',N'-Tetrametil-1,4-diamino-2,3-dihidroxibutano [84808-89-6]	CH <sub>3</sub> Cl	--	C <sub>8</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl	271,20
31a	31HCl		-8,7	C <sub>9</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	352,12
32	5 N,N,N',N'-Tetrametil-1,4-diaminobutano [111-51-3]	CH <sub>3</sub> Cl	--	C <sub>9</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> Cl	239,20
32a	32HCl		-8,9	C <sub>9</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	320,12
33	5 N,N,N',N'-Tetrametil-1,6-diaminohexano [111-18-2]	CH <sub>3</sub> Cl	--	C <sub>11</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> Cl	267,26
33a	33HCl		-8,5	C <sub>11</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	348,17
34	5 N,N,N',N'-Tetraetil-1,6-hexanediamina [7136-51-8]	CH <sub>3</sub> Cl	--	C <sub>16</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> Cl	323,37
34a	34HCl		-10,1	C <sub>16</sub> H <sub>39</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	404,28
35	5 trans-1,2-bis(dimetilamino)ciclohexano [53152-69-5]	CH <sub>3</sub> Cl	--	C <sub>11</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> Cl	220,79
35a	35HCl		-3,8	C <sub>11</sub> H <sub>29</sub> N <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	257,25
36	5 1,4-Dimetilhomopiperazina [611134-91-6]	CH <sub>3</sub> Cl	--	C <sub>8</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> Cl	178,71



(continuación)

52	7b	N-(4-sulfobutil)metilamina [89282-74-9]	gmac	-8,0	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	282,40
53	7b/7c	N-(2-Hidroxietil)-N-(4-sulfobutil)amina [54960-64-4]	gmac	-7,1	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	312,43
54	6	N,N,N',N'-Tetrametilendiamina [110-18-9]	ps	-6,1	C <sub>8</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	238,35
55	6	N',N'-Dietil-N,N-dimetilendiamina [123-10-4]	ps	-6,7	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	266,41
56	6	N,N'-Dimetil-N,N'-bis(2-hidroxietil)-1,3-diaminopropano [10394-83-9]	ps	-7,3	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S	312,43
57	6	N,N,N',N'-Tetrametil-1,3-diaminopropano [110-95-2]	ps	-8,1	C <sub>10</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	252,38
58	6	N',N'-Dietil-N,N-dimetil-1,3-diaminopropano [62478-82-4]	ps	-8,7	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	280,43
59	8b/8c	N,N'-Dimetil-N,N'-bis(2-sulfoetil)-1,3-diaminopropano [185305-85-6]	brc	-6,5 8,0	C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	419,56
60	11b	79a	HCl <sup>b</sup>	-6,8 8,2	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> P	252,30
61	11b	80a	HCl <sup>b</sup>	-6,0 7,4	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> P	252,30
62	3	1-Metilpiperazina [109-01-3]	ps (2 eq)	-3,7	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	344,45
63	3	1-Metilhomopiperazina [4318-37-0]	ps (2 eq)	-5,6	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	358,48
64	3	N,N-Dimetil-N'-benciletilendiamina [103-55-9] ps (2 eq)	ps (2 eq)	-4,6	C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	422,57
65	3	N,N-Dimetil-N'-etilendiamina [204-646-0]	ps (2 eq)	-5,8	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	360,49
66	3	N,N,N'-Trimetilendiamina [142-25-6]	ps (2 eq)	-5,5	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	346,47
67	3	N,N,N'-Trimetil-1,3-diaminopropano [4543-98-8]	ps (2 eq)	-7,5	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	360,49
68	3	N,N,N'-Trimetilendiamina [142-25-6] bes	(2 eq)	-4,6	C <sub>9</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	318,41
69	3	N,N,N'-Trimetil-1,3-diaminopropano [4543-98-8]	bes (2 eq)	-6,6	C <sub>10</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	322,44
70	3	N,N,N'-Trimetilendiamina [142-25-6]	bs (2 eq)	-6,2	C <sub>13</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	374,52
71	3	N,N,N'-Trimetil-1,3-diaminopropano [4543-98-8]	bs (2 eq)	-8,2	C <sub>14</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	388,55
72	3	N,N,N'-Trimetilendiamina [142-25-6]	bp (2 eq)	-6,2	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	246,31
73	3	N,N,N'-Trimetil-1,3-diaminopropano [4543-98-8]	bp (2 eq)	-8,2	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	260,34
74	5b	4-(isopropilamino)Pipendina [534585-63-4]	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> Br	(3 eq)	--- C <sub>14</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> Br	307,33
74a		74HBr		-7,4	C <sub>14</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> Br <sub>2</sub>	388,24

(continuación)

