

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2016/207464 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
29 de diciembre de 2016 (29.12.2016) **WIPO | PCT**

- (51) **Clasificación Internacional de Patentes:**  
C07D 233/64 (2006.01) A61K 31/4172 (2006.01)  
C11D 1/58 (2006.01)
- (21) **Número de la solicitud internacional:**  
PCT/ES2016/070471
- (22) **Fecha de presentación internacional:**  
23 de junio de 2016 (23.06.2016)
- (25) **Idioma de presentación:** español
- (26) **Idioma de publicación:** español
- (30) **Datos relativos a la prioridad:**  
P 201530919 26 de junio de 2015 (26.06.2015) ES
- (71) **Solicitante:** CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) [ES/ES]; C/ Serrano, 117, 28006 Madrid (ES).
- (72) **Inventores:** PÉREZ MUÑOZ, Lourdes; Instituto De Química Avanzada De Cataluña (iqac), C/ Jorge Girona Salgado, 18-26, 08034 Barcelona (ES). PINAZO GASSOL, Aurora; Instituto De Química Avanzada De Cataluña (iqac), C/ Jorge Girona Salgado, 18-26, 08034 Barcelona (ES). BUSTELO PACHO, Marta; Instituto De Química Avanzada De Cataluña (iqac), C/ Jorge Girona Salgado, 18-26, 08034 Barcelona (ES).
- (74) **Mandatario:** PONS ARIÑO, Ángel; Glorieta de Rubén Darío, 4, 28010 Madrid (ES).
- (81) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) **Title:** CATIONIC SURFACTANTS DERIVED FROM HISTIDINE AMINO ACID

(54) **Título:** TENSIATIVOS CATIONICOS DERIVADOS DEL AMINOÁCIDO HISTIDINA

(57) **Abstract:** The invention relates to compounds derived from histidine amino acid, as well as the pharmaceutical, cosmetic, detergent, food or agrifood compositions thereof, and to the uses of same as surfactants.

(57) **Resumen:** La presente invención se refiere a unos compuestos derivados del aminoácido histidina, además de sus composiciones farmacéuticas, cosméticas, detergentes, alimentarias o agroalimentarias y sus usos como tensioactivos.



**WO 2016/207464 A1**

## TENSIATIVOS CATIÓNICOS DERIVADOS DEL AMINOÁCIDO HISTIDINA

### DESCRIPCIÓN

- 5 La presente invención se refiere a unos compuestos derivados del aminoácido histidina y sus usos como tensioactivos, con actividad antimicrobiana.

### ESTADO DE LA TÉCNICA

- 10 Los tensioactivos constituyen la más amplia gama de productos químicos utilizados a nivel industrial como agentes de limpieza en jabones y detergentes, así como en formulaciones de cosméticos, fármacos, productos alimentarios y en procesos industriales como la petroquímica, cromatografía, análisis de suelos, catálisis, etc. Son sustancias que tienden a disminuir la tensión superficial o interfacial de una interfase  
15 (normalmente aire-agua o grasa-agua), al concentrarse en la superficie e interfase de una solución acuosa modificando las propiedades de la superficie.

- Los tensioactivos derivados de aminoácido son compuestos de elevado interés debido a su multifuncionalidad e inocuidad. Estas características han sido las responsables de  
20 que en los últimos años se haya llevado a cabo la síntesis y estudio de propiedades de una gran variedad de tensioactivos de este tipo, de carácter iónico, catiónico, no iónico y anfótero.

- La combinación de péptidos o aminoácidos polares en la región hidrofílica y de  
25 cadenas hidrocarbonadas de longitud variable (de 8 a 16 átomos de carbono) para formar compuestos con estructuras anfífilas ha dado lugar a moléculas con elevada capacidad tensioactiva (Gizzi, P., et al., 2009 *Eur. J. Org. Chem.* 3953-3963). La amplia diversidad de estructuras con aminoácidos o péptidos y la variedad de residuos grasos presentes en su estructura explican su multiplicidad estructural y sus diferentes  
30 propiedades fisicoquímicas y biológicas.

Por tanto, es de interés la búsqueda de tensioactivos derivados de aminoácido útiles para aplicaciones cosméticas, farmacéuticas o alimentarias.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

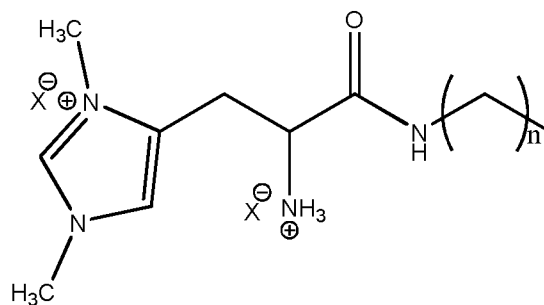
La presente invención proporciona nuevos compuestos con carácter anfifílico y catiónico derivados del aminoácido histidina.

5

Estos compuestos, por poseer en su estructura un grupo amino protonado y un grupo de amonio cuaternario, tienen carácter dicatiónico dependiendo del pH del medio en el que se encuentren disueltos. Han sido diseñados para ser utilizados en la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética como agentes de superficie con capacidad para autoagregarse y con propiedades fisicoquímicas de adsorción y antimicrobianas. Presentan actividad frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y hongos. Debido a que proceden de productos naturales estos compuestos presentan un perfil más adecuado en comparación con otros compuestos anfifílicos catiónicos comerciales debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, y lo más importante, reducida toxicidad.

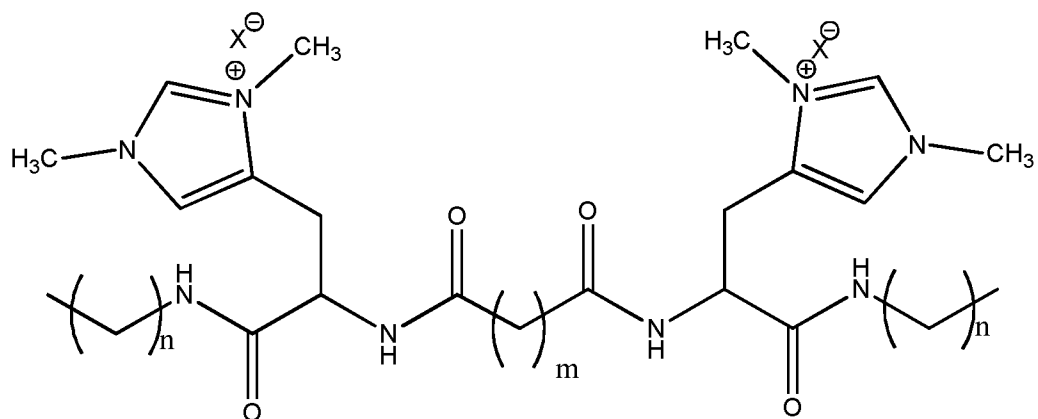
15

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula general (I) o (II)



(I)

20



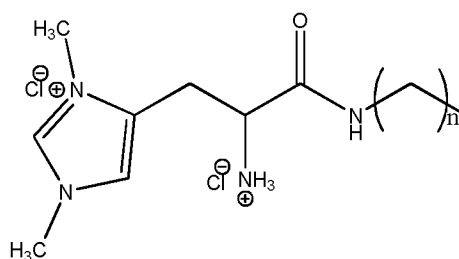
(II)

donde: n es un valor entero de 9 a 15;  
 m es un valor entero de 2 a 6; y  
 X<sup>-</sup> es un contraión.

- 5 El contraión (X<sup>-</sup>) es cualquier anión conocido por un experto en la materia y preferiblemente se puede seleccionar de la lista que comprende un halogenuro, CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ClO<sub>4</sub><sup>-</sup>, CF<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, más preferiblemente el contraión es F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> o I<sup>-</sup> y más preferiblemente es Cl<sup>-</sup>.
- 10 En una realización preferida de los compuestos de fórmula (II) m es 3, 4 o 5, más preferiblemente m es 3.

En una realización más preferida de los compuestos de fórmula (I), X<sup>-</sup> es cloruro y tienen la fórmula (I)

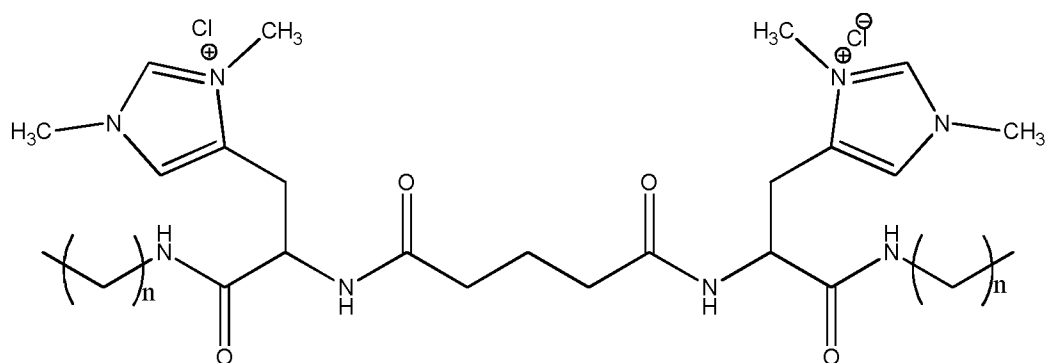
15



(I)

y de los compuestos de fórmula (II), X<sup>-</sup> es cloruro y m es 3, y los compuestos tienen la siguiente fórmula (II)

20



(II)

Los compuestos de fórmula (I) son de estructura lineal, con una cadena grasa y los  
 25 compuestos de fórmula (II) son de estructura geminal, con dos cadenas grasas. En

ambos la parte hidrófila está formada por el aminoácido histidina en la que los dos nitrógenos del anillo imidazolio han sido metilados, y la parte hidrófoba está constituida por una amina grasa unida al grupo carboxilo del aminoácido mediante un enlace amida.

