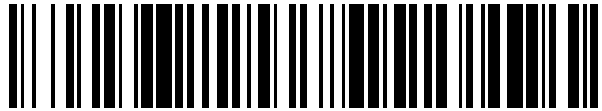


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 110**

51 Int. Cl.:

**C07H 7/033** (2006.01)  
**C07H 15/04** (2006.01)  
**A01N 25/30** (2006.01)  
**A01P 3/00** (2006.01)  
**A01P 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2016 PCT/FR2016/053290**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2017 WO17098174**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2016 E 16825461 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3387000**

54 Título: **Procedimiento de obtención de composiciones surfactantes a base de L-guluronamidas de alquilo**

30 Prioridad:

**11.12.2015 FR 1562228**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.04.2020**

73 Titular/es:

**ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE DE CHIMIE  
(100.0%)  
11 allée de Beaulieu  
35000 Rennes, FR**

72 Inventor/es:

**BENVEGNU, THIERRY;  
SARI-CHMAYSSEM, NOUHA;  
TAHA, SAMIR y  
MAWLAWI, HIBA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 755 110 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 obtención de composiciones surfactantes a base de L-guluronamidas de alquilo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento directo para obtener composiciones surfactantes que comprenden L-guluronamidas de alquilo o mezclas de L-guluronamidas y D-mannuronamidas de alquilo a partir de unas materias primas de fuente biológica (alginatos, oligoalginatos, poli(oligo)guluronatos, algas marrones) o biocompatibles/biodegradables.

La presente invención tiene aplicaciones, por ejemplo, en surfactantes, en particular para cosmetología, el campo fitosanitario, agroalimentario y de detergentes (industriales).

15 En la descripción mostrada a continuación, las referencias entre corchetes ([ ]) remiten a la lista de referencias presentadas al final del texto.

**Estado de la técnica**

20 Los surfactantes a base de carbohidratos representan una clase importante de compuestos anfífilos cuyo creciente interés puede explicarse por factores funcionales, económicos y ambientales. (Hill et Lehen- Ferrenbach, 2009) [1]. Los derivados amidados de azúcares caracterizados por la presencia de una función amida que une la cabeza del azúcar hidrófilo a la cadena lipófila que presenta la ventaja de ser resistentes frente a la hidrólisis en un medio neutro y alcalino, principalmente en comparación con los derivados éster (Laurent et al., 2011) [2]. Si unos trabajos han demostrado la posibilidad de acceder a unos derivados amidados a partir de ácidos urónicos como el ácido glucurónico y el ácido galacturónico derivados de la hidrólisis de hemicelulosas o pectinas (Laurent et al., 2011, citado anteriormente) [2], existen pocos estudios que permiten valorar unos polisacáridos de origen algal. Un solo ejemplo de surfactante amida se deriva de la transformación de oligómeros del ácido D-mannurónico procedente de la despolimerización de alginatos. Por otra parte, la preparación de composiciones surfactantes en forma de amida a base de ácido L-gulurónico o mezclas de ácido L-gulurónico y ácido D-mannurónico y que permiten la valorización de todos los sacáridos presentes en el biopolímero no se ha desarrollado hasta la fecha.

Existen tres clases distintas de surfactantes a base de sacáridos: ésteres (ésteres de sorbitán, ésteres de sacarosa), acetales (alquil poliglucósidos) y amidados (alquilo glucamidas). Industrialmente, las alquilo sucroamidas se producen en dos etapas: aminación reductora de un hidrato de carbono con una alquilamina, seguida de la acilación del *W*-glicósido resultante (Solicitud Internacional WO 9206984; Solicitud Internacional WO 9303004; Patente US 7.655.611; Patente US 5.872.111) [3-6]. Del mismo modo, las gluconamidas se obtienen en dos etapas: oxidación de un hidrato de carbono que conduce a una lactona o ácido aldónico seguida de una reacción con unas alquilaminas para formar unas gluconamidas (Patente US 2.670.345) [7]. Más recientemente, se han desarrollado derivados que contienen un enlace amida entre las partes hidrofílica y lipófila a través de un enlace *W*-glicósido (Patente US 7.655.611, citada anteriormente) [5]. Otra estrategia se basó en la formación de surfactantes de *W*-alquilamida a partir de ácidos urónicos como el ácido glucurónico y el ácido galacturónico a partir de la hidrólisis de hemicelulosas o pectinas. (Laurent et al., 2011, citado anteriormente) [2]. Todos estos procedimientos de síntesis de surfactantes utilizan monosacáridos como materia prima y las condiciones de síntesis generalmente no son muy respetuosas con el medio ambiente (reactivos tóxicos y no biodegradables).

Los surfactantes de manuronamidas se han producido a partir de oligómeros de ácido D-mannurónico (Benvegna et Sassi, Topics in Current Chemistry, 294: 143-164, 2010; Solicitud internacional WO 03/104248) [8, 9]. El procedimiento se basa en la producción de oligomannuronatos saturados (despolimerización ácida) que luego se transforman en un monosacárido intermedio que consiste en dos cadenas butilo. Este sintetizador se somete entonces a una reacción de aminólisis utilizando una amina grasa en un solvente como el metanol o el isopropanol en presencia o ausencia de una base orgánica. El derivado *W*-acilado obtenido de este modo presenta propiedades emulsionantes. Sin embargo, hasta la fecha no se ha valorizado la utilización de poli(oli-go)meros a base de ácido L-gulurónico procedentes de la despolimerización de alginatos (Solicitud Internacional WO 03/099870) [10] o incluso del alginato entero.

Por lo tanto, existe una necesidad real de un nuevo procedimiento de síntesis de compuestos y composiciones que subsanará los defectos, desventajas y obstáculos del estado anterior de la técnica, en particular un procedimiento que permita controlar la producción a escala industrial, reducir costes y mejorar las propiedades deseadas de los compuestos y composiciones, especialmente en el campo de los surfactantes, y que cumpla con el principio de la «química azul».

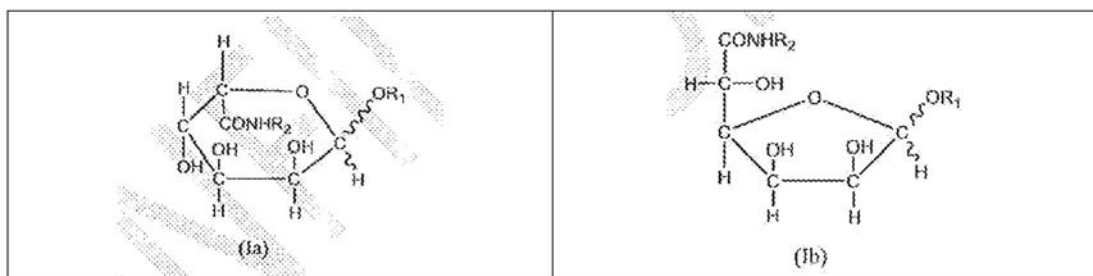
**Descripción de la invención**

Los inventores han desarrollado un nuevo procedimiento sin disolventes que utiliza reactivos biocompatibles/biodegradables para acceder simplemente a unas composiciones surfactantes basadas en L-guluronamida o mezclas de L-guluronamidas y D-mannuronamidas directamente (procedimiento «one-pot») a partir de poli(oligo)guluronatos, alginatos bacterianos, alginatos refinados y semirrefinados (mezcla de alginato, celulosa, hemicelulosa y fucano) o algas marrones, evitando de este modo una etapa previa de despolimerización. Los poli(oligo)guluronatos provienen de la despolimerización de alginatos, por ejemplo, según el procedimiento descrito en la solicitud internacional WO 03/099870 [10]. Los alginatos (semirrefinados, refinados) y los oligoalginatos se obtienen mediante tratamientos sencillos en medios acuosos ácidos, a partir de algas frescas o secas, por ejemplo, obtenidas según el protocolo descrito en el ejemplo 2 a continuación, según el procedimiento de la solicitud internacional WO 98/40511 [12].

Los alginatos bacterianos se obtienen, por ejemplo, a partir del cultivo de bacterias mucoides (por ejemplo, la solicitud internacional WO 2009/134368) [11]

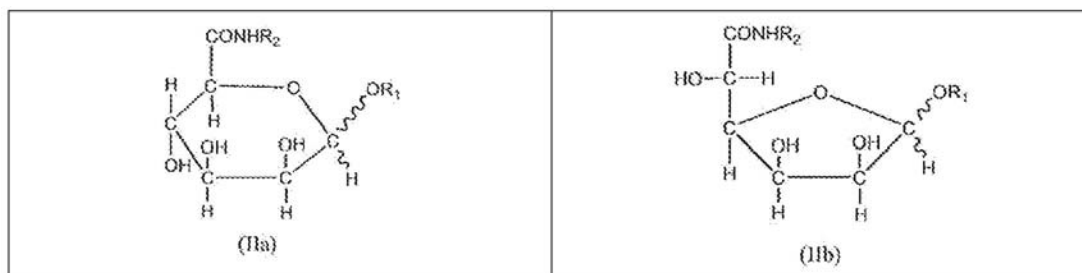
La presente invención tiene por lo tanto como objetivo un procedimiento de obtención de una composición que comprende:

(i) unas L-guluronamidas de alquilo de las fórmulas (Ia) y (Ib):



o

(ii) una mezcla de L-guluronamidas de alquilo de las fórmulas (Ia) y (Ib) y de D-mannuronamidas de alquilo de las fórmulas (IIa) y (IIb):



en el que

- R<sub>1</sub> es una cadena alquilo de 2 a 22, preferentemente de 2 a 8, preferiblemente de 2 a 4, átomos de carbono, lineal o ramificada, saturada o insaturada;
- R<sub>2</sub> es un átomo de hidrógeno, una cadena alquilo de 2 a 22, preferentemente de 8 a 18, preferiblemente de 12 a 18, átomos de carbono, lineal o ramificada, saturada o insaturada que puede presentar una función amino terminal;

y caracterizado porque dicho procedimiento comprende:

- a) una etapa de reacción de butanolisis y de glicosilación de Fischer a partir de poli(oligo)guluronatos, de alginatos, de oligoalginatos y/o de algas marrones;
- b) una etapa de reacción de aminólisis en el medio de reacción resultante de la etapa a), en presencia de una amina de fórmula R'NH<sub>2</sub> en la que R' está compuesto por 2 a 22, preferentemente de 8 a 18, preferiblemente de 12 a 18, átomos de carbono, lineal o ramificada, saturada o insaturada.

Conforme a la presente invención, por «poli(oligo)guluronatos» se entiende bloques homopoliméricos de ácido α-L-

gulurónico en parte en forma de sales de sodio resultantes de la despolimerización de alginatos, por ejemplo según el procedimiento de la Solicitud Internacional WO 03/099870 [10].

Conforme a la presente invención, por «oligoalginatos» se entiende los productos resultantes de un tratamiento por vía enzimática y/o ácido de alginato, por ejemplo, obtenidos según el protocolo descrito en el Ejemplo 2 a continuación, según el procedimiento de la Solicitud Internacional WO 98/40511 [12].

Conforme a la presente invención, por «alginatos» se entiende unos alginatos refinados y/o semi-refinados, obtenidos por ejemplo según el protocolo descrito en el Ejemplo 2 a continuación. Se entiende también los alginatos bacterianos obtenidos por ejemplo, a partir del cultivo de bacterias mucoides (por ejemplo, la solicitud internacional WO 2009/134368) [11].