75	2	Cloruro de N-(2-Aminoetil)trimetilamonio [339-67-5]	trmcfc	-11,9	C <sub>10</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	267,21
76	1	1,1,3,3-Tetrametilguanidina [90-70-6]	bptab	-12,9	C <sub>11</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> Br <sub>2</sub>	376,18
77	2	Cloruro de N-(2-Aminoetil)trimetilamonio [339-67-5]	odmic	-11,1	C <sub>10</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	267,21
78	4	Etanolamina [141-43-5]	gmac	---	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl	212,72
78a		78HCl		-7,8	C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	248,18
79a	11a	N,N,N',N'-Tetrametil-1,3-diaminopropano [110-85-2]	debpp	-8,1	C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PBr <sub>2</sub>	542,31
80a	11a	N,N,N',N'-Tetraetiltetrametilamina [150-77-8]	debpb	-6,1	C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PBr <sub>2</sub>	542,31
81	8b	Sal di-interna de N,N'-dimetil-N,N'-bis(2-sulfobetil)trimetilendiamina [185305-85-5]	brc	-6,1	C <sub>21</sub> H <sub>39</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> <sup>6</sup>	508,69
82	8c	81	H <sub>2</sub> /Pd	-6,5 8,0	C <sub>4</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> <sup>6</sup>	419,57

a) No se agregó ácido durante la reacción de hidrogenación (desbencilación)

b) Hidrólisis ácida del éster de fosfonato

c) Mezcla de diastereómeros.

gmac = Cloruro de N-(Glicidil)trimetilamonio [3033-77-0]

bptab = Bromuro de N-(3-Bromopropil)trimetilamonio [3779-42-8]

trmcfc = Cloruro de N,N,N',N'-tetrametilclorofornamidinio [13829-06-6]

odmic = Cloruro de 2-Cloro-1,3-dimetilimidazolino [37091-73-8]

fo+fa = formaldehído [50-00-0] y ácido fórmico [64-18-8]

CH<sub>3</sub>Cl = cloruro de metilo [74-87-3]

CH<sub>3</sub>Br = Bromuro de metilo [74-83-8]

C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>Br = Bromuro de etilo [74-96-4]

ps = ,3- propanosulfona [1120-71-4]

bs 1, 4- butanosulfona [1633-83-6]

bes = ácido 2-Bromoetanosulfónico, sal de sodio [4263-52-8]

chps = ácido 3-Cloro-2-hidroxipropanosulfónico, sal de sodio [143218-48-8]

bp = ácido 3- bromopropanoico [590-82-1]

debpp = 3-Bromopropanofosfonato de dietilo [1186-10-3]

debpb = 4-Bromobutanofosfonato de dietilo [2004-10-25]

brc = Cloruro de N-(3-Cloro-2-hidroxipropil)benzildimetilamonio ("reactivos e bencilo") [67304-25-0]

bpbtab = Bromuro de N-(3-Bromopropil)benzildimetilamonio [113222-03-6]

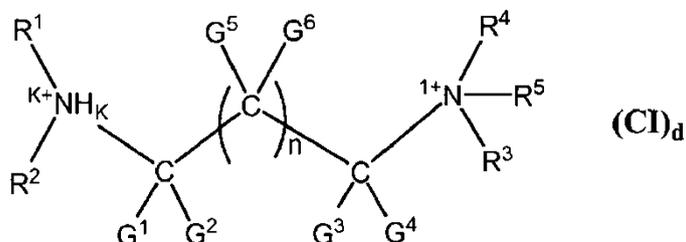
HCl = ácido clorhídrico [7647-01-0]

Todas las composiciones y los procesos divulgados y reivindicados en el presente documento pueden realizarlos y ejecutarlos los expertos en la técnica sin excesiva experimentación a la luz de la presente divulgación y basándose en los conocimientos de dichas personas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de tamponamiento de una composición química o biológica, que comprende la adición a la composición de una cantidad tampón efectiva de al menos un compuesto de amonio cuaternario-amina protonado o no protonado que tiene una fórmula general:

5



en la que:

n tiene valores enteros en el intervalo de 0 – 4,

10 k es 0 para el compuesto no protonado y k es 1 para el compuesto protonado;

cada G<sup>1</sup>, G<sup>3</sup> y G<sup>5</sup> es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, o es un componente de un resto químico cíclico,

cada G<sup>2</sup> y G<sup>4</sup> es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, y -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, o es un componente del resto químico cíclico.

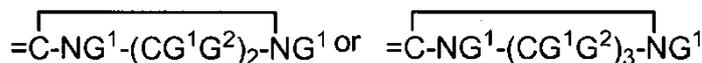
15 cada G<sup>6</sup> es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -OH, -OCH<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> y -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, o es un componente del resto químico cíclico, y

20 cada R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> es un resto químico seleccionado independientemente de -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -ciclohexilo, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-3</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-3</sub>N(CH<sub>3</sub>)C(O)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)NHCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> siendo m 0, 1, 2 o 3, o es un componente del resto químico cíclico, o R<sup>5</sup> es un resto químico -[CG<sup>7</sup>G<sup>8</sup>-(CG<sup>7</sup>G<sup>9</sup>)<sub>r</sub>-CG<sup>7</sup>G<sup>8</sup>-H<sub>j</sub>NR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>]<sup>+</sup>, en el que cada G<sup>7</sup> es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, cada G<sup>8</sup> es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, y -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, G<sup>9</sup> es un resto químico seleccionado independientemente de -H, -CH<sub>3</sub>, -CH, -OH, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -OH, -OCH<sub>3</sub>, -CO<sub>2</sub>H, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>, -CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, y -PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, r tiene valores enteros en el intervalo de 0 - 4, y j es 0 o 1, y cada R<sup>6</sup> y R<sup>7</sup> es un resto químico seleccionado independientemente de -CH<sub>3</sub>, -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -ciclohexilo, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-3</sub>NHC(O)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-3</sub>N(CH<sub>3</sub>)C(O)CH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)NHCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>C(O)N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>H, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>, -CH<sub>2</sub>(CG<sup>5</sup>G<sup>6</sup>)<sub>m</sub>PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub> siendo m 0, 1, 2 o 3;