5

Los compuestos de fórmula (I) están formados por un grupo polar consistente en una histidina con el grupo imidazolio dimetilado y con el grupo alfa-amino libre en forma de clorhidrato y un grupo no polar formado por una cadena grasa. Estos compuestos poseen dos cargas catiónicas una situada en el anillo imidazolio y otra sobre el grupo  $\alpha$ -amino protonado del amino ácido. La presencia de la carga catiónica sobre el grupo  $\alpha$ -amino depende del pH del medio en el que se disuelvan los compuestos.

10

Los compuestos de fórmula (II) son dímeros de los de fórmula (I). Estos compuestos reúnen simultáneamente en la misma molécula dos grupos polares y dos grupos no polares unidos entre sí a través de una cadena espaciadora del tipo alquildiamino. Estructuralmente son compuestos simétricos y contienen en la misma molécula dos cadenas hidrocarbonadas saturadas.

15

En una realización preferida de los compuestos de fórmula (I) o (II), n es 9, 11, 13 o 15.

20

Todos los compuestos pertenecientes a ambas familias, fórmula (I) o (II), forman cristales líquidos a altas concentraciones dependiendo de la temperatura el tipo de cristal. A más bajas concentraciones estos compuestos se agregan formando micelas, vesículas/liposomas y geles estructurados.

25

Por tanto, los compuestos de fórmula (I) o (II) son capaces de formar agregados supramoleculares de tipo micelas, vesículas/liposomas, geles, cristales líquidos, emulsiones y microemulsiones en sistemas binarios, ternarios, cuaternarios, cuya tecnología es aplicable a muchos campos industriales, como por ejemplo y sin limitarse a la biorremediación, agricultura, detergentes, cosmética, farmacéutica o alimentación.

30

Otro aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de compuesto de fórmula (I) que comprende la hidrogenación catalítica de un compuesto de fórmula (III):



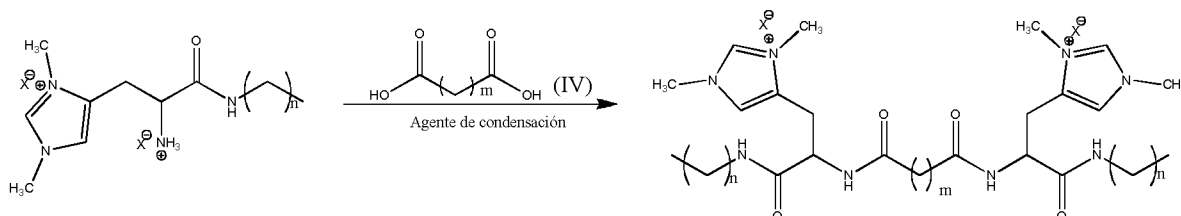
5

(III)

(I)

Donde n y X<sup>-</sup> está definido anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de compuesto de fórmula (II) que comprende la reacción de condensación de un  
10 compuesto de fórmula (I) con un diácido de fórmula (IV) junto con un agente de condensación:



(I)

(II)

15 donde: m, n y X<sup>-</sup> está definido anteriormente.

Cómo agente de condensación se puede utilizar cualquier conocido por un experto en la materia para las reacciones de condensación, como por ejemplo el hexafluorato de  
20 benzotriazol-N-oxi-tris(dimetilamino) fosfonio (BOP) o la dicitohexilcarbodiimida (DCC).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) o (II). Esta composición puede ser cosmética, detergente, farmacéutica, alimentaria o agroalimentaria.

25

Dependiendo de la aplicación, la composición puede estar en forma de polvo, pasta, emulsión o suspensión acuosa.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I) o (II) como agentes tensioactivos y/o antimicrobianos, más preferiblemente estos compuestos presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positiva y Gran negativa.

En una realización más preferida, los compuestos de fórmula (I) presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positiva y Gram negativas, más preferiblemente frente a Gran positivas y más preferiblemente el compuesto de fórmula (I) cuando n es 13. Además, preferiblemente los compuestos de fórmula (I) cuando n es 13 presentan actividad antimicrobiana frente a hongos y levaduras y cuando n es 11, 13 y 15 presentan actividad antimicrobiana frente a levaduras, más preferiblemente frente a *Candida albicans*.

En otra realización más preferida, los compuestos de fórmula (II) cuando n es 9 presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positiva y Gran negativa, cuando n es 11, 13 o 15 presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positiva. Además, preferiblemente los compuestos de fórmula (II) cuando n es 9 presentan actividad antimicrobiana frente a hongos y levaduras, y cuando n es 11, 13 o 15 presentan actividad antimicrobiana frente levaduras, más preferiblemente frente a *Candida albicans*.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I) o (II) como vehículos de moléculas, preferiblemente éstas moléculas pueden ser fármacos, moléculas de origen biológico, colorantes o cualquier tipo de moléculas susceptibles de poder ser encapsuladas dentro de agregados micelares o liposomas.

Los compuestos monocatenarios son sensibles al pH y son estables bajo condiciones fisiológicas por lo que son posibles candidatos a ser utilizados como vehículos de fármacos en diferentes terapias medicinales. Por tanto, una realización preferida comprende el uso de los compuestos de fórmula (I) como vehículos de fármacos, moléculas de origen biológico, colorantes o cualquier tipo de moléculas susceptibles de poder ser encapsuladas dentro de agregados micelares o liposomas.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I) o (II) como conservantes, emulsionantes, espumantes o humectantes.

- 5 Otro aspecto más de la presente invención se refiere al uso de los compuestos de fórmula (I) o (II) para el tratamiento de aguas.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o  
10 pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## 15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIG. 1** Sistema binario DMHNHC<sub>10</sub>/H<sub>2</sub>O. Cristal líquido hexagonal.

**FIG. 2** Sistema binario DMHNHC<sub>12</sub>/H<sub>2</sub>O. Cristal líquido hexagonal en la parte central y  
20 cristal líquido laminar o nemático en la parte superior izquierda.

**FIG. 3** Sistema binario DMHNHC<sub>14</sub>/H<sub>2</sub>O. Formación de geles estructurados.

**FIG. 4** Sistema binario DMHNHC<sub>16</sub>/H<sub>2</sub>O. Cristal líquido nemático en la parte central y  
25 cristal líquido hexagonal en la parte derecha de la imagen.

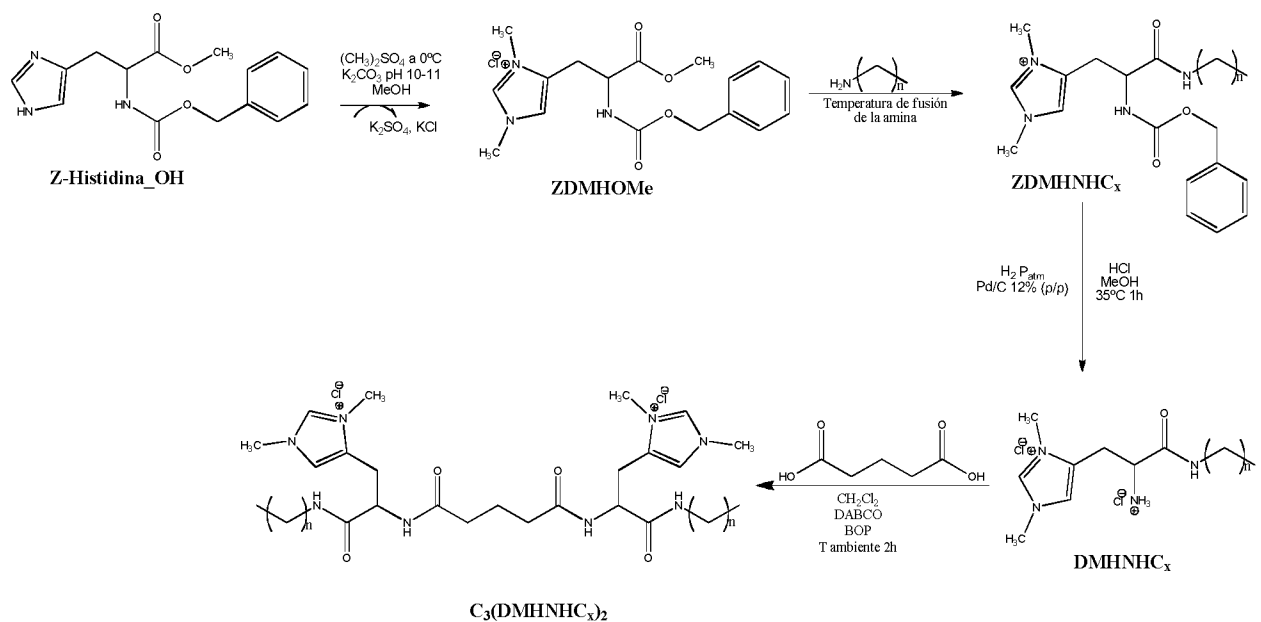
**FIG. 5** Sistemas binarios C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>10</sub>)<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (30–80 °C) (dcha.) y C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>12</sub>)<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (30–85 °C) (izda.).