Conforme a la presente invención, por «algas marrones» se entiende las algas denominadas *Phaeophyceae* o *Phéophycées* de los cuales existen 1500 especies (por ejemplo *Ascophyllum nodosum*, *Fucus serratus*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Ecklonia maxima*, *Macrocystis pyrifera*, *Sargassum vulgare*, etc.), y cuyas paredes están esencialmente compuestas por fucanos sulfatados y de alginato.

Según un modo de realización particular de la presente invención, dicho procedimiento comprende, antes de la etapa (a), las etapas de preparación de alginatos (semi-)refinados, oligoalginatos y poli (oligo)guluronatos. Los poli(oligo)guluronatos provienen de la despolimerización de alginatos. Los alginatos semirrefinados proceden de la lixiviación ácida de las algas marrones, seguida de la solubilización de los alginatos de sodio mediante el aumento del pH y la separación sólido-líquido para eliminar los residuos de algas. Los alginatos refinados proceden de una etapa adicional de despigmentación por formol y una etapa de purificación. Los oligoalginatos proceden del tratamiento por vía enzimática y/o ácido de la solución de alginato. Los alginatos bacterianos se obtienen, por ejemplo, a partir del cultivo de bacterias mucoides (por ejemplo, la solicitud internacional WO 2009/134368) [11].

Según un modo de realización particular de la presente invención, dicho procedimiento también puede comprender una etapa a') de neutralización del medio de reacción que resulta de la etapa a), y realizada antes de la etapa b), conduciendo a una composición final que incluye una cantidad variable de una sal de amina grasa residual. Por ejemplo, la etapa de neutralización se realiza en presencia de sosa 1M, hasta un pH de 7.

Según un modo de realización particular de la presente invención, la etapa de butanolisis y de glicosilación de Fischer a) se realiza en presencia de (i) agua y/o de un disolvente iónico y/o un disolvente eutéctico, (ii) un alcohol ROH lineal o ramificado, saturado o insaturado, que presenta de 1 a 4 átomos de carbono, preferiblemente *n*-butanol, y (iii) un catalizador ácido como por ejemplo el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico, un ácido alquilo sulfónico como el decilo o el laurilo sulfónico, un ácido sulfónico como el ácido bencenosulfónico, el ácido paratolueno sulfónico, el ácido camfosulfónico, un ácido alquilosulfónico como el ácido metilsulfónico, el ácido decilsulfónico, el ácido laurilsulfónico, el ácido sulfosuccínico o un sulfosuccinato de alquilo como sulfosuccinato de decilo o sulfosuccinato de laurilo, los ácidos perhalohídricos, como ácido perclórico, unos metales como el hierro, sus óxidos o sus sales, como sus haluros. Preferentemente, se trata de ácido alquilsulfónico o de ácido metanosulfónico

Conforme a la presente invención, por «disolvente iónico» se entiende, por ejemplo, el cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio [BMIM]Cl, el bromuro de 1-butil-3-metilimidazolio [BMIM]Br, el metilsulfato de tris-(2-hidroxietil)metilamonio (HEMA) y el acetato de 1-etil-3-metilimidazolio [EMIM] AcO; dicho disolvente iónico típicamente comprende hasta un 10 % de agua.

Conforme a la presente invención, por «disolvente eutéctico» se entiende unos sistemas formados por una mezcla eutéctica de bases o ácidos de Lewis o Bronsted que pueden contener una variedad de especies aniónicas y/o especies catiónicas. Los disolventes eutécticos de primera generación se basaban en mezclas de sales de amonio cuaternario con unos donantes de enlaces de hidrógeno, como las aminas y los ácidos carboxílicos (por ejemplo, sal de amonio cuaternario y (hidrato de) cloruro metálico.

Esta etapa (a) se realiza, por ejemplo, confrontando un equivalente de poli(oligo)guluronatos con un grado de polimerización de entre 2 y 100, preferiblemente aproximadamente 35, resultante de la despolimerización ácida (solicitud internacional WO 03/099870) [10] de alginatos extraídos de las especies *Ascophyllum*, *Durvillaea*, *Ecklonia*, *Laminaria*, *Lessonia*, *Macrocystis*, *Sargassum* y *Turbinaria*, y preferiblemente alginatos ricos en ácido L-gulurónico; de 10 a 1000 equivalentes molares de agua; se introducen de 2 a 300 equivalentes molares de alcohol, como el *n*-butanol, y preferiblemente 150 equivalentes molares; de  $10^{-3}$  a 10 equivalentes molares de un catalizador ácido, como el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico, un ácido alquilo sulfónico como el ácido decilo o laurilo sulfónico, un ácido sulfónico como el ácido bencenosulfónico, el ácido paratolueno sulfónico, el ácido camfosulfónico, un ácido alquilosulfónico como el ácido metilsulfónico, el ácido decilsulfónico, el ácido laurilsulfónico, el ácido sulfosuccínico o un sulfosuccinato de alquilo como sulfosuccinato de decilo o sulfosuccinato de laurilo, los ácidos perhalohídricos, como ácido perclórico,

unos metales como el hierro, sus óxidos o sus sales, como sus haluros, y preferentemente de 1,1 a 10 equivalentes molares de ácido alquilsulfónico, y preferentemente 2,1 equivalentes molares de ácido metilsulfónico.

Entonces, la reacción se lleva a cabo con reflujo azeotrópico a presión atmosférica (ensamblaje Dean Stark), entre 5 130 y 135 °C en el caso del butanol, preferiblemente durante 12 horas. La composición formada de este modo está constituida mayoritariamente por compuestos de dos cadenas procedentes del alcohol (preferiblemente butanol) derivado del ácido L-gulurónico.

La preparación de L-guluronamidas de alquilo, en la que la cadena alquilo deriva de una amina grasa, es seguida por 10 la etapa b) de aminólisis, después de la reducción de la temperatura (preferiblemente hasta 60 °C), añadiendo de 1 a 25 equivalentes molares de una amina de fórmula R'NH<sub>2</sub>, lineal o ramificada, saturada o insaturada, en la que R' está compuesto por 5 a 22 átomos de carbono, y preferiblemente se añaden 3 equivalentes molares.

La reacción se lleva a cabo a una temperatura de 65-70 °C preferiblemente y bajo presión reducida para el reciclado 15 del alcohol mencionado anteriormente.

La composición formada de este modo constituye un producto habitual derivado del ácido L-gulurónico como emulsionantes.

20 Las sales y azúcares que no han reaccionado se pueden eliminar de esta composición mediante la recuperación en un disolvente orgánico, preferiblemente éter dietílico, y luego filtrarse y enjuagarse varias veces con el disolvente orgánico. El filtrado que contiene L-guluronamidas de alquilo se concentra para dar una composición enriquecida con productos de interés que también constituye un producto habitual, como un agente emulsionante que presenta unas propiedades antibacterianas y antifúngicas a las concentraciones utilizadas para la formación de las emulsiones.

25 Esta etapa (a) del procedimiento de la invención se realiza, por ejemplo, confrontando un equivalente de alginato como los alginatos extraídos de las especies *Ascophyllum*, *Durvillaea*, *Ecklonia*, *Laminaria*, *Lessonia*, *Macrocystis*, *Sargassum* y *Turbinaria*, los oligoalginatos obtenidos por despolimerización, y preferiblemente alginatos ricos en ácido L-gulurónico; de 10 a 1000 equivalentes molares de agua; se introducen de 2 a 300 equivalentes molares de alcohol, 30 como el n-butanol, y preferiblemente 150 equivalentes molares; de 10<sup>-3</sup> a 10 equivalentes molares de un catalizador ácido, como el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico, un ácido alquilo sulfúrico como el ácido decilo o laurilo sulfúrico, un ácido sulfónico como el ácido bencenosulfónico, el ácido paratolueno sulfónico, el ácido camfosulfónico, un ácido alquilsulfónico como el ácido metilsulfónico (o metanosulfónico), el ácido decilsulfónico, el ácido laurilsulfónico, el ácido sulfosuccínico o un sulfosuccinato de alquilo como sulfosuccinato de decilo o sulfosuccinato de laurilo, los ácidos 35 perhalohídricos, como ácido perclórico, unos metales como el hierro, sus óxidos o sus sales, como sus haluros, y preferentemente de 1,1 a 10 equivalentes molares de ácido alquilsulfónico, y preferentemente 2,5 equivalentes molares de ácido metilsulfónico.

Entonces, la reacción se lleva a cabo con reflujo azeotrópico a presión atmosférica (ensamblaje Dean Stark), entre 40 130 y 135 °C en el caso del butanol, preferiblemente durante 24 horas.

La composición formada de este modo está constituida mayoritariamente por compuestos de dos cadenas procedentes del alcohol (preferiblemente butanol) derivado del ácido L-gulurónico y de ácido D-mannurónico.

45 La preparación de L-guluronamidas de alquilo y de D-mannuronamidas de alquilo en la que la cadena alquilo deriva de una amina grasa, es seguida por la etapa b) de aminólisis, después de la reducción de la temperatura (preferiblemente hasta 60 °C), según dos posibles protocolos:

1) La reacción de aminólisis se realiza sin neutralización previa del medio: en presencia de 1 a 25 equivalentes 50 molares de una amina de fórmula R'NH<sub>2</sub>, lineal o ramificada, saturada o insaturada, en la que R' está compuesto por 2 a 22 átomos de carbono, y preferiblemente de 3 equivalentes molares. Por ejemplo, la amina grasa se selecciona de entre el grupo formado por dodecilamina y amina oleica. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de 65-70 °C preferiblemente y bajo presión reducida para el reciclado del alcohol mencionado anteriormente. La composición formada de este modo constituye un producto habitual derivado del ácido L-gulurónico y del ácido D-mannurónico como emulsionantes. Las sales y azúcares que no han reaccionado se 55 pueden eliminar de esta composición mediante la recuperación en un disolvente orgánico, preferiblemente éter dietílico, y luego filtrarse y enjuagarse varias veces con el disolvente orgánico. El filtrado que contiene L-guluronamidas de alquilo y D-mannuronamidas de alquilo se concentra para dar una composición enriquecida con productos de interés que también constituye un producto habitual, como un agente emulsionante que presenta 60 unas propiedades antibacterianas y antifúngicas a las concentraciones utilizadas para la formación de las emulsiones.

2) La reacción de aminólisis se realiza después de la neutralización previa del medio: añadiendo una solución de

NaOH 1N hasta un pH cercano a 7. Después, el medio se concentra 6 veces bajo presión reducida sin llevarlo a secarse. Después de 1 a 10 equivalentes molares de una amina de fórmula R'NH<sub>2</sub>, lineal o ramificada, saturada o insaturada, en la que R' está compuesto por 5 a 22 átomos de carbono, y preferiblemente de 1 equivalente molar. Por ejemplo, la amina grasa se selecciona de entre el grupo formado por dodecilamina y amina oleica. La reacción se lleva a cabo a una temperatura de 65-70 °C preferiblemente y bajo presión reducida para el reciclado del alcohol mencionado anteriormente. A continuación, se añaden al medio entre 100 y 1000 equivalentes molares de agua, preferiblemente 500 equivalentes. La mezcla se agita durante aproximadamente 15 minutos a 65-70 °C. Después de parar la agitación, el medio se deja aproximadamente 10 minutos a la misma temperatura de modo que los productos orgánicos floquen. Después de bajar la temperatura a la temperatura ambiente, la fase orgánica se solidifica y entonces es fácil eliminar el agua cargada de las sales.

Las composiciones formadas de este modo por el procedimiento de invención constituyen unos productos habituales derivados del ácido L-gulurónico y el ácido D-mannurónico como agentes emulsionantes que presentan unas propiedades antibacterianas y antifúngicas en las concentraciones utilizadas para la formación de las emulsiones.