25 en el que cuando el compuesto comprende el resto químico cíclico, el resto químico cíclico es uno o más seleccionados de (a), (b), (c), (d), (e), (f) y (g):

(a) uno o más pares de R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup>, R<sup>3</sup> y R<sup>5</sup>, y/o R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup>, forma un solo resto químico de tal manera que el par es individual e independientemente -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH(OH)CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N(C(O)G<sup>1</sup>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>C(O)N(G<sup>1</sup>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>CH(OH)CH(OH)CH<sub>2</sub>-, = C(NG<sup>1</sup>)<sub>2</sub>,

35



40

(b) uno o más pares de R<sup>1</sup> y R<sup>3</sup>, R<sup>1</sup> y R<sup>4</sup>, R<sup>1</sup> y R<sup>5</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>4</sup> y/o R<sup>2</sup> y R<sup>5</sup> forma un único resto químico de tal manera que el par es individual e independientemente -(CG<sup>1</sup>G<sup>2</sup>)<sub>g</sub>-, siendo n 0 o 1 y siendo g 2 o 3;

(c) uno o más pares de G<sup>1</sup> y G<sup>3</sup>, G<sup>2</sup> y G<sup>4</sup>, G<sup>1</sup> y G<sup>4</sup> y/o G<sup>2</sup> y G<sup>3</sup> forma un resto químico único de tal manera que el par es individual e independientemente -(CG<sup>1</sup>G<sup>6</sup>)<sub>q</sub>-, teniendo q valores enteros de 0-4 y la suma de q y n tiene valores enteros de 3-4, y, cuando q = 0, -(CG<sup>1</sup>G<sup>6</sup>)<sub>0</sub>- es un enlace sencillo carbono-carbono entre los átomos de carbono a los que el par está unido en la fórmula general;

(d) uno o más pares de  $G^1$  y  $G^2$ ,  $G^3$  y  $G^4$ , y/o  $G^5$  y  $G^6$  forma un único resto químico de tal manera que el par es individual e independientemente  $-(CG^1G^6)_w^-$ , teniendo w valores enteros de 4-5.

5 (e) uno o más pares de  $R^1$  y  $G^3$ ,  $R^1$  y  $G^4$ ,  $R^2$  y  $G^3$ ,  $R^2$  y  $G^4$ ,  $R^3$  y  $G^1$ ,  $R^3$  y  $G^2$ ,  $R^4$  y  $G^1$ ,  $R^4$  y  $G^2$ ,  $R^5$  y  $G^1$ , y/o  $R^5$  y  $G^2$  forma un resto químico único de tal manera que el par es individual e independientemente  $-(CG^1G^2)_s^-$  teniendo s valores enteros de 1 -3, teniendo n tiene valores enteros de 0-2 y la suma de s y n tiene valores enteros de 2-3;

10 (f) uno o más pares de  $R^1$  y  $G^5$ ,  $R^1$  y  $G^6$ ,  $R^2$  y  $G^5$ ,  $R^2$  y  $G^6$ ,  $R^3$  y  $G^5$ ,  $R^3$  y  $G^6$ ,  $R^4$  y  $G^5$ ,  $R^4$  y  $G^6$ ,  $R^5$  y  $G^5$ , y/o  $R^5$  y  $G^6$  forma un resto químico único de tal manera que el par es individual e independientemente  $-(CG^1G^2)_v^-$  teniendo v valores enteros 0 -3, teniendo n tiene valores enteros 1-4 y la suma de v y n tiene valores enteros de 3 - 4 y cuando  $v = 0$ ,  $-(CG^1G^2)_v^-$  es un enlace sencillo carbono-carbono entre los átomos de carbono a los que está unido el par en la fórmula general; y

(g) uno o más pares de  $R^1$  y  $G^1$ ,  $R^1$  y  $G^2$ ,  $R^2$  y  $G^1$ ,  $R^2$  y  $G^2$ ,  $R^3$  y  $G^3$ ,  $R^3$  y  $G^4$ ,  $R^4$  y  $G^3$ ,  $R^4$  y  $G^4$ ,  $R^5$  y  $G^3$ , y/o  $R^5$  y  $G^4$  forma un único resto químico de tal manera que el par es individual e independientemente  $-(CG^1G^2)_u^-$ , teniendo u valores enteros 3-4;