30 **FIG. 6** Sistemas binarios C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>14</sub>)<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (30–90 °C) (dcha.) y C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>16</sub>)<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O (30–80 °C) (izda.).

## EJEMPLOS

35 La síntesis de los tensioactivos monocatenarios y geminales derivados de histidina se ha llevado a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el esquema 1.





Esquema 1. Procedimiento para la síntesis de tensioactivos monocatenarios y geminales derivados de histidina. Tensioactivos monocatenarios DMHNHC<sub>x</sub>, n=9 DMHNHC<sub>10</sub>, n=11 DMHNHC<sub>12</sub>, n=13 DMHNHC<sub>14</sub>, n=15 DMHNHC<sub>16</sub>. Tensioactivos geminales C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>x</sub>)<sub>2</sub>, n=9 C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>10</sub>)<sub>2</sub>, n=11 C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>12</sub>)<sub>2</sub>, n=13 C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>14</sub>)<sub>2</sub>, n=15 C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>16</sub>)<sub>2</sub>

### Procedimiento general para la obtención de N- $\alpha$ -carbobenciloxi-L-dimetilHistidina metil éster (ZDMHOMe)

- 10 Se disuelven 3 g de N <sup>$\alpha$</sup> -carbobenciloxi -Histidina (N <sup>$\alpha$</sup> -Z-His(OH)) (10,37 mmoles) en 270 mL de metanol (MeOH) y se lleva a pH 10-11 con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH inicial 5,9). A continuación, se enfría la disolución en un baño de hielo a 0 °C y se añaden gota a gota 1,5 mL de (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (15,8 mmoles). Se mantiene la disolución bajo agitación en frío primero durante 1 hora y después a temperatura ambiente durante 4 horas.
- 15 Durante todo el proceso se mantiene el pH en torno a 10-11 con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Finalmente, la disolución se lleva a pH 6 con HCl y se guarda en congelador. El seguimiento de la reacción se monitoriza mediante HPLC. El disolvente y el ácido H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> formado durante la reacción se eliminan por sucesivas evaporaciones al vacío. A continuación se disuelve el producto en etanol seco y se filtra para eliminar las sales producidas
- 20 durante la reacción. El producto obtenido se disuelve en agua y se liofiliza obteniéndose un sólido de color blanco.

- **Datos analíticos y señales espectrales de N<sup>α</sup>-Z-L-dimetilHistidina metil éster (ZDMHOME).**

**Rto.:** 95,39%. **HPLC**,  $t_r = 7.163$  min. **PM:** 443,47 g·mol<sup>-1</sup> / 332,38 g·mol<sup>-1</sup> (sin contracción). **ESI-MS**,  $m/z = 332$  (M+H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>HNMR:**  $\delta_H$ (CD<sub>3</sub>OD), 3.08-3.15 [m, 2H, 1 -CH<sub>2</sub>- de la histidina], 3.67 [s, 3H, -COO-CH<sub>3</sub>], 3.77-3.81 [2s, 6H, 2 -CH<sub>3</sub>, unidos a ambos N de la histidina], 4.56-4.60 [m, 1H, -CH-, de la histidina], 5.03-5.11 [t, 2H, -CH<sub>2</sub>-, grupo Z], 7.31 [s, 1H, -CH-, anillo aromático: histidina], 7.33-7.38 [m, 5H, -CH-, anillo aromático: benceno], 8.76 [s, 1H, -CH-, anillo aromático histidina]. **<sup>13</sup>CNMR:**  $\delta_C$ (CD<sub>3</sub>OD), 26.71 [-CH<sub>2</sub>-, de la histidina], 34.17, 36.51 [-CH<sub>3</sub>-, unidos a ambos N de la histidina], 53.32 [-COO-CH<sub>3</sub>], 55.17 [-CH-, de la histidina], 67.87 [-CH<sub>2</sub>-, grupo Z], 123.11 [-C-, de la histidina], 129.01, 129.23, 129.57, 133.31 [-CH-, anillo aromático], 138.11, 138.42 [-CH-, del anillo aromático de la histidina], 158.34 [-COO-, grupo Z], 172.27 [-COO-CH<sub>3</sub>].

**Procedimiento general para la obtención de N<sup>α</sup>-carbobenciloxi-L-dimetilHistidina alquil amida ZDMHNHC<sub>x</sub> (número de grupos CH<sub>2</sub> en la cadena alquílica = 10 (ZDMHNHC<sub>10</sub>), 12 (ZDMHNHC<sub>12</sub>), 14 (ZDMHNHC<sub>14</sub>), 16 (ZDMHNHC<sub>16</sub>).**

En un matraz de corazón se colocan 5 mmoles de N<sup>α</sup>-carbobenciloxi-L-dimetilHistidina metil éster y se añade sobre ella un exceso de 25 mmoles de la correspondiente amina. Se lleva la temperatura hasta el punto de fusión de la amina. Después de 30 min de agitación, a la misma temperatura, el porcentaje de conversión del reactivo inicial es superior al 99%. Se deja enfriar la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente. El exceso de amina se elimina mediante cristalizaciones en metanol/ACN (acetonitrilo) y el producto se purifica mediante cromatografía líquida preparativa o cromatografía de intercambio iónico.

La identificación de estos compuestos se lleva a cabo mediante HPLC, espectroscopia de masas y resonancia magnética nuclear de protón y carbono 13.

#### **Datos analíticos y señales espectrales de ZDMHNHC<sub>16</sub> (n = 16)**

A modo de ejemplo se describen los resultados obtenidos para el compuesto con una cadena alquílica de 16 grupos metileno.

**Rto.:** 100%. **HPLC**,  $HPLC_{tr} = 13,450$  min. **PM:** 479,58 g·mol<sup>-1</sup> (contracción TFA). **ESI-MS**,  $m/z = 407$  (M-H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>HNMR:**  $\delta_H$ (CD<sub>3</sub>OD), 0.88-0.92 [t, 3H, -CH<sub>3</sub>-, cadena alquílica], 1.03-1.65 [m, 28H, -CH<sub>2</sub>-, cadena alquílica], 2.96-3.03 [2H, -CH<sub>2</sub>-], 3.12-3.25 [m, 4H, -

CH<sub>2</sub> unido a la histidina, CONH-CH<sub>2</sub>], 3.78-3.82 [2s, 6H, 2 -CH<sub>3</sub>, unidos a ambos N de la histidina], 4.42-4.45 [m, 1H, -CH-, de la histidina], 5.00-5.12 [dd, 2H, -CH<sub>2</sub>-, grupo Z], 7.27-7.28 [d, 6H, -CH-, anillo aromático benceno y de la histidina], 8.75 [s, 1H, -CH-, anillo aromático: de la histidina]. <sup>13</sup>CNMR: δ<sub>C</sub>(CD<sub>3</sub>OD), 14.44 [-CH<sub>3</sub>-, cadena alquílica], 23.73, 27.25, 27.96, 30.32, 30.43, 30.47, 30.70, 30.73, 30.76, 30.78, 33.07, [-CH<sub>2</sub>-, cadena alquílica], 34.00, 36.32 [-CH<sub>3</sub>-, unidos a ambos N de la histidina], 40.65 [-CH<sub>2</sub>-CONH-], 54.51 [-CH-, de la histidina], 67.85 [-CH<sub>2</sub>-, grupo Z], 123.08 [-CH-, anillo aromático: de la histidina], 129.05, 129.21, 129.53 [-CH-, anillo aromático del grupo Z], 133.47 [-C-, del anillo aromático de la histidina], 138.07 [-C-, anillo aromático del grupo Z], , 138.28 [-CH-, del anillo aromático de la histidina], 158.15 [-COO-, grupo Z], 171.94 [-CO-NH-].