La presente invención tiene también como objetivo una composición obtenida por el procedimiento según la invención. Las composiciones de la invención están compuestas de derivados del ácido L-gulurónico o de los dos ácidos urónicos (ácido L-gulurónico y ácido D-mannurónico) derivados del mismo polisacárido. Además, los derivados del ácido L-gulurónico y ácido D-mannurónico que constituyen las composiciones de la invención están en forma a la vez de piranosidos (anillo de 6 eslabones) y de furanosidos (anillos de 5 eslabones). Dependiendo de la longitud de la cadena y la naturaleza de las cadenas alquilo, las composiciones de la invención serán consideradas como agentes emulsionantes para emulsiones de agua en aceite (W/O) o aceite en agua (O/W). Además, podrán presentar unas propiedades antibacterianas y antifúngicas.

La presente invención tiene por lo tanto como objetivo la utilización de una composición según la invención como surfactante. Preferentemente, dicho surfactante se selecciona de entre el grupo que consiste en agentes solubilizantes, hidrotropos, agentes humectantes, espumantes, emulsificantes, emulsionantes y/o detergentes.

La presente invención tiene también como objetivo una composición según la invención para una utilización como agente antibacteriano y/o antifúngico.

La presente invención tiene también como objetivo un surfactante que comprende una composición según la invención. Dicho surfactante puede presentar las siguientes propiedades:

Número de átomos de carbono de la cadena lipófila (alquilo R2):	Surfactante con dos cadenas lipófilas: D-mannuronamidos de alquilo y/o L-guluronamidas de alquilo
Entre 1 y 6	Agentes hidrotropos y/o solubilizantes
Entre 6 y 14	Agentes emulsionantes aceite en agua (O/W) y/o agua en aceite (W/O)
Entre 16 y 22	Agentes emulsionantes agua en aceite (W/O)

La presente invención tiene también como objetivo un antibiótico y/o antibacteriano que comprende una composición según la invención.

El procedimiento de la invención conduce a unas composiciones surfactantes originales utilizando únicamente materias primas de fuente biológica (poli(oligo)guluronatos, alginatos, oligoalginatos, algas marrones) o biocompatibles/biodegradables:

- mediante la aplicación de una metodología que permite transformar el ácido L-gulurónico que proviene de poli(oligo)guluronatos o a la vez el ácido L-gulurónico y el ácido D-mannurónico, es decir, los dos azúcares urónicos que constituyen los alginatos, para llevar unas composiciones surfactantes compuestas exclusivamente de ácido L-gulurónico o de los dos sacáridos (el ácido L-gulurónico y el ácido D-mannurónico);
- utilizando unas condiciones que permitan liberarse de la etapa previa de despolimerización del alginato y, por lo tanto, utilizarlo directamente;
- proponiendo unas condiciones que cumplen los principios de la química azul, reacciones sin disolventes orgánicos que no sean los alcoholes/aminas reactivos, que no produzcan residuos (reciclado de alcoholes de cadena corta (n-butanol, etc.)) y utilizando unos reactivos biodegradables (ácido metano sulfónico y análogos);
- realizando todas las reacciones según un procedimiento «one pot» sin aislamiento, ni purificación de los productos intermedios de reacción;

- controlando la cantidad de amina grasa utilizada en la etapa de aminólisis y las condiciones de neutralización del ácido utilizado en la primera fase del procedimiento, es posible acabar en unas composiciones surfactantes que comprenden unas proporciones variables de sales de alquilamonio;
- utilizando condiciones sencillas para la purificación parcial de los productos en bruto de la reacción y el aislamiento de las composiciones surfactantes, lo que permite producir compuestos y composiciones derivadas a unos precios más competitivos que los del mercado actual.

El procedimiento de la invención permite producir unas composiciones derivadas del ácido L-gulurónico o derivadas tanto del ácido L-gulurónico como del ácido D-mannurónico en forma de amida, que tienen la ventaja de formar emulsiones muy estables de agua en aceite (W/O) y aceite en agua (O/W) en comparación con los emulsionantes comerciales, y de presentar unas propiedades antibacterianas y antifúngicas en las concentraciones utilizadas para la formación de emulsiones.

De este modo, el procedimiento de la invención permite tanto reducir los costes de producción de las composiciones de surfactantes como proponer nuevas composiciones con el objetivo de mejorar el rendimiento (propiedades surfactantes en particular).

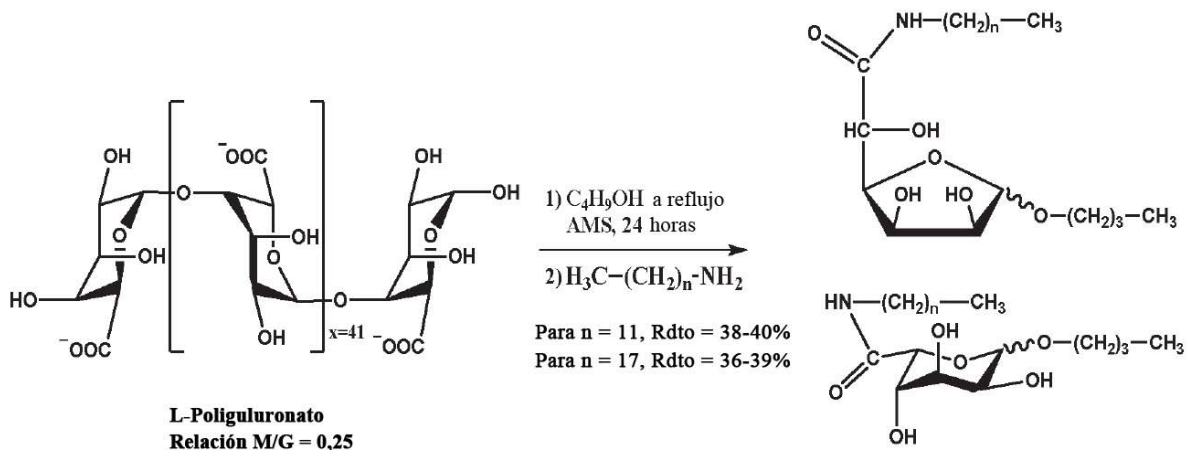
Otras ventajas también pueden aparecer para el experto en la técnica tras la lectura de los ejemplos que figuran a continuación, ilustrados por las figuras adjuntas, dadas a modo de ejemplo.

### Breve descripción de las figuras

- La figura 1 representa la medición de las tensiones interfaciales de las composiciones GN12, GN18, AlgN12, AlgN18 y AlgN12 crudo.
- La figura 2 representa la medición del poder emulsionante de las composiciones GN12, GN18, AlgN12, AlgN18 y AlgN12 crudo en comparación con las referencias comerciales Xylance® y Montanov®.

### EJEMPLOS

#### EJEMPLO 1: PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE L-GULURONAMIDAS DE ALQUILO A PARTIR DE POLI(OLIGO)GULURONATOS



Preparación de las materias primas: los poli(oligo)guluronatos pueden obtenerse, por ejemplo, según el procedimiento de Solicitud internacional WO 03/099870 [10].

#### 1) Reacción de butanolisis y de glicosilación de Fischer

Se ha mezclado 1 g de L-poli(oligo)guluronato de sodio (7500 g/mol, Grado de polimerización = 44) cuya relación M/G es 0,25 (5,71 mmol, 1 eq) con 2 mL de agua destilada. Se han añadido 80 mL (150 eq) de butanol a la solución de alginato en agitación con 778 µl de ácido metanosulfónico (12 mmol, 2,1 eq). El medio se ha agitado a la temperatura de reflujo del butanol (130-135 °C) durante 12 horas. Las aguas presentes en el medio y las dormadas a lo largo de la reacción se han eliminado en un Dean Stark lleno de butanol, mediante una destilación azeotrópica agua-butanol. Al ser más densa que el butanol, el agua se desplaza hacia el fondo del Dean Stark y algunos ml de butanol pasan al matraz para conservar el volumen inicial. Después de 12 horas, se ha realizado una cromatografía de capa fina

(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 95/5 v/v) para el medio de reacción para asegurarse que el producto deseado se ha sintetizado bien.

**2) Reacción de aminolisis**

5 La temperatura del medio se ha reducido hasta 60 °C antes de añadir 3 equivalentes molares (17,14 mmol) de amina grasa (Para n = 11, 3,18 gramos y para n = 17, 4,62 gramos) necesarios para aumentar el pH a 8,5. Después de 30 minutos de agitación a 65 °C bajo presión reducida de 150 mbar, se ha evaporado el butanol disminuyendo la presión de 150 mbar a 6 mbar en un periodo de 1 hora. El medio se dejó a una presión reducida de 6 mbar durante 1 hora y media para asegurar que la evaporación de las trazas de butanol que se han formado.

10

El residuo obtenido se recupera en el éter dietílico y después se filtra en sinterizado y se enjuaga varias veces con el éter dietílico para eliminar las sales y el azúcar inicial que no han reaccionado. El filtrado (que contiene nuestras guluronamidas de alquilo) se ha concentrado al vacío para eliminar el éter dietílico. De este modo, se obtuvo un aceite marrón.

15

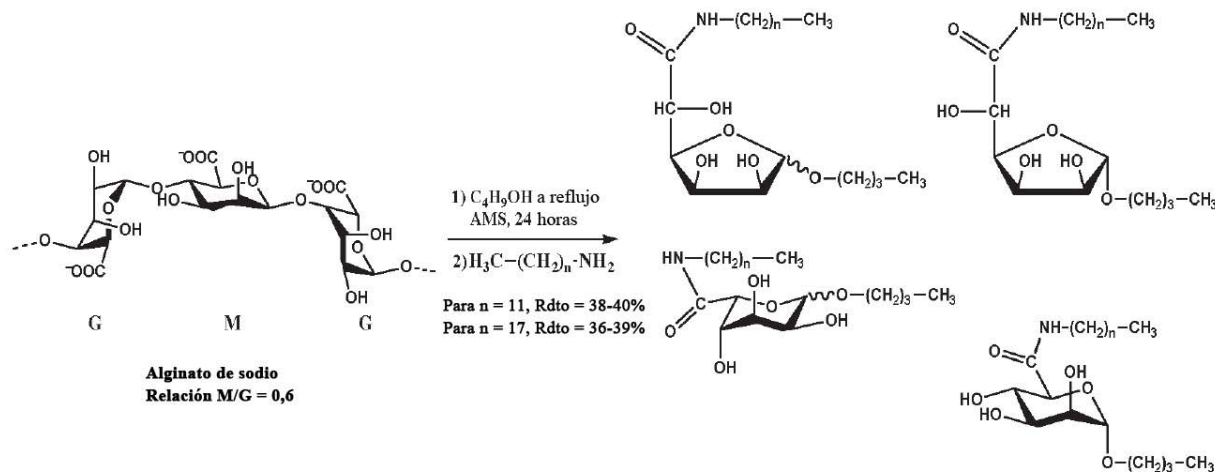
Para n = 11, después de la cromatografía eventual del aceite obtenido en columna de gel de sílice (80 gramos, utilizando el eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 95/5 v/v), se ha determinado la presencia de 0,95 g (2,27 mmol, 40 % de rendimiento) de una mezcla de 4 formas de isómeros de *W*-(12-dodecil)-*n*-butil β-L-gulurofuranosiduronamida (37 %), *W*-(12-dodecil)-*n*-butil α-L-gulurofuranosiduronamida (21 %), *W*-(12-dodecil)-*n*-butil α-L-gulopiranosiduronamida (28 %), y *W*-(12-dodecil)-*n*-butil β-L-gulopiranosiduronamida (14 %). La relación piranosa/furanosa es de 0,74. **Esta composición surfactante se ha denominado GN12.**