15 en el que **CI** es un contraión no interferente o mezcla de contraiones no interferentes, según sea necesario para mantener la electroneutralidad, con la carga en el compuesto de amonio cuaternario-amina que sea igual al valor de la cantidad  $(j + k - z + 1)$  en la que z es igual al valor absoluto de la suma numérica de todas las cargas negativas en cada resto de  $-CO_2^-$ ,  $-SO_3^-$ ,  $-PO_3H^-$ , and  $-PO_3^{2-}$  contenido en el  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^5$ ,  $R^6$ ,  $R^7$ ,  $G^2$ ,  $G^4$ ,  $G^6$ ,  $G^8$  y/o  $G^9$  presente y en la que d es igual a  $|j + k - z + 1|$  para los contraiones monovalentes,  $|j + k - z + 1| / 2$  para los contraiones divalentes,  $|j + k - z + 1| / 3$  para los contraiones trivalentes  $|j + k - z + 1| / 4$  para los contraiones tetravalentes y el signo de  $(z - j - k + 1)$  refleja la carga en el (los) contraión (es), a excepción de que cuando  $(j + k - z + 1)$  es cero, d sea cero y no esté presente un contraión independiente.

25 2. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, en el que **CI** es un anión no interferente o una mezcla de aniones no interferentes seleccionados de  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $OH^-$ ,  $F^-$ ,  $OCH_3^-$ ,  $HCO_2^-$ ,  $CH_3CO_2^-$ ,  $CF_3CO_2^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $ClO_4^-$ ,  $BF_4^-$ ,  $PF_6^-$ ,  $HSO_4^-$ ,  $HCO_3^-$ ,  $H_2PO_4^-$ ,  $CH_3OCO_2^-$ ,  $CH_3OSO_3^-$ ,  $CH_3SO_3^-$ ,  $CF_3SO_3^-$ ,  $H_2PO_3^-$ ,  $CH_3PO_3H^-$ ,  $HPO_3^{2-}$ ,  $CH_3PO_3^{2-}$ ,  $CO_3^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$  y  $PO_4^{3-}$ .

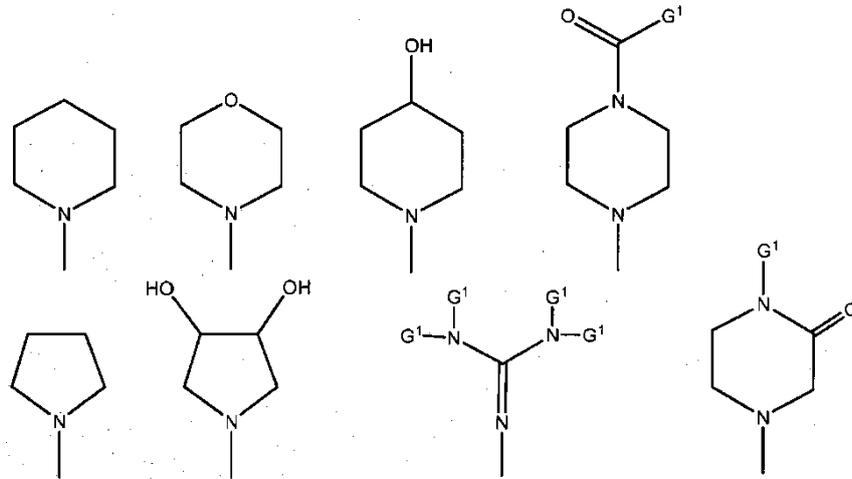
3. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, en el que **CI** es un catión no interferente o una mezcla de cationes no interferentes seleccionados de:  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $Ag^+$ ,  $Tl^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $VO^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Eu^{2+}$ ,  $UO_2^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Ga^{3+}$ ,  $Y^{3+}$ ,  $BiO^{3+}$ ,  $La^{3+}$ ,  $Ce^{3+}$ ,  $Pr^{3+}$ ,  $Nd^{3+}$ ,  $Sm^{3+}$ ,  $Eu^{3+}$ ,  $Gd^{3+}$ ,  $Tb^{3+}$ ,  $Dy^{3+}$ ,  $Ho^{3+}$ ,  $Er^{3+}$ ,  $Tm^{3+}$ ,  $Yb^{3+}$ ,  $Lu^{3+}$  y  $Th^{4+}$ .

30 4. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, en el que **CI** es un catión no interferente o una mezcla de cationes no interferentes seleccionados de: una alquil- o hidroxialquil-amina primaria protonada, una alquil- o hidroxialquil-amina secundaria protonada, una alquil- o hidroxialquil-amina terciaria protonada, una alquil-, alquilen-, hidroxialquil- o hidroxialquilen-diamina diprotonada, un compuesto de alquil- o hidroxialquil-amonio cuaternario, un compuesto de alquil- o hidroxialquil-sulfonio, un compuesto de alquil- o hidroxialquil-sulfoxonio, un compuesto de alquil- o hidroxialquil-fosfonio cuaternario y un compuesto alquil-, alquilen-, hidroxialquil- o hidroxialquilen-amonio dicuaternario, en el que el los grupos alquil-, alquilen-, hidroxialquil- e hidroxialquilen- anteriores contienen de uno a tres átomos de carbono, y en los que el catión o la mezcla de cationes no es un compuesto como se define en la reivindicación 1.