**Procedimiento general para la obtención de dimetilHistidina alquil amida, DMHNHC<sub>x</sub>, (número de grupos CH<sub>2</sub> en la cadena alquílica = 10 (DMHNHC<sub>10</sub>), 12 (DMHNHC<sub>12</sub>), 14 (DMHNHC<sub>14</sub>), 16 (DMHNHC<sub>16</sub>) como sales clorhidratadas**

Los tensioactivos monocatenarios DMHNHC<sub>10</sub>, DMHNHC<sub>12</sub>, DMHNHC<sub>14</sub> y DMHNHC<sub>16</sub> se obtienen mediante hidrogenación catalítica del correspondiente N-α-carbobenciloxi-L-dimetilHistidina alquil amida. Para cada compuesto, se disuelve 1 g de producto en 50 mL de MeOH y se añade como catalizador Pd/C al 12 % (p/p). Se deja reaccionar a P<sub>atm</sub> (presión atmosférica) de H<sub>2</sub> durante 1 h, bajo agitación magnética y a una temperatura de 30 °C. Después de dos horas de reacción, se filtra la solución sobre un lecho de Celite® con el objetivo de eliminar el catalizador y la fracción líquida se acidifica con HCl (3 mol) obteniéndose los productos finales como sales clorhidratadas. Finalmente se rotavaporan todos los tensioactivos, tras lo cual se disuelven en agua y se liofilizan. Se obtienen polvos blancos higroscópicos.

**Datos analíticos y señales espectrales de los compuestos tipo DimetilHistidina alquil amida**

**DimetilHistidina palmitoil amida (DMHNHC<sub>16</sub>).**

Rto.: 96,72%. HPLC, tr = 16,5min. PM: 479,58 g·mol<sup>-1</sup> (contraiones cloruro). ESI-MS, m/z = 407 (M-H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>HNMR: δ<sub>H</sub>(CD<sub>3</sub>OD), 0.88-0.92 [t, 3H, -CH<sub>3</sub>-, cadena alquílica], 1.04-1.67 [m, 28H, -CH<sub>2</sub>-, cadena alquílica], 3.26-3.29 [m, 4H, -CH<sub>2</sub> de la histidina y -CH<sub>2</sub>-CONH- ], 3.89-3.90 [2s, 6H, 2 -CH<sub>3</sub>, unidos a ambos N de la histidina], 4.17-4.21 [m, 1H, -CH-, de la histidina], 7.51 [s, H, -CH-, anillo aromático: de la histidina], 8.92 [s, 1H, -CH-, anillo aromático: de la histidina]. <sup>13</sup>CNMR: δ<sub>C</sub>(CD<sub>3</sub>OD), 14.4 [-CH<sub>3</sub>-, cadena

alquílica], 23.7 a 33.6 [grupos  $-\text{CH}_2-$  de la cadena alquílica], 34.3, 36.5 [ $-\text{CH}_3-$ , unidos a ambos N de la histidina], 40.8  $-\text{CONH}-[\text{CH}_2]$ , 52.6 [ $-\text{CH}-$ , de la histidina], 124.4 [ $\text{CH}$ -, anillo aromático: de la histidina], 130.3 [ $-\text{C}-$ , del anillo aromático: de la histidina], 139.2 [ $-\text{CH}-$ , del anillo aromático de la histidina], 168.2 [ $-\text{CO}-\text{NH}-$ ].

5 **DimetilHistidina miristoil amida (DMHNHC<sub>14</sub>).**

**Rto.:** 94,62%. **HPLC**, tr = 15,2 min. **PM:** 451,52g·mol<sup>-1</sup> (contraiones cloruro). **ESI-MS**, m/z = 379 (M-H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>HNMR:**  $\delta_{\text{H}}(\text{CD}_3\text{OD})$ , 0.88-0.90 [t, 3H,  $-\text{CH}_3-$ , cadena alquílica], 1.04-1.67 [m, 24H,  $-\text{CH}_2-$ , cadena alquílica], 3.13-3.22 [m, 4H,  $-\text{CH}_2$  de la histidina y  $-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ ], 3.89-3.85 [2s, 6H, 2  $-\text{CH}_3$ , unidos a ambos N de la histidina], 4.17-4.21 [m, 1H,  $-\text{CH}-$ , de la histidina], 7.55 [s, H,  $-\text{CH}-$ , anillo aromático: de la histidina], 8.89 [s, 1H,  $-\text{CH}-$ , anillo aromático: de la histidina]. **<sup>13</sup>CNMR:**  $\delta_{\text{C}}(\text{CD}_3\text{OD})$ , 14.44 [ $-\text{CH}_3-$ , cadena alquílica], 23.7 a 34.6 [grupos  $-\text{CH}_2-$  de la cadena alquílica], 34.4, 36.5 [ $-\text{CH}_3-$ , unidos a ambos N de la histidina], 40.7  $-\text{CONH}-[\text{CH}_2]$ , 52.6 [ $-\text{CH}-$ , de la histidina], 124.4 [ $\text{CH}$ -, anillo aromático: de la histidina], 130.3 [ $-\text{C}-$ , del anillo aromático: de la histidina], 139.2 [ $-\text{CH}-$ , del anillo aromático de la histidina], 168.2 [ $-\text{CO}-\text{NH}-$ ].

**DimetilHistidina lauroil amida (DMHNHC<sub>12</sub>).**

**Rto.:** 95,3%. **HPLC**, tr =13,2 min. **PM:** 423,47 g·mol<sup>-1</sup> (contraiones cloruro). **ESI-MS**, m/z = 351 (M-H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>HNMR:**  $\delta_{\text{H}}(\text{CD}_3\text{OD})$ , 0.75-0.90 [t, 3H,  $-\text{CH}_3-$ , cadena alquílica], 1.04-1.59 [m, 20H,  $-\text{CH}_2-$ , cadena alquílica], 3.15-3.32 [m, 4H,  $-\text{CH}_2$  de la histidina y  $-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ ], 3.85-3.80 [2s, 6H, 2  $-\text{CH}_3$ , unidos a ambos N de la histidina], 4.20-4.24 [m, 1H,  $-\text{CH}-$ , de la histidina], 7.55 [s, H,  $-\text{CH}-$ , anillo aromático: de la histidina], 8.91 [s, 1H,  $-\text{CH}-$ , anillo aromático: de la histidina]. **<sup>13</sup>CNMR:**  $\delta_{\text{C}}(\text{CD}_3\text{OD})$ , 14.4 [ $-\text{CH}_3-$ , cadena alquílica], 23.5 a 34.7 [grupos  $-\text{CH}_2-$  de la cadena alquílica], 34.4, 36.5 [ $-\text{CH}_3-$ , unidos a ambos N de la histidina], 40.7 [ $-\text{CONH}-\text{CH}_2$ ], 52.6 [ $-\text{CH}-$ , de la histidina], 124.7 [ $-\text{CH}-$ , anillo aromático: de la histidina], 130.1 [ $-\text{C}-$ , del anillo aromático: de la histidina], 139.2 [ $-\text{CH}-$ , del anillo aromático de la histidina], 168.9 [ $-\text{CO}-\text{NH}-$ ].

**DimetilHistidina decanoil amida (DMHNHC<sub>10</sub>)**

**Rto.:** 95,3%. **HPLC**, tr =11,2 min. **PM:** 395,41g·mol<sup>-1</sup> (contraiones cloruro). **ESI-MS**, m/z = 323 (M-H)<sup>+</sup>. **<sup>1</sup>HNMR:**  $\delta_{\text{H}}(\text{CD}_3\text{OD})$ , 0.75-0.90 [t, 3H,  $-\text{CH}_3-$ , cadena alquílica], 1.04-1.59 [m, 20H,  $-\text{CH}_2-$ , cadena alquílica], 3.15-3.32 [m, 4H,  $-\text{CH}_2$  de la histidina y  $-\text{CH}_2-\text{CONH}-$ ], 3.85-3.80 [2s, 6H, 2  $-\text{CH}_3$ , unidos a ambos N de la histidina], 4.20-4.24 [m, 1H,  $-\text{CH}-$ , de la histidina], 7.55 [s, H,  $-\text{CH}-$ , anillo aromático: de la histidina], 8.91 [s,

1H, -CH-, anillo aromático: de la histidina]. <sup>13</sup>CNMR: δ<sub>C</sub>(CD<sub>3</sub>OD), 14.4 [-CH<sub>3</sub>-, cadena alquílica], 23.5 a 34.7 [grupos -CH<sub>2</sub>- de la cadena alquílica], 34.4, 36.5 [-CH<sub>3</sub>-, unidos a ambos N de la histidina], 40.7 [-CONH-CH<sub>2</sub>], 52.6 [-CH-, de la histidina], 124.7 [-CH-, anillo aromático: de la histidina], 130.1 [-C-, del anillo aromático: de la histidina], 139.2 [-CH-, del anillo aromático de la histidina], 168.9 [-CO-NH-].

**Síntesis química de tensioactivos geminales derivados de la histidina**  
**C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>x</sub>) (número de grupos CH<sub>2</sub> en la cadena alquílica = 10 C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>10</sub>)<sub>2</sub>, 12 C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>12</sub>)<sub>2</sub>, 14 C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>14</sub>)<sub>2</sub>, 16 C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>16</sub>)<sub>2</sub>**

Los tensioactivos geminales de histidina se han preparado a partir del correspondiente monocatenario dimetilHistidina alquil amida. La reacción consiste en la condensación de una molécula de tensioactivo monocatenario dimetilHistidina alquil amida a cada uno de los grupos carboxílicos del ácido glutámico.