20

Para n = 17, después de la cromatografía eventual del aceite obtenido en columna de gel de sílice (80 gramos, utilizando el eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 95/5 v/v), se ha determinado la presencia de 1,08 g (2,16 mmol, 38 % de rendimiento) de una mezcla de 4 formas de isómeros de *W*-(18-octadecil)-*n*-butil β-L-gulurofuranosiduronamida (36 %), *W*-(18-octadecil)-*n*-butil α-L-gulurofuranosiduronamida (23 %), *W*-(18-octadecil)-*n*-butil α-L-gulopiranosiduronamida (25 %), y *W*-(18-octadecil)-*n*-butil β-L-gulopiranosiduronamida (16 %). La relación piranosa/furanosa es de 0,69. **Esta composición surfactante se ha denominado GN18.**

25

**30 EJEMPLO 2: PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE L-GULURONAMIDAS Y D-MANNURONAMIDAS DE ALQUILO A PARTIR DE ALGINATOS**



35 Preparación de las materias primas: Los procedimientos de extracción de los alginatos se utilizan tradicionalmente en CEVA (René Pérez «El cultivo de las algas marinas en el mundo», Ifremer). Se emplea una lixiviación ácida de algas frescas o secas (lavado de las algas cosechadas con agua de mar, despigmentación en formol, molienda, extracción con ácido sulfúrico 0,2 N a temperatura ambiente, escurrido y enjuague de las algas lixiviadas con agua destilada), seguido de la solubilización de los alginatos de sodio por aumento del pH del medio y luego la separación sólido-

40 líquido para eliminar los residuos de algas (adición de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 1,5 % a 50 g secos de material algal lixiviado a una relación alga seca/solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 1,5 % de 0,025, agitación en el reactor IKA durante 3 horas a 55 °C, enfriamiento en un baño de agua con algunos cubitos de hielo para evitar diferencias muy importantes de temperatura, centrifugación 5 minutos a 6000 rpm, separación sólido/líquido). En esta etapa, la fracción líquida se puede congelar y liofilizar y constituye los alginatos semirrefinados en forma de alginatos de sodio. Para obtener

45 alginatos refinados, la purificación se realiza en las etapas anteriores. Después de la separación de los residuos



algales, esta última etapa de purificación consiste en una precipitación del ácido algínico por disminución del pH, seguido de varios lavados con agua ácida para eliminar los coproductos. Un aumento del pH con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> permite de nuevo solubilizar los alginatos de sodio limitando las sales, en comparación con la utilización de la sosa. Finalmente, una etapa final de congelación y después de liofilización permite llegar al producto final. Para obtener los oligoalginatos, saturados o insaturados, la solución de alginato se trata por vía enzimática o ácida con el fin de reducir el grado de polimerización de los alginatos de 20 a 3.

#### **A) sin neutralización previa del medio de reacción antes de la reacción de aminólisis**

##### **10 1) Reacción de butanolisis y de glicosilación de Fischer**

Se ha mezclado 1 g de alginato de sodio (110.200 g/mol, Grado de polimerización = 630, extracto de *Sargassum vulgare*) cuya relación M/G es 0,71 (5,71 mmol, 1 eq) con 3 mL de agua destilada. Se han añadido 80 mL (150 eq) de butanol a la solución de alginato en agitación con 927 µl de ácido metanosulfónico (14,27 mmol, 2,5 eq). El medio se ha agitado a la temperatura de reflujo del butanol (130-135 °C) durante 24 horas. Las aguas presentes en el medio y las dormadas a lo largo de la reacción se han eliminado en un Dean Stark lleno de butanol, mediante una destilación azeotrópica agua-butanol. Al ser más densa que el butanol, el agua se desplaza hacia el fondo del Dean Stark y algunos ml de butanol pasan al matraz para conservar el volumen inicial. Después de 24 horas, se ha realizado una cromatografía de capa fina (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 95/5 v/v) para el medio de reacción para asegurarse que el producto deseado se ha sintetizado bien.

##### **2) Reacción de aminólisis**

La temperatura del medio se ha reducido hasta 60 °C antes de añadir 3 equivalentes molares (17,14 mmol) de amina grasa (Para n = 11, 3,18 gramos y para n = 17, 4,62 gramos) necesarios para aumentar el pH a 8,5. Después de 30 minutos de agitación a 65 °C bajo presión reducida de 150 mbar, se ha evaporado el butanol disminuyendo la presión de 150 mbar a 6 mbar en un periodo de 1 hora. El medio se dejó a una presión reducida de 6 mbar durante 1 hora y media para asegurar la evaporación de las trazas de butanol que se han formado.

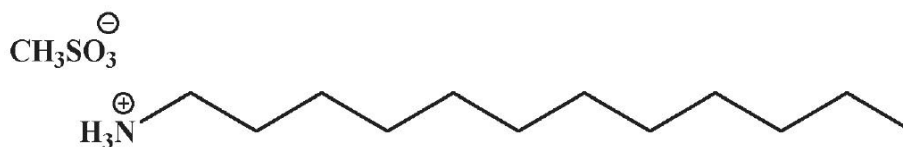
El residuo obtenido se recupera en el éter dietílico y después se filtra en sinterizado y se enjuaga varias veces con el éter dietílico para eliminar las sales y el azúcar inicial que no han reaccionado. El filtrado (que contiene las guluronamidas y manuronamidas de alquilo) se ha concentrado al vacío para eliminar el éter dietílico. De este modo, se obtiene un aceite marrón oscuro.

Para n = 11, después de la cromatografía eventual del aceite obtenido en columna de gel de sílice (80 gramos, utilizando el eluyente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH 95/5 v/v), se ha determinado la presencia de 0,91 g (2,18 mmol, 39 % de rendimiento) de una mezcla de 6 formas de isómeros (C<sub>22</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>6</sub>, masa molar = 417,59 g/mol) de *W*-(12-dodecil)-*n*-butil β-L- gulurofuranosiduronamida (26 %), *W*-(12-dodecil)-*n*-butil α-L-gulurofuranosiduronamida (15 %), *W*-(12-dodecil)-*n*-butil α-L-guluropiranosiduronamida (16 %), *W*-(12-dodecil)-*n*-butil β-L-guluropiranosiduronamida (12 %), *W*-(12-dodecil)-*n*-butil α-D-mannofuranosiduronamida (18 %) y *W*-(12-dodecil)-*n*-butil α-D-mannopiranosiduronamida (14 %). **Esta composición surfactante se ha denominado AlgN12.**

A partir del análisis de los espectros de RMN 1D y 2D del crudo de la reacción (antes de la purificación), se ha podido calcular: la relación piranosa/furanosa de las formas de guluronamida (0,72), la relación piranosa/furanosa de las formas de manuronamida (0,81) y la relación manuronamida/guluronamida (0,47).

Además, se pudo cuantificar la cantidad de sales de mesilato de dodecilamonio que se formaron durante la reacción de aminólisis. Partiendo de 1 g de alginato (1 eq.), esta cantidad formada fue de 1,8 equivalentes molares (0,010 moles, 2,89 gramos).

Caracterización de la sal de amina asociada: mesilato de dodecilamonio

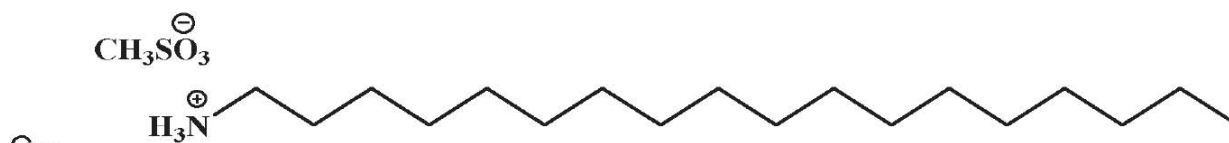


$$M = 281,46 \text{ g/mol}$$

Para  $n = 17$ , después de la cromatografía eventual del aceite obtenido en columna de gel de sílice (80 gramos, utilizando el eluyente  $CH_2Cl_2/CH_3OH$  95/5 v/v), se ha determinado la presencia de 1,03 g (2,05 mmol, 36 % de rendimiento) de una mezcla de 6 formas de isómeros ( $C_{28}H_{55}NO_6$ , masa molar = 501,75 g/mol) de *W*-(18-octadecil)-*n*-butil  $\beta$ -L- gulurofuranosiduronamida (25 %), *W*-(18-octadecil)-*n*-butil  $\alpha$ -L- gulurofuranosiduronamida (15 %), *W*-(18-octadecil)-*n*-butil  $\alpha$ -L- gulopiranosiduronamida (16 %), *W*-(18-octadecil)-*n*-butil  $\beta$ -L- gulopiranosiduronamida (12 %), *W*-(18-octadecil)-*n*-butil  $\alpha$ -D- mannofuranosiduronamida (18 %) y *W*-(18-octadecil)-*n*-butil  $\alpha$ -D- mannopiranosiduronamida (14 %). **Esta composición surfactante se ha denominado AlgN18.**

A partir del análisis de los espectros de RMN 1D y 2D del crudo de la reacción (antes de la purificación), se ha podido calcular: la relación piranosa/furanosa de las formas de guluronamida (0,71), la relación piranosa/furanosa de las formas de manuronamida (0,84) y la relación manuronamida/guluronamida (0,46). Además, se pudo cuantificar la presencia de sales de mesilato de octadecilamonio que se formaron durante la reacción de aminólisis. Partiendo de 1 g de alginato (1 eq.), esta cantidad formada fue de 2 equivalentes molares (0,011 moles, 4,16 gramos).

Caracterización de la sal de amina asociada: mesilato de octadecilamonio.



$C_{19}$



$$M = 365,62 \text{ g/mol}$$

20

### **B) con neutralización previa del medio de reacción antes de la reacción de aminólisis**

Con el propósito de desarrollar un procedimiento sin etapa de purificación, más sencillo de implementar a escala piloto, utilizando una pequeña cantidad de aminas y evitando la utilización de disolventes orgánicos (excepto el butanol), se llevó a cabo según el protocolo descrito a continuación:

#### **1) Reacción de butanolisis y de glicosilación de Fischer**

Se ha mezclado 1 g de alginato de sodio (110.200 g/mol, Grado de polimerización = 630, extracto de *Sargassum vulgare*) cuya relación M/G es 0,71 (5,71 mmol, 1 eq) con 3 mL de agua destilada. Se han añadido 80 mL (150 eq) de butanol a la solución de alginato en agitación con 927  $\mu$ l de ácido metanosulfónico (14,27 mmol, 2,5 eq). El medio se ha agitado a la temperatura de reflujo del butanol (130-135 °C) durante 24 horas. Las aguas presentes en el medio y las dormadas a lo largo de la reacción se han eliminado en un Dean Stark lleno de butanol, mediante una destilación azeotrópica agua-butanol. Al ser más densa que el butanol, el agua se desplaza hacia el fondo del Dean Stark y algunos ml de butanol pasan al matraz para conservar el volumen inicial. Después de 24 horas, se ha realizado una cromatografía de capa fina ( $CH_2Cl_2/CH_3OH$  95/5 v/v) para el medio de reacción para asegurarse que el producto deseado se sintetiza bien.

#### **2) Neutralización del medio de reacción**

40

Con el propósito de reducir la cantidad de aminas a añadir en la segunda fase del procedimiento, se neutralizó el medio de reacción, después del enfriamiento, con sosa 1 M (8 mL) a un pH de 7. Después, el agua se ha evaporado

en el evaporador rotatorio.