40 5. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, en el que el **CI** es un anión tampón no interferente, una mezcla de aniones tampón no interferentes, un catión tampón no interferente o una mezcla de cationes tampón no interferentes, con valores de  $pK_a$  en el intervalo de 2 - 12, y en el que **CI** no es un compuesto de amonio cuaternario-amina como se define en la reivindicación 1.

45 6. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, en el que el **CI** es un anión tampón no interferente, una mezcla de aniones tampón no interferentes, un catión tampón no interferente o una mezcla de cationes tampón no interferentes, con valores de  $pK_a$  en el intervalo de 1 - 13, y en el que **CI** es un compuesto de amonio cuaternario-amina como se define en la reivindicación 1 y tiene una carga que confiere electroneutralidad al compuesto.

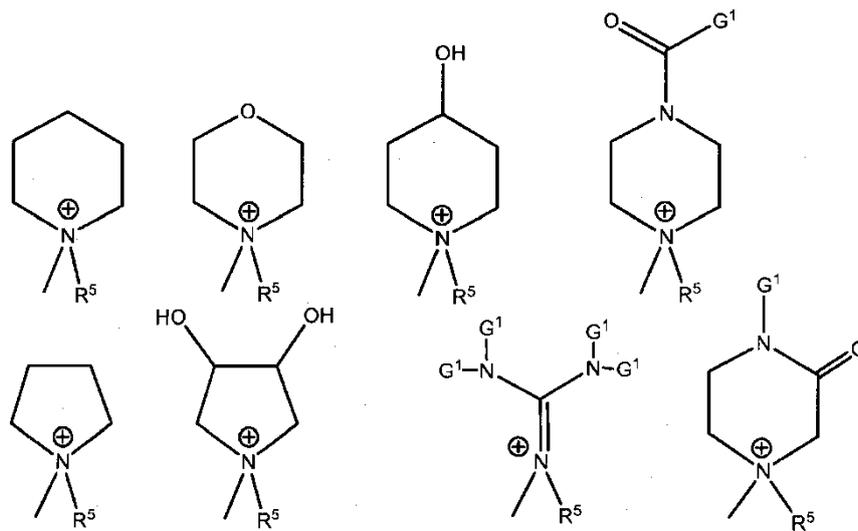
7. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, en el que el compuesto comprende el resto cíclico como se define en (a), en el que el resto cíclico tiene una de las siguientes estructuras:



en las que  $G^1$  y otros componentes del compuesto son como se definen en la reivindicación 1.

8. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, en el que el compuesto comprende el resto cíclico como se define en (a), en el que el resto cíclico tiene una de las siguientes estructuras:

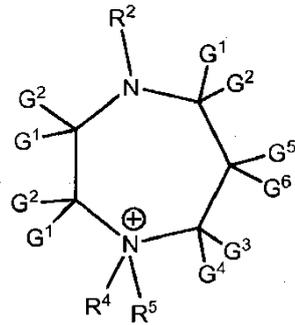
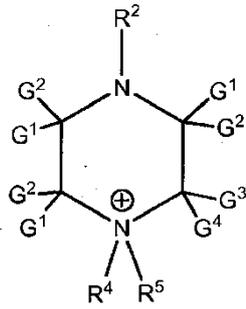
5



en las que  $G^1$  y otros componentes del compuesto son como se definen en la reivindicación 1.

9. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, en el que el compuesto comprende el resto cíclico como se define en (b), en el que el compuesto tiene una de las siguientes estructuras:

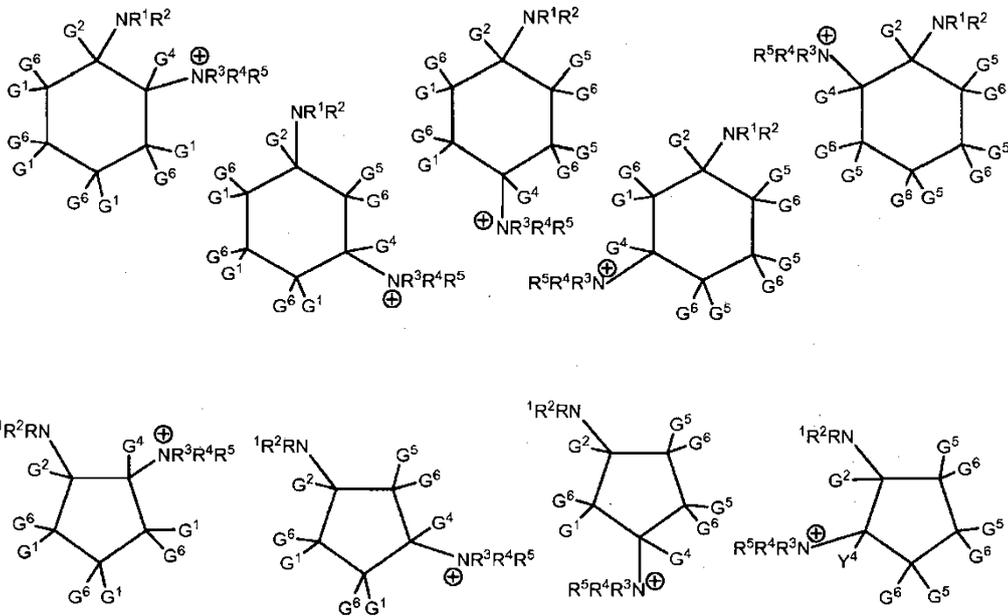
10



en las que cada uno de  $G^1$ ,  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$ ,  $G^5$ ,  $R^2$ ,  $R^4$  y  $R^5$  se definen independientemente como en la reivindicación 1.