El método seguido para sintetizar el compuesto geminal de cadena de 16 grupos metileno es el siguiente. Se disuelven 0,6 mmoles de DMHNHC<sub>16</sub> en 20 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se añaden 1,8 mmoles de la base 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) y 0,3 mmoles de ácido glutámico. Se agita la disolución hasta la solubilización total de los reactivos, momento en el que se adicionan 0,6 mmoles de hexafluorato de benzotriazol-N-oxi-tris(dimetilamino) fosfonio (BOP). La mezcla se deja reaccionar a temperatura ambiente y bajo agitación durante 2 horas. A continuación se reduce el volumen de reacción a la mitad y se procede a añadir éter etílico (15-20 mL), apareciendo un sólido blanco que precipita. Se deja en nevera durante ocho horas y se filtra el sólido, se lava sucesivas veces con éter etílico y se seca en desecador con P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Mediante estas cristalizaciones se obtiene el compuesto con una pureza del 90%. Con el fin de obtener compuestos con purezas superiores al 99% se lleva a cabo HPLC preparativa. Una vez purificado se disuelve en agua y se liofiliza. Se obtienen polvos blancos muy higroscópicos.

**Datos analíticos y señales espectrales de los tensioactivos geminales derivados de histidina**

**C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>16</sub>)<sub>2</sub>** Rto.: 85%. HPLC, tr = 16,4 min. PM: 983,33 g·mol<sup>-1</sup> (contraiones cloruro). ESI-MS, m/z = 455 (M-H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>HNMR: δ<sub>H</sub>(CD<sub>3</sub>OD), 0.88-0.92 [t, 6H, -CH<sub>3</sub>-, cadena alquílica], 1.05-1.64 [m, -CH<sub>2</sub>-, cadena alquílica], 1.77-1.87 [m, 2H, -CH<sub>2</sub>-,

cadena espaciadora posición intermedia], 2.13-2.30 [m, 4H,  $-\text{CH}_2-$ , cadena espaciadora posición 1 y 3], 2.93-3.10 [m, 4H,  $\text{CONH}-\text{CH}_2-$ ], 3.12-3.28 [m, 4H,  $-\text{CH}_2$  de la histidina], 3.87-3.89 [12H, 4  $-\text{CH}_3$ , unidos a ambos N de la histidina], 4.59-4.69 [m, 2H,  $-\text{CH}-$ , de la histidina], 7.34-7.40 [m, 2H,  $-\text{CH}-$ , anillo aromático: de la histidina],  
 5 8.81-8.33 [s, 2H,  $-\text{CH}-$ , anillo aromático: de la histidina].  $^{13}\text{CNMR}$ :  $\delta_{\text{C}}(\text{CD}_3\text{OD})$ , 14.4 [ $-\text{CH}_3-$ , cadena alquílica], 19.3-34.1 [ $-\text{CH}_2-$ , cadena alquílica y cadena espaciadora], 36.3, 36.4 [ $-\text{CH}_3-$ , unidos a ambos N de la histidina], 40.7, 40.7 [ $\text{CONH}-\text{CH}_2-$ ], 52.6, 52.8 [ $-\text{CH}-$ , de la histidina], 123.0, 123.1 [ $-\text{CH}-$ , anillo aromático: de la histidina], 133.3, 133.3 [ $-\text{C}-$ , del anillo aromático: de la histidina], 138.4, 138.4 [ $-\text{CH}-$ , del anillo  
 10 aromático de la histidina], 171.7, 172.3 [ $\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$ ], 175.3, 175.4 [ $\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$ ].

**C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>14</sub>)<sub>2</sub>** Rto.: 86%. HPLC, tr = 15,2 min. PM: 927,22g·mol<sup>-1</sup> (contraiones cloruro). ESI-MS, m/z = 427 (M-H)<sup>+</sup>.  $^1\text{HNMR}$ :  $\delta_{\text{H}}(\text{CD}_3\text{OD})$ , 0.82-0.88 [t, 6H,  $-\text{CH}_3-$ , cadena alquílica], 1.07-1.67 [m,  $-\text{CH}_2-$ , cadena alquílica], 1.75-1.87 [m, 2H,  $-\text{CH}_2-$ , cadena espaciadora posición intermedia], 2.13-2.33 [m, 4H,  $-\text{CH}_2-$ , cadena espaciadora posición 1 y 3], 2.93-3.10 [m, 4H,  $\text{CONH}-\text{CH}_2-$ ], 3.14-3.27 [m, 4H,  $-\text{CH}_2$  de la histidina], 3.83-3.85 [12H, 4  $-\text{CH}_3$ , unidos a ambos N de la histidina], 4.59-4.69 [m, 2H,  $-\text{CH}-$ , de la histidina], 7.34-7.41 [m, 2H,  $-\text{CH}-$ , anillo aromático: de la histidina],  
 15 8.81-8.32 [s, 2H,  $-\text{CH}-$ , anillo aromático: de la histidina].  $^{13}\text{CNMR}$ :  $\delta_{\text{C}}(\text{CD}_3\text{OD})$ , 14.4 [ $-\text{CH}_3-$ , cadena alquílica], 19.1-34.8 [ $-\text{CH}_2-$ , cadena alquílica y cadena espaciadora], 36.5, 36.9 [ $-\text{CH}_3-$ , unidos a ambos N de la histidina], 40.6, 40.9 [ $\text{CONH}-\text{CH}_2-$ ], 52.6, 52.6 [ $-\text{CH}-$ , de la histidina], 123.3, 123.5 [ $-\text{CH}-$ , anillo aromático: de la histidina], 133.3, 133.5 [ $-\text{C}-$ , del anillo aromático: de la histidina], 138.4, 138.4 [ $-\text{CH}-$ , del anillo  
 20 aromático de la histidina], 171.8, 172.3 [ $\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-$ ], 175.4, 175.5 [ $\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-$ ].

**C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>12</sub>)<sub>2</sub>** Rto.: 83%. HPLC, tr =13,7 min. PM: 871,11g·mol<sup>-1</sup> (contraiones cloruro). ESI-MS, m/z = 399 (M-H)<sup>+</sup>.  $^1\text{HNMR}$ :  $\delta_{\text{H}}(\text{CD}_3\text{OD})$ , 0.84-0.87 [t, 6H,  $-\text{CH}_3-$ , cadena alquílica], 1.10-1.69 [m,  $-\text{CH}_2-$ , cadena alquílica], 1.73-1.87 [m, 2H,  $-\text{CH}_2-$ , cadena espaciadora posición intermedia], 2.16-2.36 [m, 4H,  $-\text{CH}_2-$ , cadena espaciadora posición 1 y 3], 2.93-3.14 [m, 4H,  $\text{CONH}-\text{CH}_2-$ ], 3.12-3.22 [m, 4H,  $-\text{CH}_2$  de la histidina], 3.83-3.85 [12H, 4  $-\text{CH}_3$ , unidos a ambos N de la histidina], 4.59-4.69 [m, 2H,  $-\text{CH}-$ , de la histidina], 7.34-7.41 [m, 2H,  $-\text{CH}-$ , anillo aromático: de la histidina],  
 25 8.81-8.32 [s, 2H,  $-\text{CH}-$ , anillo aromático: de la histidina].  $^{13}\text{CNMR}$ :  $\delta_{\text{C}}(\text{CD}_3\text{OD})$ , 14.4 [ $-\text{CH}_3-$ , cadena alquílica], 19.0-34.8 [ $-\text{CH}_2-$ , cadena alquílica y cadena espaciadora], 36.4, 36.9 [ $-\text{CH}_3-$ , unidos a ambos N de la histidina], 40.6, 40.9 [ $\text{CONH}-\text{CH}_2-$ ], 52.6, 52.6 [ $-\text{CH}-$ , de la histidina], 123.3, 123.5 [ $-\text{CH}-$ , anillo aromático: de la histidina], 133.4,  
 30

133.5 [C-, del anillo aromático: de la histidina], 138.4, 138.4 [CH-, del anillo aromático de la histidina], 171.8, 172.3 [CH-CO-NH-], 175.4, 175.4 [CH<sub>2</sub>-CO-NH-].