### 3) Reacción de aminólisis

- 5 Se ha añadido 1 equivalente molar de dodecilamina (5,71 mmol, 1,06 gramos) al medio de reacción. Después de 30 minutos de agitación a 65 °C bajo presión reducida de 150 mbar, se ha evaporado el butanol disminuyendo la presión de 150 mbar a 6 mbar en un periodo de 1 hora. El medio se dejó a una presión reducida de 6 mbar durante 1 hora y media para asegurar la evaporación de las trazas de butanol que se han formado.
- 10 Una etapa para eliminar las sales consistió en añadir 500 equivalentes molares al agua (60 mL) y el conjunto se agita a 70 °C durante 15 minutos. Después de dejar de agitar, los productos orgánicos de las amidas floccularon en la superficie del agua. Al permitir que el medio se enfríe a temperatura ambiente, la fase orgánica se solidificó, fue fácil eliminar el agua cargada de sales y se recuperaron los flóculos sólidos. Estos flóculos, de coloración marrón extremadamente intensa, están formados por la L-guluronamida y D-mannuronamida de alquilo en bruto y las sales de mesilato de dodecilamonio. La masa final obtenida fue de 1,21 gramos (2,9 mmol). **Esta composición surfactante se ha denominado AlgN12 crudo.**

A partir del análisis de los espectros de RMN 1D y 2D del crudo de la reacción (sin purificación), se ha determinado la presencia de una mezcla de 6 formas de isómeros (C<sub>22</sub>H<sub>43</sub>NO<sub>6</sub>, masa molar = 417,59 g/mol) de *N*-(12-dodecil)-*n*-butil β-L- gulurofuranosiduronamida (24 %), *N*-(12-dodecil)-*n*-butil α-L-gulurofuranosiduronamida (14 %), *N*-(12-dodecil)-*n*-butil α-L-gulopiranosiduronamida (18 %), *N*-(12-dodecil)-*n*-butil β-L-gulopiranosiduronamida (10 %), *N*-(12-dodecil)-*n*-butil α-D-mannofuranosiduronamida (19 %) y *N*-(12-dodecil)-*n*-butil α-D-mannopiranosiduronamida (15 %).

Estos datos han permitido calcular la relación piranosa/furanosa de las formas de guluronamidas (0,73), la relación piranosa/furanosa de las formas de manuronamidas (0,79) y la relación manuronamida/guluronamida (0,51).

Además, se pudo cuantificar la presencia de sales de mesilato de dodecilamonio que se formaron durante la reacción de aminólisis. Partiendo de 1 g de alginato (1 eq.), esta cantidad formada fue de 0,4 equivalentes molares (0,0023 moles, 0,64 gramos).

### 30 EJEMPLO 3: MEDICIÓN DE LAS TENSIONES INTERFACIALES (CASO DEL SISTEMA ACEITE DE GIRASOL-AGUA) DE LAS COMPOSICIONES GN12, GN18, AlgN12, AlgN18 y AlgN12 crudo

Las propiedades interfaciales de las composiciones surfactantes GN12, GN18, AlgN12, AlgN18 y AlgN12 crudo se evaluaron midiendo las tensiones interfaciales aceite-agua. Los surfactantes se solubilizaron en aceite de girasol a unas concentraciones que oscilaron entre 0,12 y 2,28 g/l. Para favorecer la solubilidad de los surfactantes en aceite, las soluciones se dejaron en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos a 50 °C.

Las mediciones de tensión en la interfaz entre el aceite y el agua se realizaron a 25 °C con un tensiómetro de anillo (Krüss, modelo K 100C). El anillo utilizado era de iridio de platino calibrado.

La tensión interfacial entre el aceite de girasol (marca Carrefour) y el agua a 25 °C varió entre 24,71 y 25,04 mN/m.

Para cada composición surfactante, el aparato midió inicialmente la tensión superficial del aceite de girasol que contiene el surfactante (líquido de baja densidad) y después la tensión superficial del agua (líquido de alta densidad). Finalmente, el aceite se agregó suavemente al agua, evitando la formación de burbujas, el dispositivo comenzó a medir la tensión interfacial entre el aceite de girasol y el agua (promedio de 10 mediciones).

Tensiones interfaciales de las composiciones surfactantes (mN/m)

	GN12	AlgN12	AlgN12 crudo	GN18	AlgN18
0,12 g/L	18,91	18,45	17,25		
0,25 g/L	13,79	15,21	14,08	17,49	17,56
0,46 g/L	12,45	11,75	11,29	14,315	14,37
0,61 g/L	9,15	10,39	9,87		13,02
1,11 g/L	7,24	6,94		10,9	9,63
1,64 g/L	5,97			8,475	

(continuación)

2,28 g/L				6,75	6,22
2,97 g/L				5,83	
3,49 g/L				5,346	
<i>Las casillas grises corresponden a casos en los que no se ha medido la tensión interfacial</i>					

La figura 1 muestra que las composiciones de surfactantes han sido capaces de reducir de forma similar las tensiones interfaciales agua/aceite a valores lo suficientemente bajos como para conferir a las composiciones poderes surfactantes. Se observó que la composición del AlgN12 crudo obtenida por el procedimiento directo de obtención de L-guluronamidas y D-mannuronamidas de alquilo a partir de alginato, con neutralización previa del medio antes de la reacción de aminólisis fue más eficaz que la composición surfactante AlgN12 correspondiente a la mezcla de L-guluronamidas y D-mannuronamidas de alquilo purificadas por cromatografía (procedimiento directo para la obtención de L-guluronamidas y D-mannuronamidas alquilo a partir de alginato, sin neutralización previa del medio antes de la reacción de aminólisis). Estos resultados mostraron la posibilidad de utilizar un crudo de reacción sin necesidad de purificación adicional. Del mismo modo, las composiciones derivadas de la dodecilamina (GN12, AlgN12, AlgN12 crudo) fueron más eficaces que las derivadas de la octadecilamina (GN18, AlgN18).

#### **EJEMPLO 4: MEDIDA DE LA POTENCIA EMULSIONANTE DE LAS COMPOSICIONES GN12, GN18, AlgN12, AlgN18 y AlgN12 crudo**

Se ha estudiado la estabilidad de las emulsiones de aceite en agua (O/W) y agua en aceite (W/O) formadas a partir de las composiciones surfactantes GN12, GN18, AlgN12, AlgN18 y AlgN12 crudo en comparación con los alquilpoliglucósidos comerciales: Montanov 82® de Seppic y Xyliance® de Soliance/ARD.

La estabilidad de los dos tipos de emulsiones O/W y W/O se evaluó considerando las dos relaciones agua/aceite 75/25 y 25/75 respectivamente en tubos graduados de fondo redondo, se introduce el 0,5 % del producto surfactante (20 mg). Se introdujo el aceite de girasol (1 o 3 mL), luego se solubilizaron los surfactantes en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos a 50 °C. Después de la solubilización del emulsionante, se añadió agua ultrapura (1 o 3 ml).

Las dos fases se emulsionaron después con un homogeneizador Ultraturaxlka T18 basic® durante 10 minutos a 11000 rpm. La emulsión se colocó en un baño con termostato a 20 °C.

La evolución de la emulsión y su progresiva separación se observó de unas horas a varias semanas.

La figura 2 muestra los resultados del análisis del poder emulsionante de las composiciones de la invención.

Las composiciones surfactantes derivadas de la dodecilamina (GN12, AlgN12 y AlgN12 crudo) formaron emulsiones O/W muy estables, incluso en el caso de la composición del surfactante crudo (AlgN12 crudo), así como emulsiones W/O estables (GN12 y AlgN12). Las composiciones surfactantes derivadas de la octadecilamina (GN18 y AlgN18) formaron emulsiones W/O muy estables, las otras emulsiones W/O sufrieron una separación total después de 5 h.

Para los 2 tipos de emulsiones (W/O y W/O), las nuevas composiciones (GN12, AlgN12 y AlgN12 crudo) formaron emulsiones más estables que las referencias comerciales (Xyliance® y Montanov®).

#### **EJEMPLO 5: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE DIFERENTES FRACCIONES DE PRODUCTOS MODIFICADOS**

Se han utilizado dos protocolos. El primero (Protocolo A) se aplicó a las fracciones enriquecidas con isómeros de *W*-(12-dodecil)-*n*-butil  $\alpha$ -L-guluronamida mediante cromatografía de gel de sílice. El segundo (Protocolo B) se siguió para probar la actividad de las composiciones surfactantes derivadas de dodecilamina (GN12, AlgN12 y AlgN12 crudo) y de la composición surfactante de octadecilamina (AlgN18)

##### **Protocolo A**

###### **1) Preparación del medio de cultivo:**

El medio de cultivo utilizado fue una mezcla de 21 g/L de medio de cultivo Muller Hinton y 10 g/L de agar en agua. Esta mezcla se agitó y luego se dejó hirviendo. Después, fue necesaria una etapa de autoclavado de esta mezcla, durante 30 minutos, para esterilizarla antes de cualquier manipulación. Este medio de cultivo se vertía caliente en unas placas de Petri y luego se deja enfriar.

2) Preparación de los productos modificados a ensayar:

5 mg de cada azúcar modificado se disolvieron en 1 mL DMSO. A continuación se realizaron una serie de diluciones en  $\frac{1}{2}$ , por DMSO, a partir de la solución madre para obtener las concentraciones de 2,5 g/L, 1,25 g/L, 0,625 g/L y 0,3125 g/L.

3) Preparación de las suspensiones bacterianas y fúngicas:

Las cepas bacterianas utilizadas *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia Coli*, *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*, además de la cepa fúngica *Candida albicans*. Se recogieron  $10^6$  bacterias y se transfirieron a una solución de NaCl al 0,9 %. Cada placa de Petri, que contenía medio Muller Hinton, se inundó con una suspensión bacteriana diferente.

4) Protocolo:

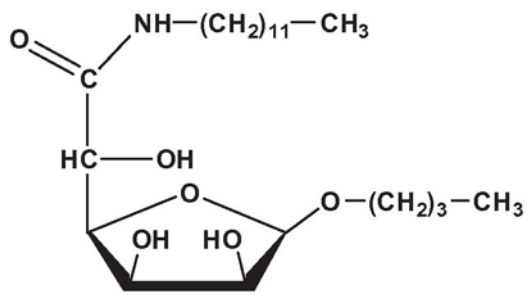
Después de dejar secar las suspensiones bacterianas en el agar, se depositaron 10  $\mu$ L de cada solución a ensayar, y a diferentes concentraciones, en la superficie del agar inundada por la suspensión bacteriana. En cada placa de Petri se depositaron 10  $\mu$ L de DMSO como control negativo.

Los controles positivos utilizados fueron discos empapados en ampicilina para *Escherichia coli* y *Enterococcus faecium*, discos de ceftazidima para *Pseudomonas aeruginosa* y discos de vancomicina para *Staphylococcus aureus*.

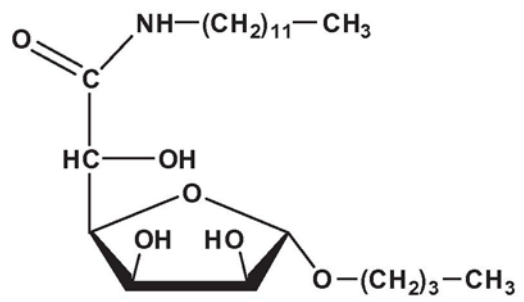
Después de secarse, las placas de Petri se incubaron a 37 °C, en la estufa, durante 24 horas. La actividad antibacteriana se evaluó midiendo la zona de clarificación en mm alrededor del lugar de depósito de las diferentes soluciones a ensayar.