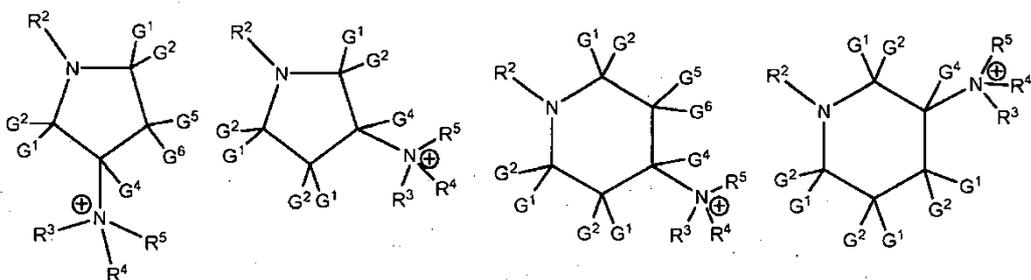
10. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, en el que el compuesto comprende el resto cíclico como se define en (c), en el que el compuesto tiene una de las siguientes estructuras:

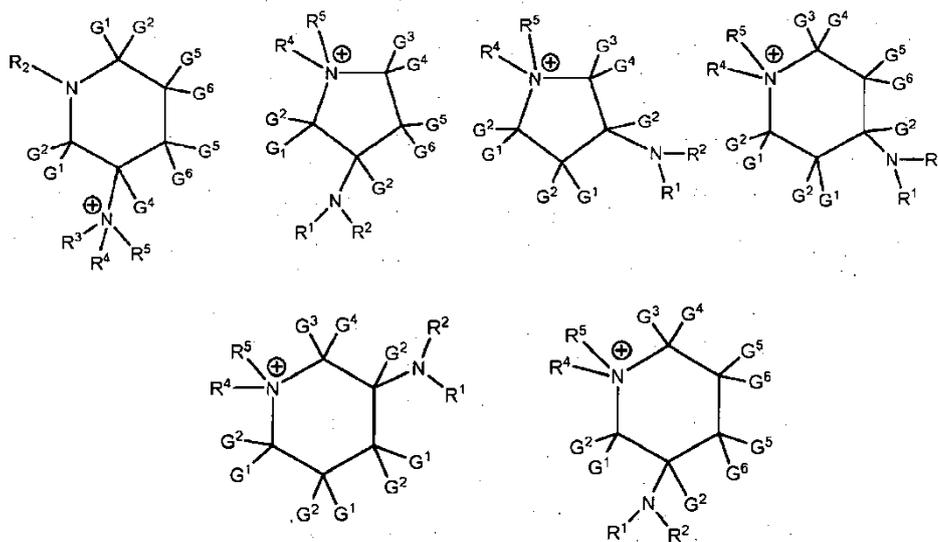
5



en las que cada uno de  $G^1$ ,  $G^1$ ,  $G^2$ ,  $G^3$ ,  $G^4$ ,  $G^5$ ,  $G^6$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  y  $R^5$  se definen independientemente como en la reivindicación 1.