**C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>10</sub>)<sub>2</sub>** Rto.: 87%. HPLC, tr =12,3 min. PM: 815,00 g·mol<sup>-1</sup> (contraiones cloruro). ESI-MS, m/z = 371 (M-H)<sup>+</sup>. <sup>1</sup>HNMR: δ<sub>H</sub>(CD<sub>3</sub>OD), 0.85-0.90 [t, 6H, -CH<sub>3</sub>-, cadena alquílica], 1.15-1.73 [m, -CH<sub>2</sub>-, cadena alquílica], 1.75-1.90 [m, 2H, -CH<sub>2</sub>-, cadena espaciadora posición intermedia], 2.16-2.34 [m, 4H, -CH<sub>2</sub>-, cadena espaciadora posición 1 y 3], 2.96-3.20 [m, 4H, CONH- CH<sub>2</sub>-], 3.12-3.20 [m, 4H, -CH<sub>2</sub> de la histidina], 3.80-3.85 [12H, 4 -CH<sub>3</sub>, unidos a ambos N de la histidina], 4.59-4.72 [m, 2H, -CH-, de la histidina], 7.35-7.41 [m, 2H, -CH-, anillo aromático: de la histidina], 8.83-8.32 [s, 2H, -CH-, anillo aromático: de la histidina]. <sup>13</sup>CNMR: δ<sub>C</sub>(CD<sub>3</sub>OD), 14.4 [-CH<sub>3</sub>-, cadena alquílica], 19.0-34.6 [-CH<sub>2</sub>-, cadena alquílica y cadena espaciadora], 36.3, 36.8 [-CH<sub>3</sub>-, unidos a ambos N de la histidina], 40.6, 40.9 [CONH-CH<sub>2</sub>-], 52.6, 52.6 [-CH-, de la histidina], 123.3, 123.5 [-CH-, anillo aromático: de la histidina], 133.4, 133.5 [C-, del anillo aromático: de la histidina], 138.4, 138.4 [-CH-, del anillo aromático de la histidina], 171.9, 172.3 [CH-CO-NH-], 175.4, 175.5 [CH<sub>2</sub>-CO-NH-].

#### **Propiedades fisicoquímicas de tensioactivos catiónicos derivados de histidina**

A continuación se exponen los resultados obtenidos que demuestran que los compuestos sintetizados disminuyen la tensión superficial y se autoagregan en disolución acuosa.

#### **Determinación de la concentración micelar crítica**

La concentración micelar crítica (CMC) es la concentración mínima de tensioactivo para que se produzca la autoagregación en disolución. A partir de la CMC el valor de la tensión entre interfaces permanece constante. El valor de CMC es característico para cada compuesto.

La CMC se determinó utilizando tres técnicas diferentes: tensión superficial, conductividad y agregación del contraion Cl<sup>-</sup>. Los valores obtenidos se muestran en las Tablas 1 y 2. Los valores obtenidos con las tres técnicas son del mismo orden de magnitud para todos los productos estudiados. Estos resultados demuestran que los valores obtenidos son una verdadera concentración micelar crítica pudiéndose descartar artefactos de medición. Los valores de CMC disminuyen al aumentar la longitud de la cadena hidrófoba. El orden de magnitud de las CMC es el mismo que el de tensioactivos catiónicos comerciales de igual longitud de cadena hidrocarbonada.

Tabla 1. Valores de pKa y CMC de tensioactivos lineales derivados del aminoácido histidina.

	pKa	CMC (mM)		
		Tensión superficial ( $\gamma$ )	Conductividad ( $\kappa$ )	Iones cloruro ( $\text{Cl}^-$ )
DMHNHC <sub>10</sub>	6,1	15,54	12,06	19,10
DMHNHC <sub>12</sub>	6,2	6,23	5,39	4,95
DMHNHC <sub>14</sub>	6,2	1,51	2,77	2,83
DMHNHC <sub>16</sub>	5,5	0,37	0,88	0,67

5 Tabla 2. Valores de CMC de tensioactivos geminales derivados del aminoácido histidina.

	CMC (mM)		
	Tensión superficial ( $\gamma$ )	Conductividad ( $\kappa$ )	Iones cloruro ( $\text{Cl}^-$ )
C <sub>3</sub> (DMHNHC <sub>10</sub> ) <sub>2</sub>	0,72	0,26	0,30
C <sub>3</sub> (DMHNHC <sub>12</sub> ) <sub>2</sub>	0,27	0,15	0,20
C <sub>3</sub> (DMHNHC <sub>14</sub> ) <sub>2</sub>	0,031	0,11	0,16
C <sub>3</sub> (DMHNHC <sub>16</sub> ) <sub>2</sub>	0,016	0,06	0,10

### Comportamiento fásico

10 Se estudió el comportamiento fásico mediante el método conocido como "método de penetración", un método cualitativo que se utiliza para la detección de cristales líquidos. El método consiste en depositar una pequeña cantidad del compuesto a estudiar sobre un portaobjetos y añadir una pequeña cantidad de agua en uno de los extremos de la muestra de tal manera que se produzca in situ un gradiente de concentraciones. Se observa el gradiente de concentraciones con un microscopio de luz polarizada. (FIGs. 1-6).



Tabla 3. Tipo de cristal líquido observado e intervalo de temperaturas estudiados

Compuesto	Tipo de Cristal Líquido	Temperatura
C <sub>3</sub> (DMHNHC <sub>10</sub> ) <sub>2</sub>	Hexagonal	50 – 80 °C
C <sub>3</sub> (DMHNHC <sub>12</sub> ) <sub>2</sub>	Hexagonal	50 – 85 °C
C <sub>3</sub> (DMHNHC <sub>14</sub> ) <sub>2</sub>	Hexagonal	50 – 90 °C
C <sub>3</sub> (DMHNHC <sub>16</sub> ) <sub>2</sub>	Hexagonal	50 – 80 °C

### Propiedades biológicas

#### Actividad antimicrobiana

- 5 La determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) se basa en poner en contacto los microorganismos seleccionados con diferentes concentraciones de agente antimicrobiano, en nuestro caso los tensioactivos objeto de estudio. Tras el tiempo de incubación considerado, se observa a que concentraciones se ha producido crecimiento. La concentración a partir de la cual no hay crecimiento de los
- 10 microorganismos se conoce como MIC.

Tabla 4. Concentraciones mínimas inhibitorias de tensioactivos monocatenarios derivados del aminoácido histidina.

	DMHNHC <sub>10</sub>	DMHNHC <sub>12</sub>	DMHNHC <sub>14</sub>	DMHNHC <sub>16</sub>
Gram positivas	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	256	32	16	32
<i>Bacillus subtilis</i> AtCC 6633	128	16	16	32
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	256	32	8	16
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	>256*	64	16	32

<b>Gram negativas</b>				
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	>256*	>256*	64	128
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>256*	256	64	128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>256*	>256*	128	>256*

>256\*: Microorganismo resistente a los compuestos a las concentraciones ensayadas.

Los tensioactivos monocatenarios derivados de histidina son más activos frente a las bacterias Gram positivas que frente a las Gram negativas y de entre ellos el más activo es el compuesto **DMHNHC<sub>14</sub>**. Los resultados obtenidos demuestran que la actividad de los productos es fruto del balance hidrófilo-hidrófobo de la molécula así, al aumentar la longitud de la cadena grasa, aumenta la actividad, alcanzándose un máximo para el compuesto **DMHNHC<sub>14</sub>**.

La actividad antimicrobiana que presentan los nuevos compuestos desarrollados es comparable a la que presentan tensioactivos catiónicos comerciales no derivados de aminoácidos de igual longitud de cadena hidrófoba.

Tabla 5. Concentraciones mínimas inhibitorias de tensioactivos geminales derivados del aminoácido histidina.

	<b>C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>10</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>12</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>14</sub>)<sub>2</sub></b>	<b>C<sub>3</sub>(DMHNHC<sub>16</sub>)<sub>2</sub></b>
<b>Gram positivas</b>	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	4	16	32	>256
<i>Bacillus subtilis</i> AtCC 6633	8	64	16	32
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	256	32	256	>256
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	8	32	64	>256
<b>Gram negativas</b>				
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	32	256	>256	>256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8	64	>256	>256

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	64	>256	>256	>256
--	----	------	------	------

El compuesto  $C_3(DMHNHC_{10})_2$  es activo tanto para bacterias Gram positivas como para bacterias Gram negativas. Los compuestos  $C_3(DMHNHC_{12})_2$ ,  $C_3(DMHNHC_{14})_2$  y  $C_3(DMHNHC_{16})_2$ , de la misma forma que los tensioactivos lineales son más activos frente a bacterias Gram positivas que frente a bacterias Gram negativas. La actividad de estos compuestos es similar a la descrita para tensioactivos geminales derivados de amonio cuaternario conocidos como bisQuats.

#### Actividad antifúngica.

La actividad antifúngica se determina de la misma forma que la actividad antimicrobiana. En las tablas 6 y 7 se muestran los valores obtenidos de CMI.

Tabla 6. Actividad antifúngica de tensioactivos lineales derivados de histidina.

	DMHNHC <sub>10</sub>	DMHNHC <sub>12</sub>	DMHNHC <sub>14</sub>	DMHNHC <sub>16</sub>
Hongos	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
<i>Candida albicans</i>	R*	64	16	32
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	R*	R*	185	R*
<i>Aspergillus fumigatus</i>	R*	R*	R*	R*
<i>Penicillium chrysogenum</i>	R*	R*	370	R*

R\*: Microorganismo resistente a los compuestos a las concentraciones ensayadas

Los estudios realizados con tres hongos y la levadura *Candida albicans* muestran que el compuesto DMHNHC<sub>14</sub> presenta cierta actividad frente a la levadura y dos hongos. El compuesto DMHNHC<sub>10</sub> no presenta ninguna actividad y los compuestos DMHNHC<sub>12</sub> y DMHNHC<sub>16</sub> solo presentan actividad frente a la levadura.

