



Universidad Nacional del Litoral  
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

**“DESARROLLO DE NUEVOS BIOCIDAS  
DERIVADOS DE AMIDAS PARA APLICACIONES EN  
LA CONSERVACIÓN DE CUEROS.”**

Tesis presentada por:

Lic. en Biotecnología Laura Marcela MACHUCA

Director: Dr. Marcelo César MURGUIA

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral para la obtención del título de Doctor en Cs. Biológicas.

**2010**

## AGRADECIMIENTOS

Con estas breves palabras, quiero agradecer a todas las personas que han aportado su granito de arena y me han apoyado durante el transcurso de esta etapa. Quiero que sepan que han hecho más que eso, me hicieron disfrutar de muy buenos momentos, me acompañaron, y siempre me dieron ánimos. Fueron, muchas veces, un ejemplo a seguir y un estímulo para crecer intelectualmente y como persona.

A Dios, quién no me dejó sola ni un instante.

A mi esposo Ignacio, por brindarme siempre su amor y por acompañarme en cada paso.

A toda mi familia, principalmente a mis padres (Kela y Juan Carlos) y a mi hermana (Silvia), quienes supieron entender y compartir mis alegrías, tristezas, triunfos y fracasos.

A mis sobrinos, Anna B., Santiago T., Juliana A., Jerónimo M., Martina M., Agustín M., Emma M., Bautista F., Emanuel T., por darme tanto amor.

A todos mis amigos, santafesinos y correntinos, quienes siempre encontraron la palabra justa y me brindaron todo su cariño.

A mi Director Marcelo C. Murguía, por abrirme las puertas del fascinante mundo de la investigación, por compartir generosamente todo su conocimiento y por guiarme en la construcción de esta tesis.

A la Dra. Cristina Lurá, por haberme enseñado con tanta responsabilidad y dedicación la maravillosa tarea de ser docente, por ser una guía en este camino y por transmitirme desinteresadamente todo su cariño.

A Dr. Ricardo Grau y a la Dra. María Inés Cabrera, quienes me brindaron su apoyo académico y económico durante el desarrollo de la tesis.

A mis compañeros del Laboratorio de Química Fina, principalmente a mis amigos Alejandro Cappadoro, Victoria Sánchez, Luciano Mengatto, Alexis Bock, Luciana Vera Candiotti, Sonia Mancini y Andrea Popielarz.

A Antonio Negro y Susana Gervasio, por generarme siempre una sonrisa y por estar presente para tenderme una mano.

A mis compañeros y amigos del Departamento de Química Orgánica, y en especial a la Dra. Georgina Tonarelli, por haberme recibido con los brazos abiertos y por acompañarme en este último tiempo.

A mis compañeros y amigos de la Cátedra de Microbiología General, por haberme enseñado tanto y por tenderme siempre una mano.

A todo el personal del INTI (Cueros), por la buena predisposición y por tanta ayuda.

Al Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC) por haberme brindado un espacio durante el desarrollo de esta tesis.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral por el apoyo recibido, por brindarme siempre un lugar y por haber sido mí casa durante tantos años.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el apoyo económico brindado.

A todos ellos, hago extensivo mi más sincero agradecimiento.

Laura M. Machuca

# INDICE

<b>CAPÍTULO 1</b>	<b>1</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 PROBLEMÁTICA VINCULADA A LA INDUSTRIA DEL CUERO	2
1.2 TECNOLOGÍA DEL CUERO	4
1.2.1 Generalidades	4
1.2.2 Descripción del proceso	6
1.3 HONGOS : LEVADURAS Y MOHOS	18
1.3.1 Características Generales	19
1.3.2 Rol de los hongos en la naturaleza	19
1.3.3 Características fisiológicas	20
1.3.4 Estructura y composición química	21
1.3.5 Morfología	24
1.4 ANTIFÚNGICOS: SUS PRINCIPALES GRUPOS	25
1.5 OBJETIVO GENERAL	27
1.5.1 Objetivos Específicos	28
1.6 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 1	29
<b>CAPÍTULO 2</b>	<b>30</b>
<b>2 SÍNTESIS QUÍMICA DE NUEVOS BIOCIDAS DERIVADOS DE AMIDAS</b>	<b>30</b>
2.1 SURFACTANTES: ASPECTOS GENERALES	31
2.2 ESTRATEGIAS DE SÍNTESIS	34
2.2.1 Grupo funcional amino-acetilo	34
2.2.2 Intermediario "llave": éter diglicidílico	35
2.2.3 Moléculas <i>gemini</i>	38
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS	39

2.4 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	40
2.4.1 Síntesis de aminas grasas terciarias de longitud de cadena variable	41
2.4.2 Síntesis de <i>N,N</i> -dimetilfarnesilamina y <i>N,N</i> -dimetil-perfluorooctil-propilamina	43
2.4.3 Síntesis de la molécula espaciadora: <i>N</i> -acetildietanolamina	45
2.4.4 Síntesis del intermediario “llave” a partir de la <i>N</i> -acetildietanolamina empleando Catálisis por Transferencia de Fases	45
2.4.5 Síntesis de las moléculas <i>gemi</i> derivadas de aminas primarias y terciarias	47
2.4.6 Síntesis de análogos monoméricos	48
2.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS	50
2.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
2.7 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 2	58
<b>CAPÍTULO 3</b>	<b>61</b>
<b>3 ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ACTIVAS DE SUPERFICIE DE LOS COMPUESTOS <i>GEMINI</i> SINTETIZADOS</b>	<b>61</b>
3.1 TENSIÓN SUPERFICIAL	62
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	65
3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
3.4 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 3	73
<b>CAPÍTULO 4</b>	<b>74</b>
<b>4 ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPUESTOS <i>GEMINI</i> SINTETIZADOS</b>	<b>74</b>
4.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	75
4.1.1 Técnica de Dilución en Caldo	79
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS	79
4.3 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	80
4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	88
4.5 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 4	96