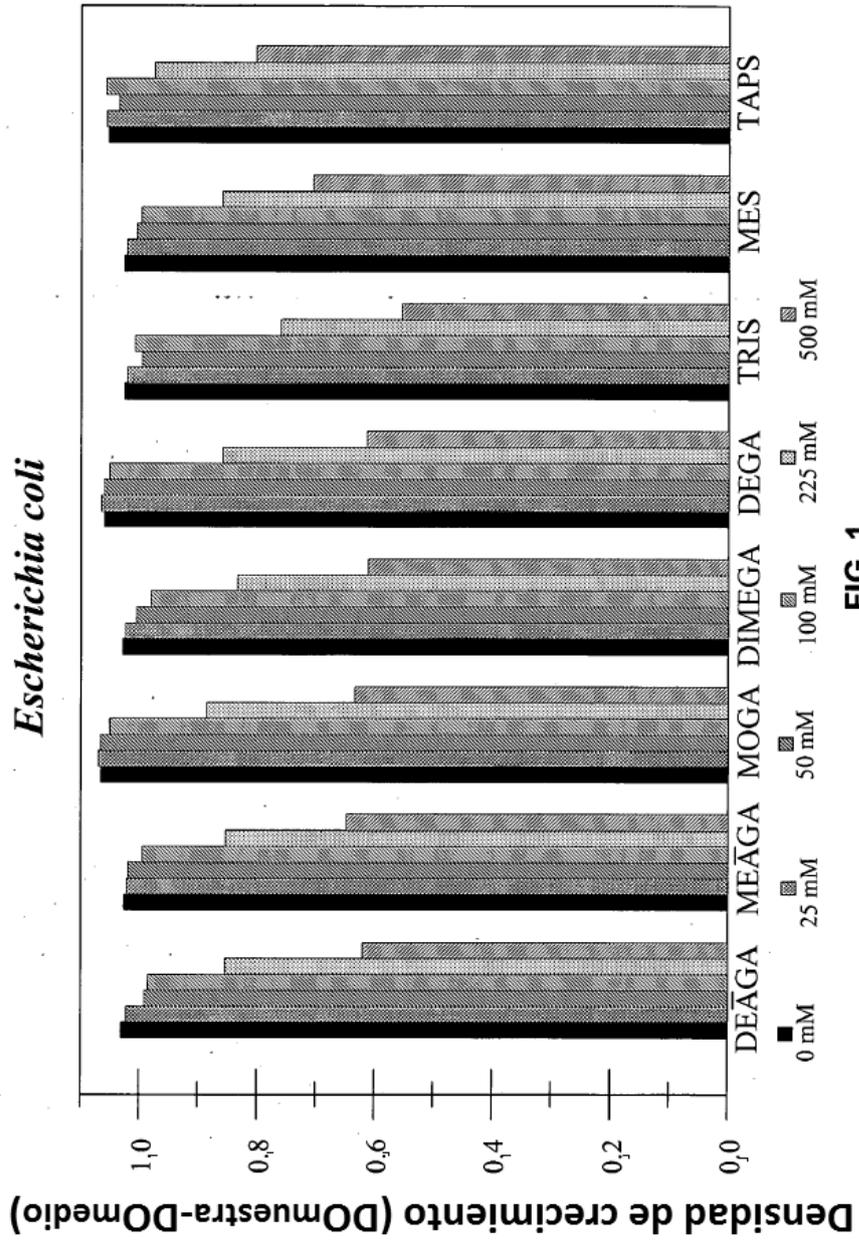
10 11. Un procedimiento como se define en la reivindicación 1, en el que el compuesto comprende el resto cíclico como se define en (e), en el que el compuesto tiene una de las siguientes estructuras:





en las que cada uno de G<sup>1</sup>, G<sup>1</sup>, G<sup>2</sup>, G<sup>3</sup>, G<sup>4</sup>, G<sup>5</sup>, G<sup>6</sup>, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> se definen independientemente como en la reivindicación 1.

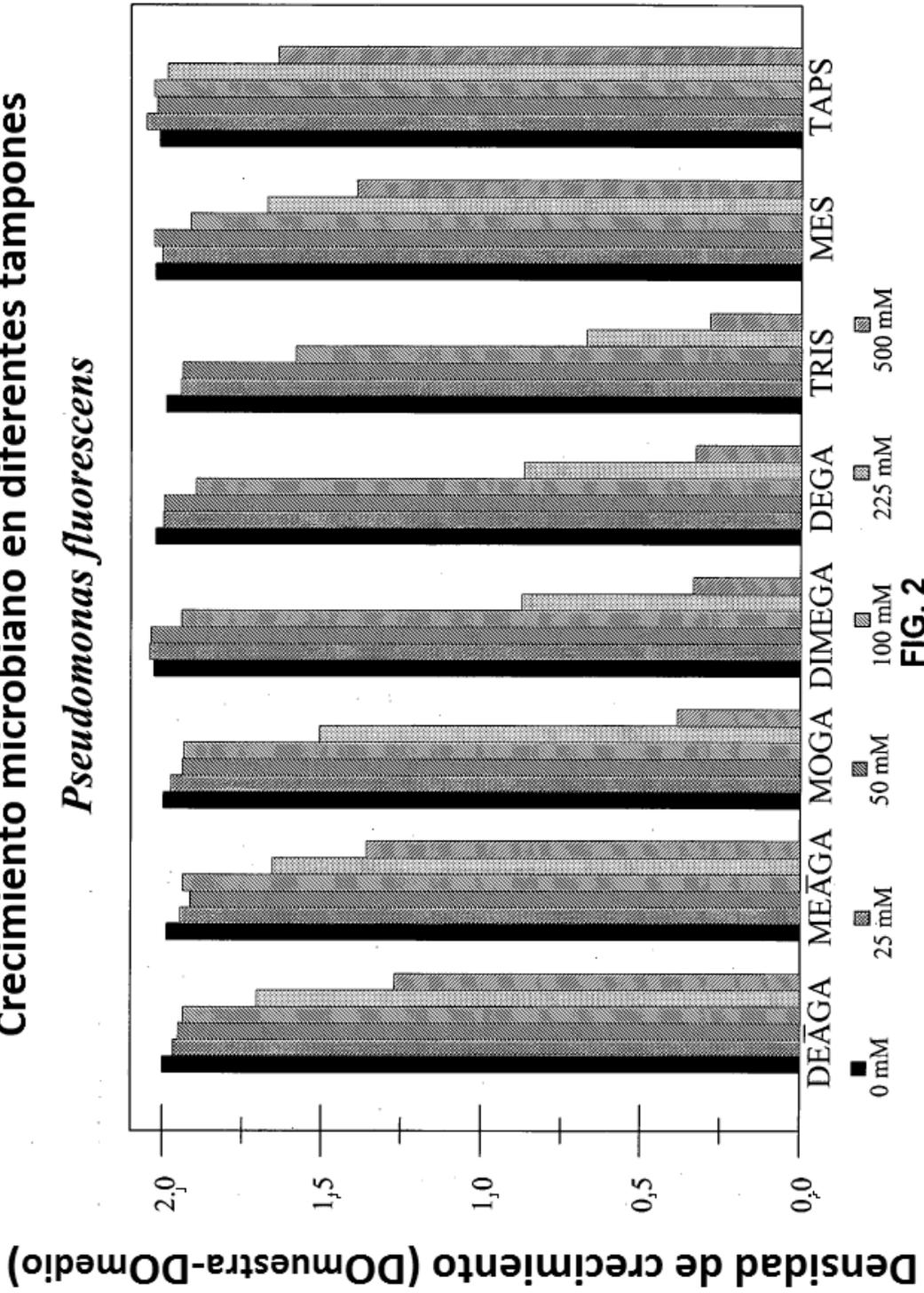
**Crecimiento microbiano en diferentes tampones**  
*Escherichia coli*