Tabla 7. Actividad antifúngica de tensioactivos geminales derivados de histidina.

	$C_3(DMHNHC_{10})_2$	$C_3(DMHNHC_{12})_2$	$C_3(DMHNHC_{14})_2$	$C_3(DMHNHC_{16})_2$
Hongos	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml
<i>Candida albicans</i>	8	16	R*	R*
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	90	R*	R*	R*
<i>Aspergillus</i>	381	R*	R*	R*

<i>fumigatus</i>				
<i>Penicillium chrysogenum</i>	381	190	R*	R*

R\*: Microorganismo resistente a los compuestos a las concentraciones ensayadas

La actividad antifúngica de los tensioactivos geminales es sensiblemente inferior a la observada para los tensioactivos de estructura lineal (monocatenarios).

## 5 TENSIOACTIVOS MONOCATENARIOS DERIVADOS DE HISTIDINA

### Estabilidad de los productos a 50°C

Se preparó una disolución de cada uno de los tensioactivos y se mantuvieron a 50°C durante 144 horas. A intervalos de 24 horas se analizó la disolución mediante cromatografía de alta resolución (HPLC). Los valores de área correspondientes al pico cromatográfico de cada uno de los productos se muestran en la Tabla 8. Se observa que el valor del área se mantiene constante lo que indica que todos los productos son estables a 50°C y a temperaturas inferiores.

15 Tabla 8.

	Concentración (mg/ml)	0 h	24 h	48 h	72 h	144 h
DMHNHC <sub>10</sub>	2,00	122,47	123,42	127,93	123,39	121,51
DMHNHC <sub>12</sub>	1,53	74,10	76,10	76,65	74,49	76,12
DMHNHC <sub>14</sub>	1,35	76,79	78,08	78,32	74,09	71,95
DMHNHC <sub>16</sub>	1,50	78,22	80,39	77,73	74,46	76,14

### Determinación del pKa

La determinación de las constantes de acidez se realizó mediante valoraciones con NaOH de disoluciones de los tensioactivos de concentración conocida. Una vez finalizada la valoración se determinó el valor del pKa en el punto de semi valoración en el que el valor del pH es igual al pKa. Los valores de pKa obtenidos se muestran en la Tabla 1. Todos los productos poseen un valor de pKa de alrededor de 6 por lo que

tienen un carácter ácido débil y dependerá el que estén protonados o no del pH del medio en el que estén disueltos.

5

10

15

20

25

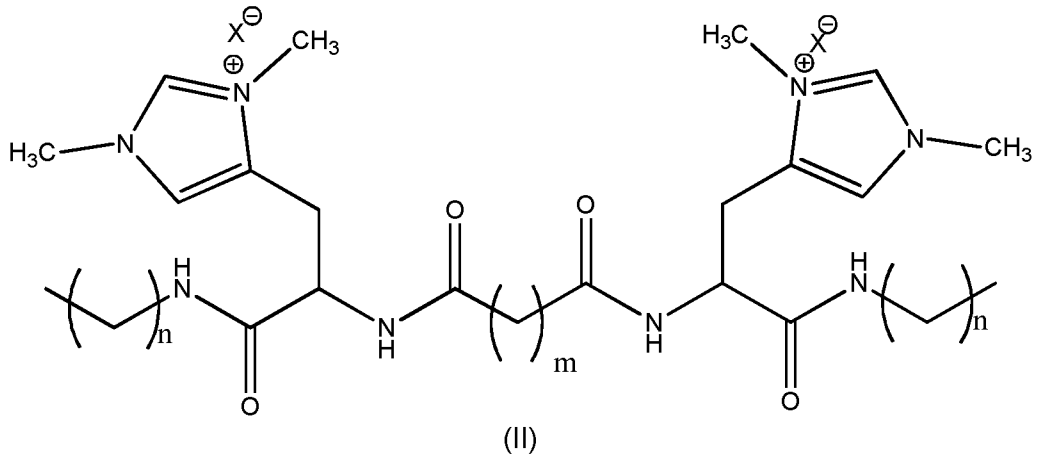
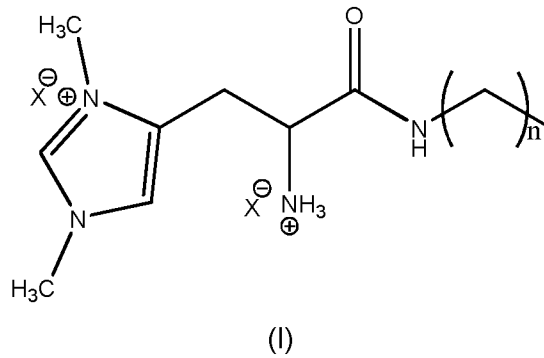
30

35

## REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I) o (II)

5



10

donde: n es un valor entero de 9 a 15;  
 m es un valor entero de 2 a 6; y  
 X<sup>-</sup> es un contraión.

15

2. Compuesto según la reivindicación 1, donde X<sup>-</sup> es un halogenuro.

3. Compuesto según la reivindicación 2, donde X<sup>-</sup> es cloruro.

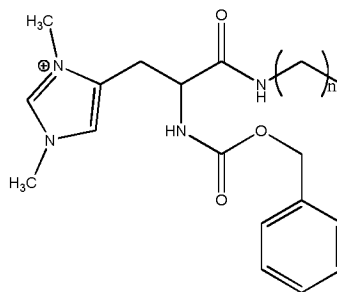
4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde m es 3, 4 o 5.

20

5. Compuesto según la reivindicación 4, donde m es 3.

6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde X<sup>-</sup> es cloruro y m es 3.

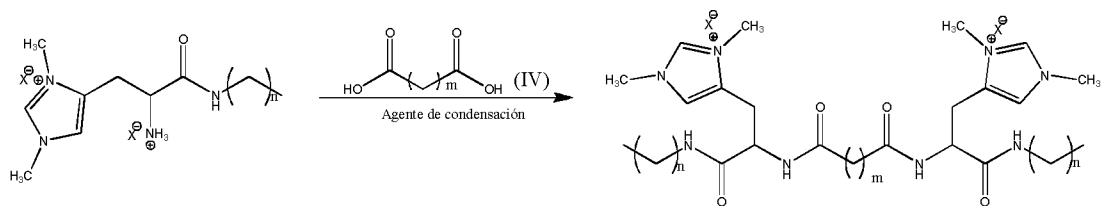
7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde n es 9, 11, 13 o 15.
8. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dichos compuestos forman micelas, vesículas/liposomas, cristales líquidos y geles estructurados.
9. Procedimiento de obtención de un compuesto de fórmula (I) según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende la hidrogenación catalítica de un compuesto de fórmula (III):



(III)

donde n está definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 o 7.

10. Procedimiento de obtención de compuesto de fórmula (II) según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende la reacción de condensación de un compuesto de fórmula (I) con un diácido de fórmula (IV) junto con un agente de condensación.



(I)

(II)

donde: m, n y X<sup>⊖</sup> está definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

11. Composición que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) o (II) descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

12. Composición según la reivindicación 11, donde dicha composición es una composición cosmética, detergente, farmacéutica, alimentaria o agroalimentaria.
13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, donde dicha  
5 composición está en forma de polvo, pasta, emulsión o suspensión acuosa.
14. Uso del compuesto de fórmula (I) o (II) descritos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, como agentes tensioactivos.
- 10 15. Uso del compuesto de fórmula (I) o (II) descritos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, como antimicrobianos.
16. Uso según la reivindicación anterior, como antimicrobianos frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- 15 17. Uso de los compuestos de fórmula (I) o (II) descritos en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, como vehículos de moléculas.
18. Uso de los compuestos de fórmula (I) o (II) descritos en cualquiera de las  
20 reivindicaciones 1 a 8, como conservantes, emulsionantes, espumantes o humectantes.
19. Uso de los compuestos de fórmula (I) o (II) descritos en cualquiera de las  
25 reivindicaciones 1 a 8, para el tratamiento de aguas.