A modo de ejemplo, la actividad de las fracciones I, II y III enriquecidas con isómeros de *W*-(12-dodecil)-*n*-butil  $\alpha$ -L-guluronamida (forma  $\beta$ -L-furanosida = **Fracción I**; forma  $\alpha$ -L-piranosida= **Fracción II**;  $\beta$ -L-piranosida = **Fracción III**):

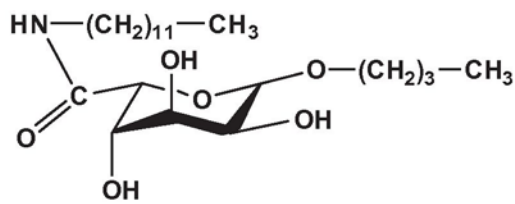
Fraciones enriquecidas en	Concentración	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecium</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
N-(12-dodecil)-n-butil-β-L- gulofofuranosiduronamida (75%) <b>Fracción I</b>	5	0	0	9 mm	4,5 mm	10,5 mm
	2,5			9 mm	4mm	5mm
	1,25			7mm	4mm	5mm
	0,625			0	4mm	0
	0,3125			0	0	0
N-(12-dodecil)-n-butil-α-L- guloropiranosiduronamida (74%) <b>Fracción II</b>	5	0	0	20 mm	5 mm	18,5 mm
	2,5			20 mm	3 mm	17 mm
	1,25			11 mm	3 mm	5 mm
	0,625			8 mm	0	0
	0,3125			8 mm	0	0
N-(12-dodecil)-n-butil-β-L- guloropiranosiduronamida (94%) <b>Fracción III</b>	5	0	0	0	9 mm	20,5 mm
	2,5				7 mm	18 mm
	1,25				5 mm	0
	0,625				0	0
	0,3125				0	0
Control positivo	-	Ceftazidima 28 mm	Ampicilina 22 mm	Ampicilina 26 mm	-	Vancomicina 19 mm



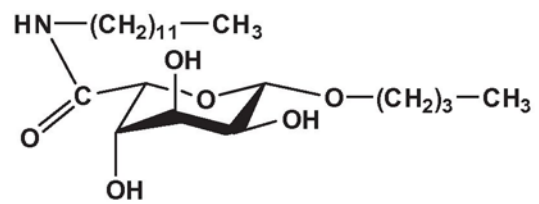
*N*-(12-dodecil)-*n*-butil- $\alpha$ -L-gulurofuranosiduronamida



*N*-(12-dodecil)-*n*-butil- $\beta$ -L-gulurofuranosiduronamida



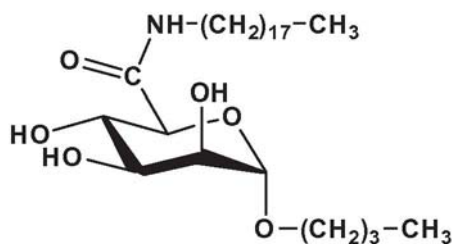
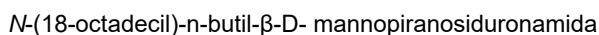
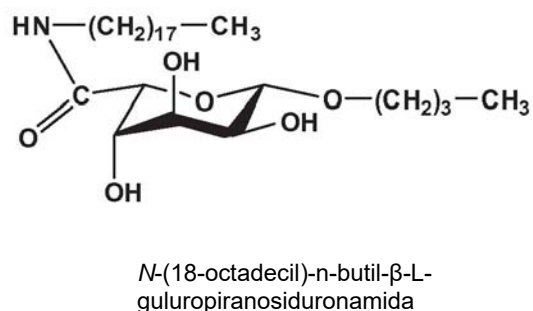
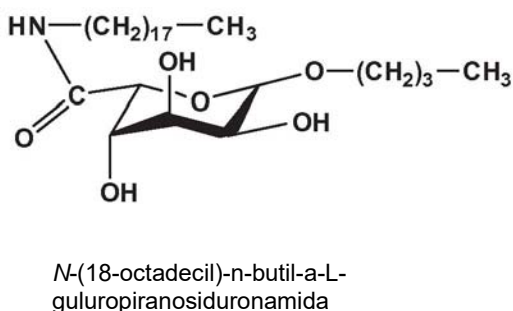
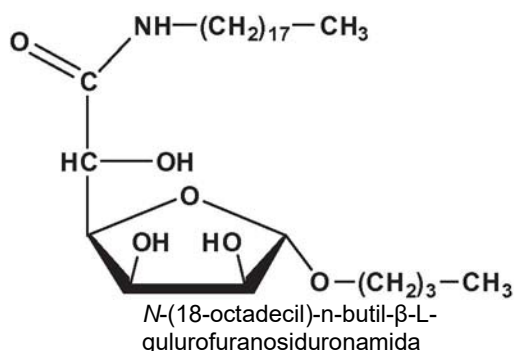
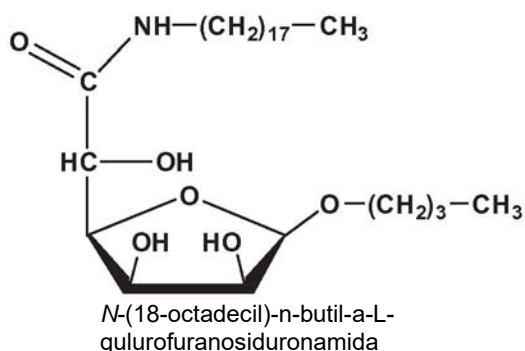
*N*-(12-dodecil)-*n*-butil- $\alpha$ -L-guluropiranosiduronamida



*N*-(12-dodecil)-*n*-butil- $\beta$ -L-guluropiranosiduronamida

Fraciones enriquecidas en	Concentración	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecium</i>	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
N-(18-octadecil)-n-butil- $\alpha$ -L-gulurofuranosiduronamida (47%)	5	0	0	6 mm	0	0
	2,5			6 mm		
	1,25			6 mm		
	0,625			4mm		
	0,3125			0		
N-(18-octadecil)-n-butil- $\beta$ -L-gulurofuranosiduronamida (63%)	5	0	0	4,5 mm	0	10 mm
	2,5			4mm		
	1,25			4mm		
	0,625			3 mm		
	0,3125			0		
N-(18-octadecil)-n-butil- $\beta$ -L-guluropiranosiduronamida (86%)	5	0	0	6 mm	0	0
	2,5			4mm		
	1,25			0		
	0,625			0		
	0,3125			0		
Control positivo	-	Ceftazidima 28 mm	Ampicilina 22 mm	Ampicilina 26 mm	-	Vancomicina 19 mm





5  
N

10

Para los estudios de las actividades antibacterianas y antifúngicas, se probaron fracciones obtenidas de la purificación del crudo de *N*-(12-dodecil)-*n*-butil-L-guluronamida. Cada fracción está más enriquecida en un isómero que las otras.

- 15 Contra las bacterias Gram positivas *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*, la *N*-(12 dodecil)-*n*-butil L-guluronamida (fracción enriquecida en forma de piranosa a) ha mostrado una capacidad importante para inhibir el crecimiento de estas dos bacterias en el orden de 20 mm y 18,5 mm, respectivamente. Esta actividad inhibitora disminuyó al disminuir la concentración. Parece que las formas de piranosas, presentes mayoritariamente (94 %), no mostraron ningún efecto inhibitor contra *Enterococcus faecium*, pero mostraron un efecto más importante sobre el crecimiento de la levadura *Candida albicans* (9 mm a 5 g/L), además del efecto inhibitor más fuerte contra el *Staphylococcus aureus* (20,5 mm a 5 g/L).

25 Por otro lado, la *N*-(18 octadecil)-*n*-butil L-guluronamida no mostró ningún efecto inhibitor ni sobre la bacteria Gram positivo *Staphylococcus aureus* ni sobre la levadura *Candida albicans*.

Contra las bacterias gramnegativas *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, ni *N*-(12 dodecil)-*n*-butilo L-guluronamida ni *N*-(18 octadecil)-*n*-butilo L-guluronamida (ya sea en forma de furanosa o piranosa) mostraron actividad inhibitora el crecimiento de estas dos bacterias.

### 30 **Protocolo B**

Los interesantes resultados de la actividad antibacteriana y antifúngica obtenidos para las fracciones enriquecidas con

## ES 2 755 110 T3

isómeros de *N*-(12-dodecil)-*n*-butil *a*-L-guluronamida, animaron a los inventores a probar la actividad antibacteriana y antifúngica de las mezclas de productos surfactantes obtenidos a partir de guluronatos (GN12) y de alginatos (AlgN12, AlgN12 crudo y AlgN18). Para estas mezclas de surfactantes, se probó un nuevo método basado en el estudio de la capacidad de los surfactantes de la invención para matar las bacterias y luego el recuento del número de bacterias vivas en el agar Muller-Hinton.

### 1) Preparación del inóculo bacteriano y fúngico:

El inóculo se preparó con una turbidez equivalente a 0,5 MacFarland (Biomérieux France) y después se diluyó a 1/100 (10<sup>6</sup> UFC/ml). A partir de este inóculo, se preparó una serie de diluciones 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>. Se esparcieron 100 µl de cada dilución (método de recuento) sobre la superficie de un agar Muller-Hinton (determinación del número de bacterias en UFC/ml en el inóculo «N»).

### 2) Preparación de los productos modificados a ensayar:

Se prepararon soluciones madre para cada surfactante GN12 (430 mg/ml), AlgN12 (310 mg/ml), AlgN12 crudo (216 mg/ml) y AlgN18 (219 mg/ml). Se realizó una serie de diluciones en 1/2, por DMSO para cada producto en medio de cultivo Muller-Hinton, la dilución final fue de 1/128.

### 3) Protocolo:

En cada tubo de diluciones de surfactantes se han añadido 1 ml de inóculo bacteriano.

Después de la incubación de 24 h a 36 °C, 100 µl de cada tubo transparente fueron esparcidos en la superficie de un agar Muller-Hinton seguido de la incubación 24 h a 37 °C.

Se determinó el número de bacterias vivas: N0=nx10 UFC/ml (n=número de las colonias).

Se calculó el porcentaje de bacterias vivas: N0/N x100:

Nombre de la bacteria	Nombre del producto	Concentración preparada (mg/ml)	Resultados
<i>Escherichia coli</i>	AlgN <sub>12</sub>	310 mg/ml	155 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 77,5 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 38,75 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 19,375 mg/ml => Inhibición del 99,99 % de las bacterias
	AlgN <sub>12</sub> (crudo)	216 mg/ml	108 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 54 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 27 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 13,5 mg/ml => Inhibición del 99,99 % de las bacterias
	AlgN <sub>18</sub>	219 mg/ml	109,5 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 54,75 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 27,375 mg/ml => Inhibición del 99,99 % de las bacterias

ES 2 755 110 T3

(continuación)

	GN <sub>12</sub>	430 mg/ml	215 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 107,5 mg/ml => Inhibición del 99,99 % de las bacterias
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AlgN <sub>12</sub>	310 mg/ml	155 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 77,5 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 38,75 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 19,375 mg/ml => Inhibición del 99,9 % de las bacterias
	AlgN <sub>12</sub> (crudo)	216 mg/ml	108 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 54 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 27 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 13,5 mg/ml => Inhibición del 99,9 % de las bacterias
	AlgN <sub>18</sub>	219 mg/ml	109,5 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 54,75 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 27,375 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias
	GN <sub>12</sub>	430 mg/ml	215 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 107,5 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 53,75 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias
<i>Enterococcus faecium</i>	AlgN <sub>12</sub>	310 mg/ml	2,42 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias
	AlgN <sub>12</sub> (crudo)	216 mg/ml	1,7 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias
	AlgN <sub>18</sub>	219 mg/ml	109,5 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 54,75 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 27,375 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias
	GN <sub>12</sub>	430 mg/ml	3,36 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias
<i>Candidas albicans</i>	AlgN <sub>12</sub>	310 mg/ml	2,42 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias

(continuación)

	AlgN <sub>12</sub> (crudo)	216 mg/ml	1,7 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias
	AlgN <sub>18</sub>	219 mg/ml	109,5 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 54,75 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias 27,375 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias
	GN <sub>12</sub>	430 mg/ml	3,36 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias
<i>Staphylococcus aureus</i>	AlgN <sub>18</sub>	219 mg/ml	109,5 mg/ml => Inhibición del 100 % de las bacterias

Contra la bacteria Gram positiva *Enterococcus faecium*, la mezcla de AlgN12 crudo (con una neutralización antes de la reacción de aminólisis) parece más eficaz que la mezcla AlgN12 (procedimiento sin neutralización antes de la reacción de aminólisis), ya que una concentración de 1,7 mg/ml de AlgN12 (crudo) bastará para inhibir el 100 % de *Enterococcus faecium*, mientras que esta concentración es mayor en el caso de AlgN12 (2,42 mg/ml). Además, la mezcla de surfactantes resultante de la modificación química del alginato (mezcla de manuronamida y guluronamida) presenta un poder más fuerte contra *Enterococcus faecium* que los surfactantes de guluronamida solo (concentración más elevada en GN12 del orden de 3,36 mg/ml para inhibir el 100 % de *Enterococcus faecium*). Esta observación es la misma para la inhibición de *Candida albicans*.