**FIG. 1**

Crecimiento microbiano en diferentes tampones

*Pseudomonas fluorescens*



Crecimiento microbiano en diferentes tampones

*Pichia pastoris*

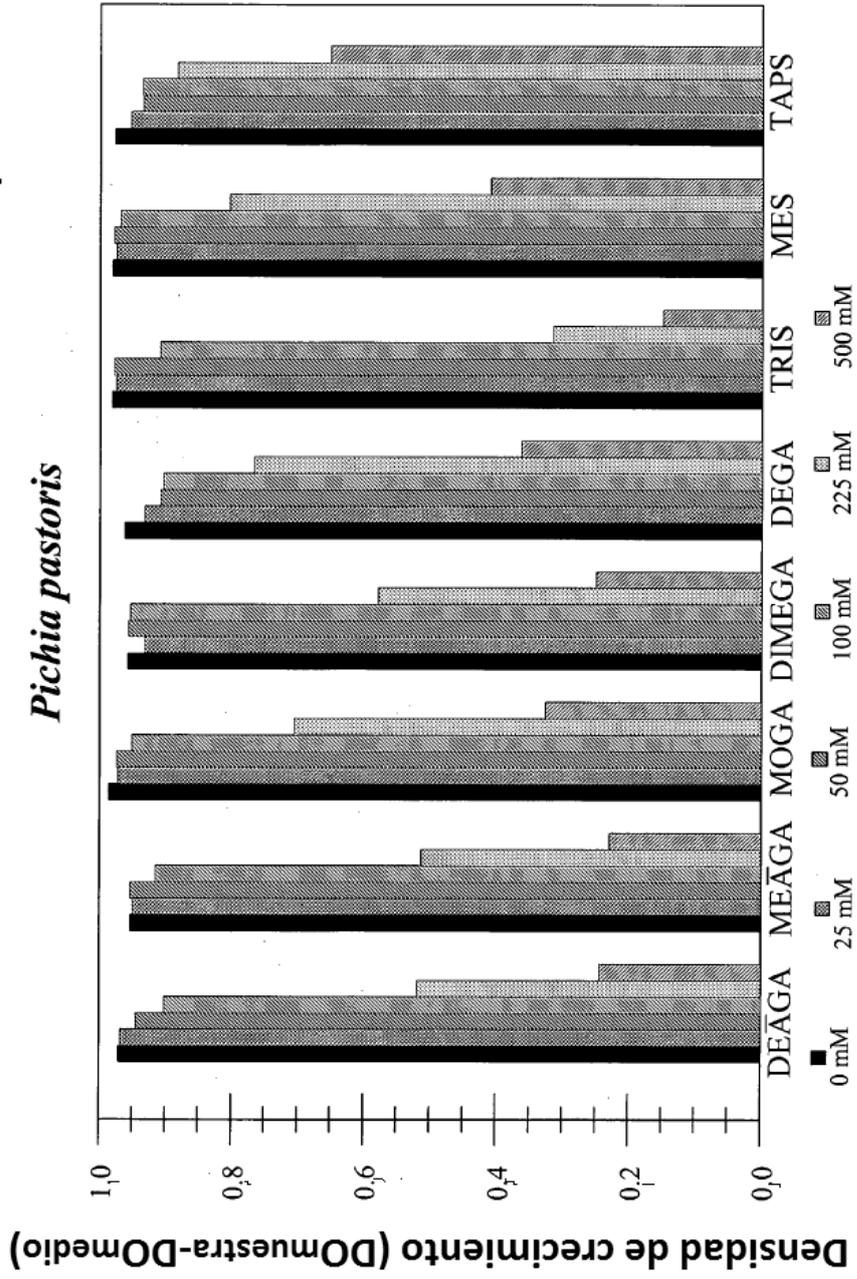


FIG. 3

**Crecimiento microbiano en diferentes tampones**  
*Saccharomyces cerevisiae*