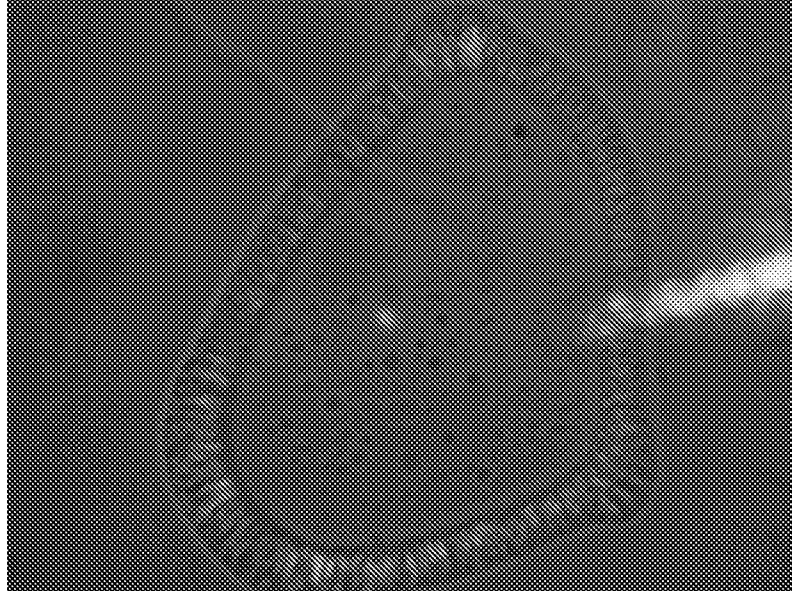


FIG. 1



FIG. 2

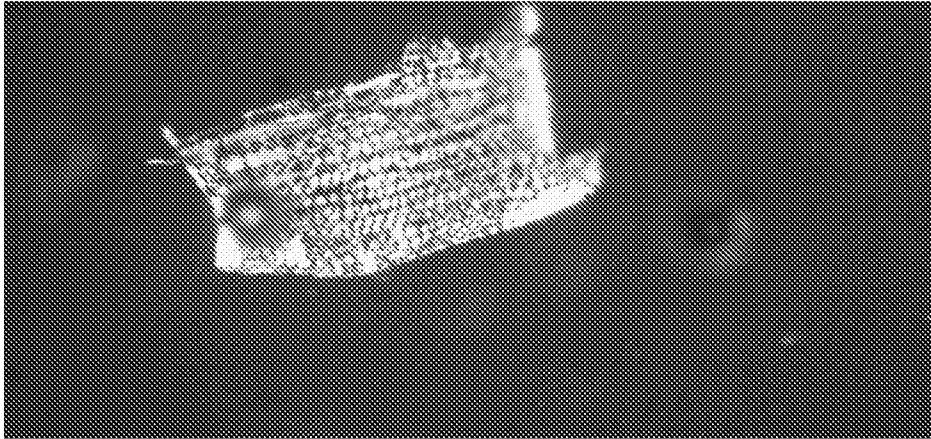


FIG. 3

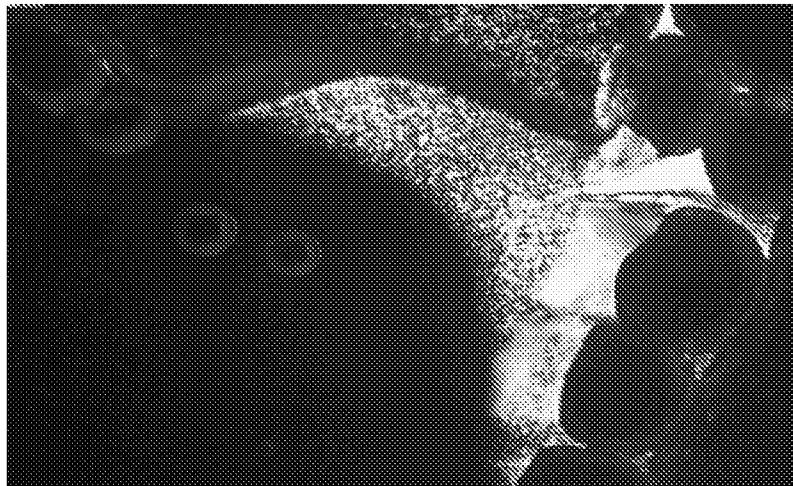


FIG. 4

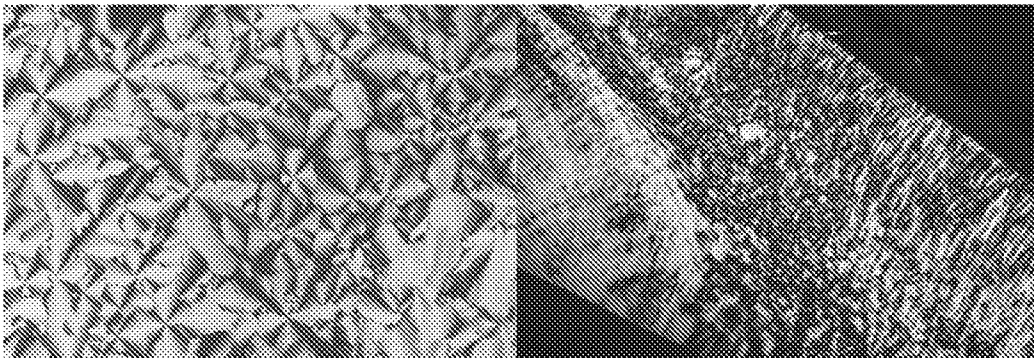


FIG. 5

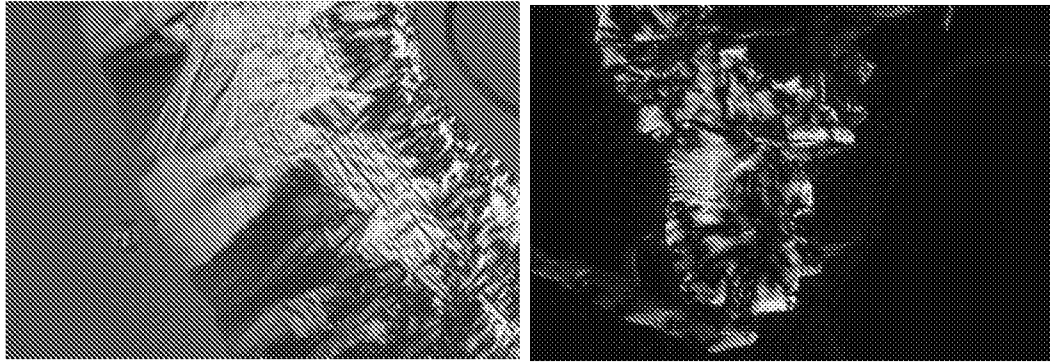


FIG. 6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2016/070471

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**See extra sheet**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D, C11D, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, ESPACENET, LATIPAT, CAS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96/21642 A1 (LABORATORIOS MIRET) 18/07/1996, claims	1-19
A	WO 2006/056636 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 01/06/2006, claims	1-19
A	2009, P Gizzi et al, European Journal Organic Chemistry 2009, págs. 3953-3963. "Molecular tailored histidine-based complexing surfactants", abstract, citada in the application	1

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07/09/2016

Date of mailing of the international search report  
**(08/09/2016)**

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer  
M. Fernández Fernández

Telephone No. 91 3495489

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2016/070471

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO9621642 A1	18.07.1996	US5780658 A PT749960E E ES2092958 A1 ES2092958 B1 EP0749960 A1 EP0749960 B1 DE69521499T T2 CA2185165 A1 CA2185165 C	14.07.1998 30.11.2001 01.12.1996 01.08.1997 27.12.1996 27.06.2001 25.10.2001 18.07.1996 27.02.2001
----- WO2006056636 A1	----- 01.06.2006	----- US2009203781 A1 JP2008520631 A ES2265245 A1 ES2265245 B1 EP1813600 A1 EP1813600 A4	----- 13.08.2009 19.06.2008 01.02.2007 01.02.2008 01.08.2007 04.11.2009
----- ----- -----	----- ----- -----	----- ----- -----	----- ----- -----

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2016/070471

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C07D233/64* (2006.01)

*C11D1/58* (2006.01)

*A61K31/4172* (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2016/070471

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

**Ver Hoja Adicional**

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07D, C11D, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, ESPACENET, LATIPAT, CAS

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 96/21642 A1 (LABORATORIOS MIRET) 18/07/1996, reivindicaciones	1-19
A	WO 2006/056636 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) 01/06/2006, reivindicaciones	1-19
A	2009, P Gizzi et al, European Journal Organic Chemistry 2009, págs. 3953-3963. "Molecular tailored histidine-based complexing surfactants", resumen, citada en la solicitud	1

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
07/09/2016

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**08 de septiembre de 2016 (08/09/2016)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
M. Fernández Fernández  
Nº de teléfono 91 3495489

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2016/070471

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO9621642 A1	18.07.1996	US5780658 A	14.07.1998
		PT749960E E	30.11.2001
		ES2092958 A1	01.12.1996
		ES2092958 B1	01.08.1997
		EP0749960 A1	27.12.1996
		EP0749960 B1	27.06.2001
		DE69521499T T2	25.10.2001
		CA2185165 A1	18.07.1996
		CA2185165 C	27.02.2001
		-----	-----
WO2006056636 A1	01.06.2006	US2009203781 A1	13.08.2009
		JP2008520631 A	19.06.2008
		ES2265245 A1	01.02.2007
		ES2265245 B1	01.02.2008
		EP1813600 A1	01.08.2007
		EP1813600 A4	04.11.2009
-----	-----	-----	-----



**CLASIFICACIONES DE INVENCION**

*C07D233/64* (2006.01)  
*C11D1/58* (2006.01)  
*A61K31/4172* (2006.01)