Contra las bacterias gramnegativas *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, se requieren unas concentraciones muy elevadas de surfactantes para inhibir estas dos bacterias al 100 %, lo que demuestra que el AlgN12 (38,75 mg/ml), el AlgN12 crudo (13,5 mg/ml) y el GN12 (53,75 mg/ml) tienen un bajo poder antibacteriano contra estos dos tipos de bacterias.

Al comparar AlgN12 y AlgN18, el producto surfactante alginato de amida que presenta una cadena octadecilo tiene un poder antibacteriano más débil contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas probadas. Se requiere una concentración elevada de AlgN18 para inhibir el 100 % de las bacterias *Enterococcus faecium* (27,375 mg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (27,375 mg/ml), *Escherichia coli* (54,75 mg/ml) y *Candida albicans* (27,375 mg/ml).

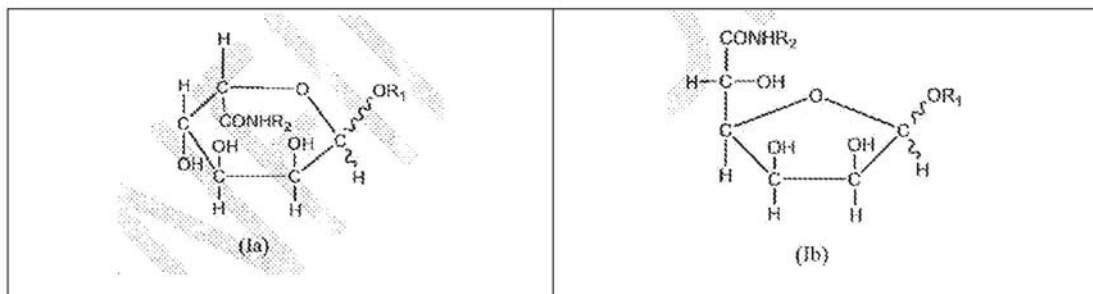
#### Listas de referencias

- 1- Hill et Lehen-Ferrenbach, «In Sugar-based surfactants fundamentals and Applications», C.C. Ruiz (Ed.), 1-20, CRC Press, ISBN 978-1-4200-5166-7, 2009
- 2- Laurent et al., J. Surfact. Deterg., 14: 51-63, 2011
- 3- Solicitud internacional WO 9206984
- 4- Solicitud internacional WO 9303004
- 5- Patente US 7.655.611
- 6- Patente US 5,872,111
- 7- Patente US 2,670,345
- 8- Benvegnu et Sassi, Topics in Current Chemistry, 294: 143-164, 2010
- 9- Solicitud internacional WO 03/104248
- 10- Solicitud internacional WO 03/099870
- 11- Solicitud internacional WO 2009/134368
- 12- Solicitud internacional WO 98/40511

REIVINDICACIONES

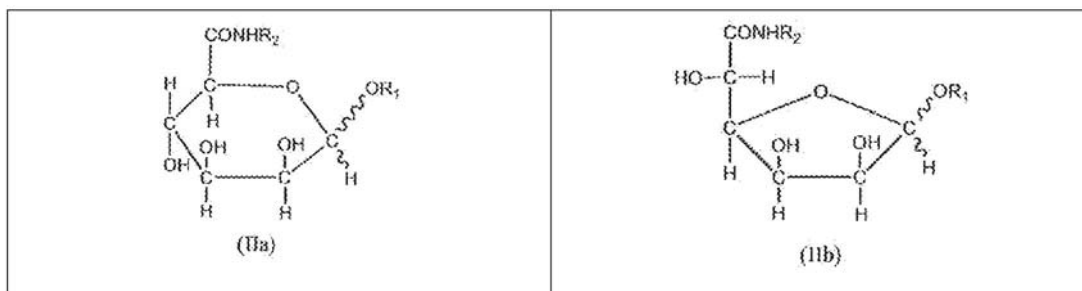
1. Procedimiento de preparación de una composición que comprende:

5 (i) unas L-gulonamidas de alquilo de las fórmulas (Ia) y (Ib):



o

10 (ii) una mezcla de L-gulonamidas de alquilo de las fórmulas (Ia) y (Ib) y de D-mannuronamidas de alquilo de fórmula (IIa) y (IIb):



15 en el que

- R<sub>1</sub> es una cadena alquilo de 2 a 22 átomos de carbono, lineal o ramificada, saturada o insaturada;
- R<sub>2</sub> es un átomo de hidrógeno, una cadena alquilo de 2 a 22 átomos de carbono, lineal o ramificada, saturada o insaturada que puede presentar una función amino terminal;

20

y **caracterizado porque** dicho procedimiento comprende:

- a) una etapa de reacción de butanolisis y de glicosilación de Fischer a partir de poli(oligo)guronatos, de oligoalginatos, de alginatos y/o de algas marrones;
- 25 b) una etapa de reacción de aminólisis en el medio de reacción resultante de la etapa a), en presencia de una amina de fórmula R'NH<sub>2</sub>, lineal o ramificada, saturada o insaturado donde R' está compuesto por 2 a 22 átomos de carbono.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el procedimiento comprende una etapa a') de neutralización del medio de reacción que resulta de la etapa a) antes de la etapa b).

3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, donde la etapa a) se realiza en presencia de (i) agua y/o de un disolvente iónico y/o un disolvente eutéctico, (ii) un alcohol de fórmula ROH lineal o ramificado, saturado o insaturado, que presenta de 1 a 4 átomos de carbono y (iii) un catalizador ácido.

35

4. Procedimiento según la reivindicación 3, donde el catalizador ácido se selecciona de entre el grupo que consta de: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido alquilo sulfúrico, ácido sulfónico, ácido alquilosulfónico o sulfosuccinato de alquilo, ácidos perhalohídricos, metales, sus óxidos o sus sales, como sus haluros.

40 5. Procedimiento según la reivindicación 4, donde el catalizador ácido es el ácido metanosulfónico.

## ES 2 755 110 T3

6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el alcohol ROH es el n-butanol.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la etapa b) se realiza en presencia de una amina grasa seleccionada de entre el grupo constituido por dodecilamina y la amina oleica.
- 5 8. Composición obtenida con un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Composición según la reivindicación 8, donde dicha composición es una emulsión aceite en agua o agua en aceite.
- 10 10. Utilización de una composición según la reivindicación 8 o 9 como agente surfactante.
11. Utilización de una composición según la reivindicación 10, donde el surfactante se selecciona de entre el grupo que consiste en agentes solubilizantes, hidrotropos, agentes humectantes, espumantes, emulsificantes, emulsionantes y/o detergentes.
- 15 12. Utilización no terapéutica de una composición según la reivindicación 8 o 9 como agente antibacteriano y/o antifúngico.
- 20 13. Surfactante que comprende una composición según la reivindicación 8 o 9.
14. Antibacteriano y/o antifúngico que comprende una composición según la reivindicación 8 o 9.

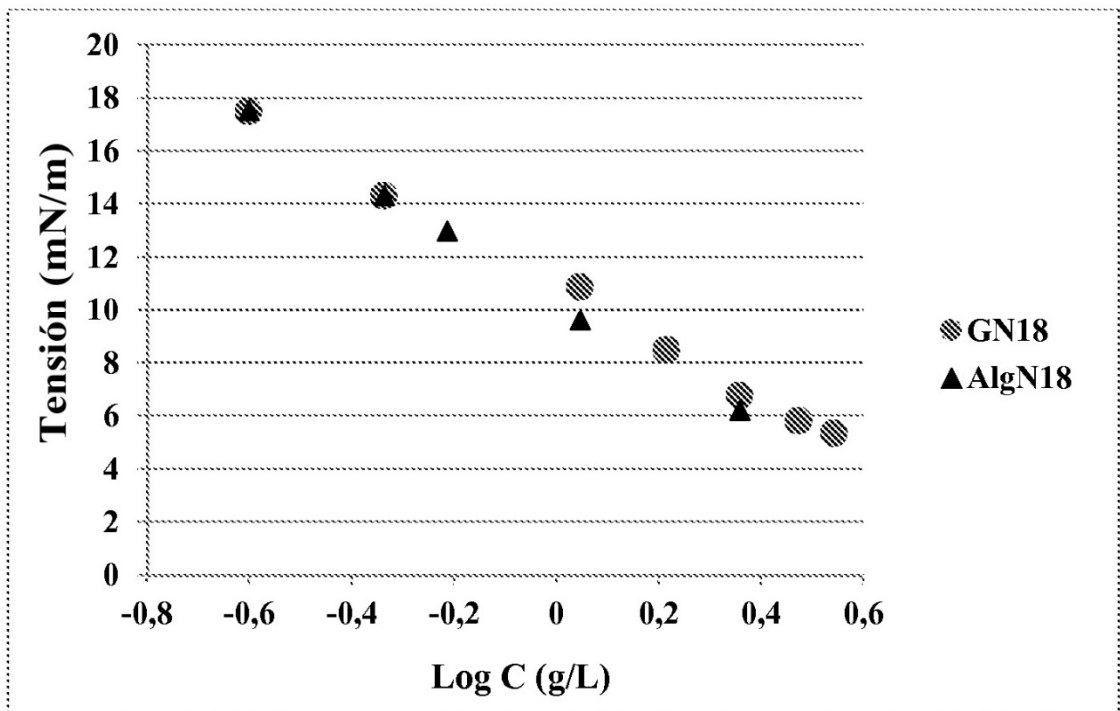
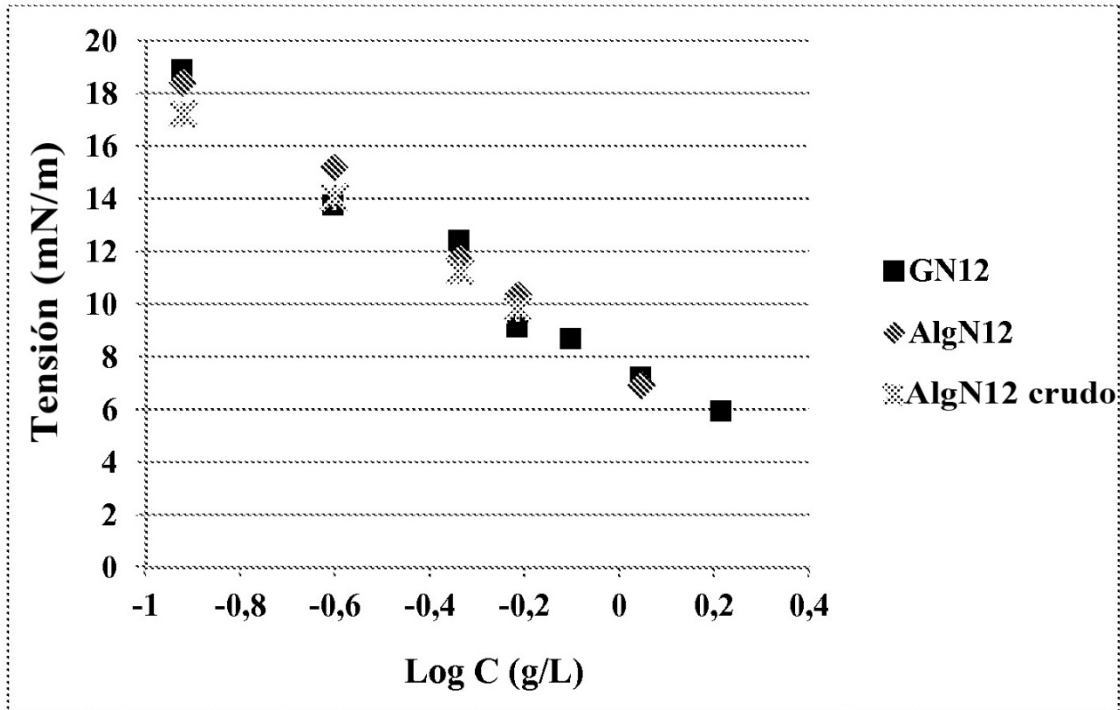


FIGURA 1

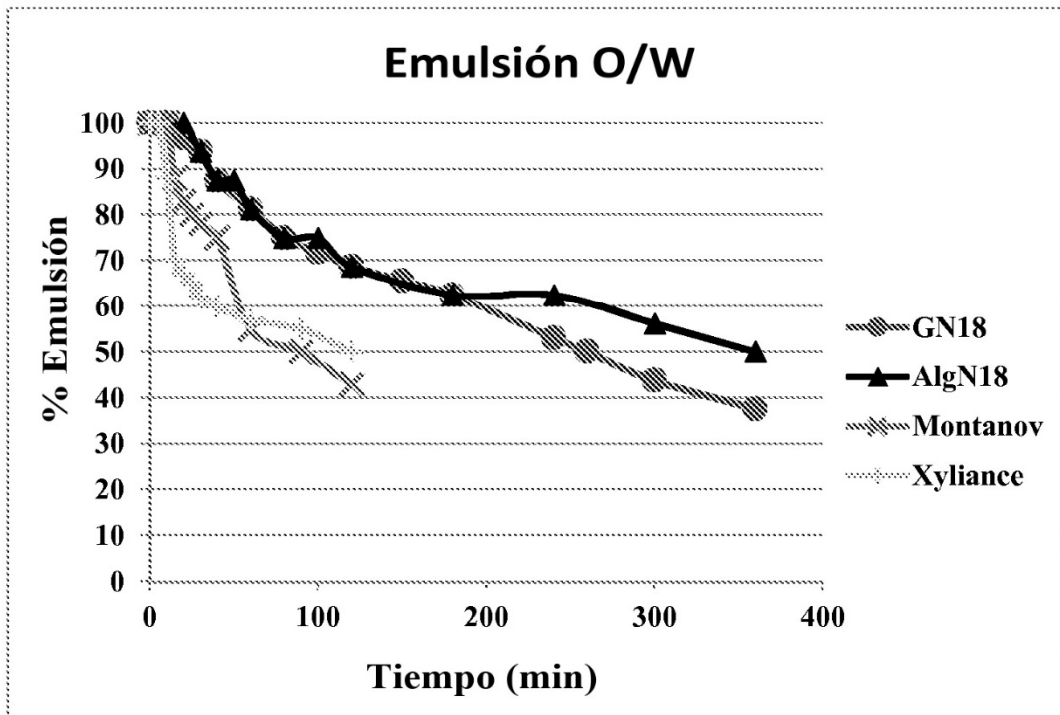
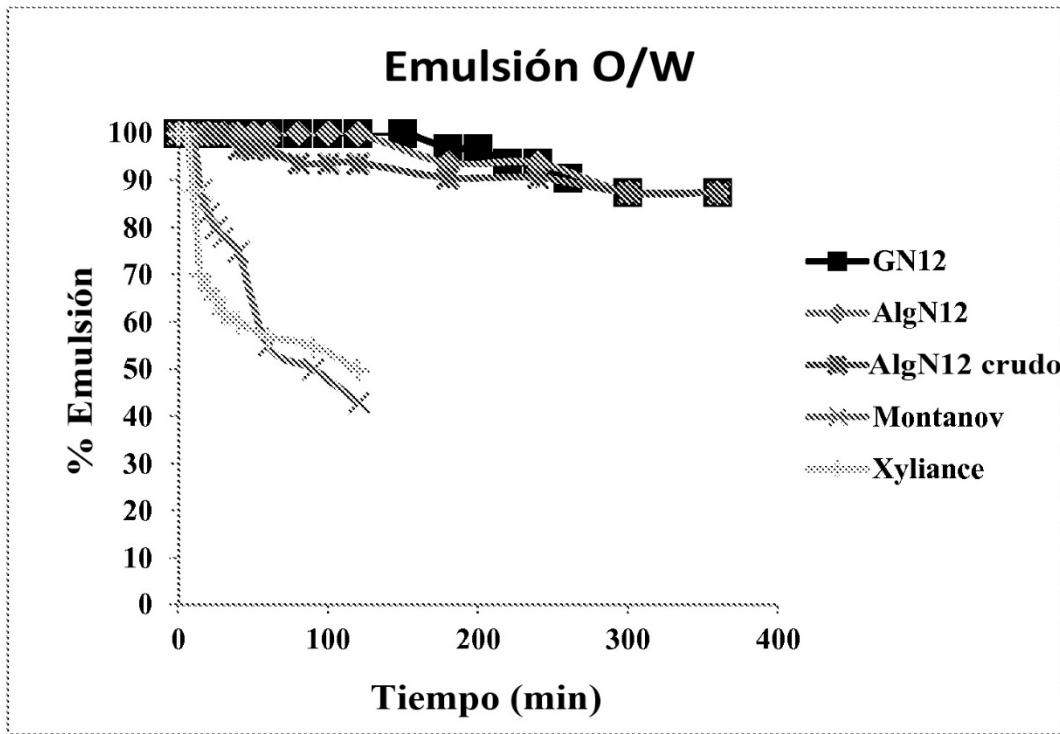


FIGURA 2



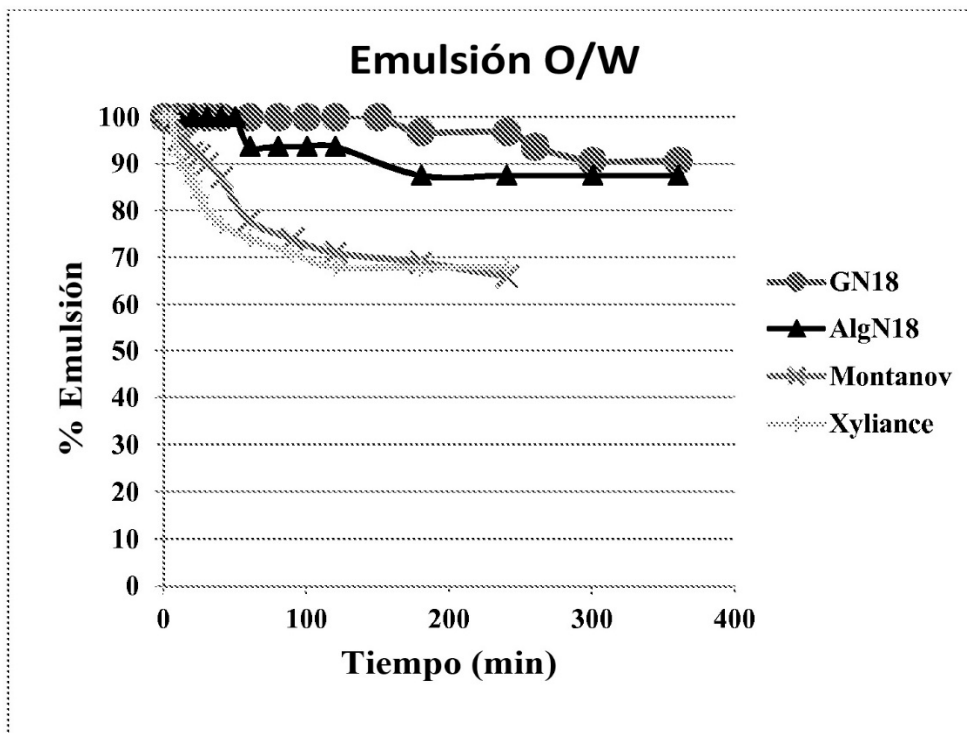
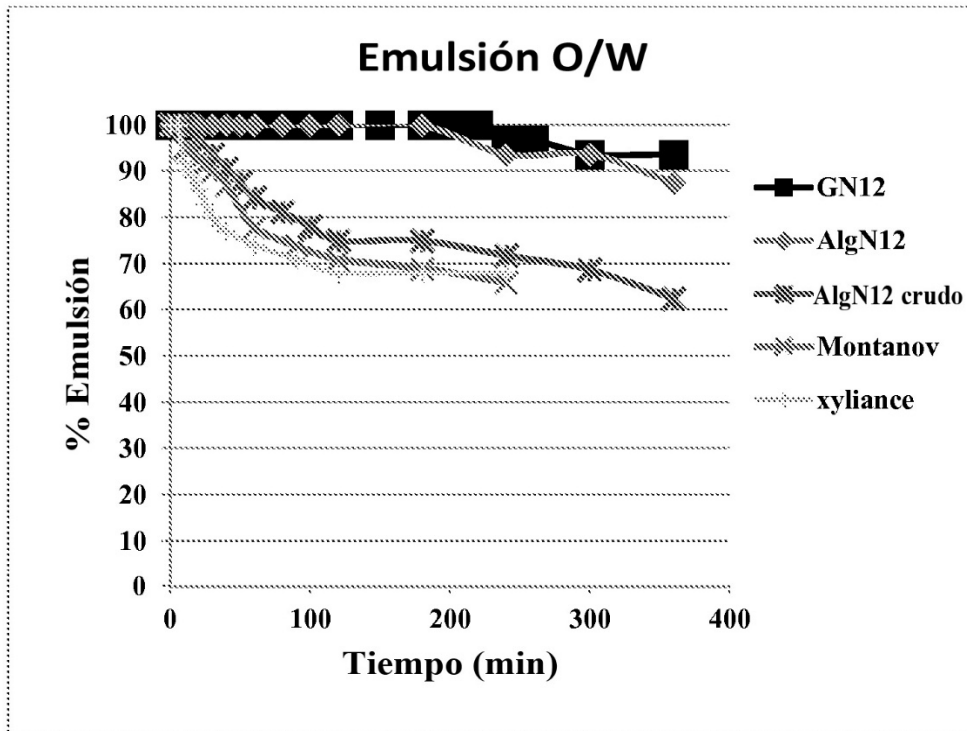


FIGURA 2 (FIN)