<b>CAPÍTULO 5</b>	<b>97</b>
<b>5 PRODUCCIÓN A MAYOR ESCALA DE LOS COMPUESTOS <i>GEMINI</i> DE MEJOR DESEMPEÑO COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS. EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA SOBRE CUEROS</b>	<b>97</b>
5.1 PRINCIPIOS GENERALES	98
5.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS PARA EL ESCALADO DE LOS COMPUESTOS <i>GEMINI</i> MÁS EFICIENTES 4b Y 4e.	101
5.3 FORMULACIÓN DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS	104
5.4 PRUEBAS DE DESEMPEÑO EN CUEROS	108
5.4.1 Obtención de cueros “wet-blue”	109
5.4.2 Evaluación de la resistencia al crecimiento fúngico sobre cueros “wet-blue”	110
5.4.2.1 ASTM D 3273-00 (2005): Cámara Tropical	110
5.4.2.2 ASTM 4576-08: Porciones de Cueros “Wet-blue” en placa	112
5.5 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 5	117
<b>CAPÍTULO 6</b>	<b>118</b>
<b>6 CONCLUSIONES</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO</b>	<b>124</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b>	Corte transversal de un cuero vacuno: partes principales de la piel	5
<b>Figura 1.2</b>	Curado o conservación de cueros: salado	8
<b>Figura 1.3</b>	Fulones para curtido al cromo	14
<b>Figura 1.4</b>	Reacción de los complejos de cromo catiónicos con los grupos carboxilo de los ácidos glutámico y aspártico.	15
<b>Figura 1.5</b>	Aspecto característico del cuero luego del curtido al cromo (wet blue)	15
<b>Figura 1.6</b>	Etapas del proceso de elaboración del cuero	17
<b>Figura 1.7</b>	Pared celular fúngica. Representación esquemática	22
<b>Figura 1.8</b>	Membrana plasmática de hongos. Representación esquemática	23
<b>Figura 1.9</b>	Morfología de a) hongos levaduriformes, b) hongos filamentosos o mohos y c) hongos de sombrero	24
<b>Figura 1.10</b>	Algunos antifúngicos de uso medicinal: a) Anfotericina B (polieno), b) Fluconazol (azol)	25
<b>Figura 1.11</b>	Antifúngicos empleados en la industria del cuero: a) <i>p</i> -nitrofenol (PNP), b) pentaclorofenol (PCP), c) <i>o</i> -fenilfenol (OPP), d) <i>p</i> -cloro- <i>m</i> -cresol (PCMC), e) 2-(tiocianometiltio)benzotiazol (TCMTB)	27
<b>Figura 2.1</b>	Representación esquemática de los diversos grupos de surfactantes: a) Surfactante convencional; b) Bolaform; c) Surfactante <i>gemin</i> i; d) Surfactante multiarmado polivalente	33
<b>Figura 2.2</b>	Estructuras de una sal de amonio y de una sal de amonio cuaternario	36
<b>Figura 2.3</b>	Catálisis por transferencia de fases. El ión de amonio cuaternario (Q <sup>+</sup> ) es tanto hidrófilo como lipófilo, se mueve entre la fase acuosa y la orgánica transportando un anión: el nucleófilo (Z <sup>-</sup> ) o el grupo saliente (X <sup>-</sup> ). En la fase orgánica el nucleófilo no está virtualmente solvatado y reacciona rápidamente con el sustrato (R-X)	36

<b>Figura 2.4</b>	Ruta sintética de los compuestos <i>gemi</i> sintetizados. Reactivos y condiciones: (i) 1, anhídrido acético, 130 °C – 90 minutos; (ii) 2, (±)- epíclorhidrina, NaOH ac., bisulfato de tetrabutilamonio (TBAB), 30°C – 5hs; (iii) 3, aminas primarias, bromuro de tetrabutilamonio (TBABr), etanol, 30°C – 18 hs; (iv) 3, <i>N,N</i> -dimetilaminas, TBABr, etanol, 30°C – 18 hs	41
<b>Figura 2.5</b>	Alquilación reductiva mediante el procedimiento de Eschweiler-Clarke de la dodecilamina (a) con formaldehído y ácido fórmico para dar la <i>N,N</i> -dimetildodecilamina (e)	42
<b>Figura 2.6</b>	Aminas grasas terciarias de longitud de cadena variable empleadas para la síntesis de surfactantes <i>gemi</i> : a) <i>N,N</i> -dimetiloctilamina, b) <i>N,N</i> -dimetildodecilamina, c) <i>N,N</i> -dimetiloctadecilamina	43
<b>Figura 2.7</b>	Aminas grasas terciarias de diferente naturaleza empleadas para la síntesis de surfactantes <i>gemi</i> : a) <i>N,N</i> -dimetilfarnesilamina y b) <i>N,N</i> -dimetil-perfluorooctilpropilamina	44
<b>Figura 2.8</b>	Síntesis de la molécula espaciadora, <i>N</i> -acetildietanolamina (2), a partir de dietanolamina (1). Donde (i): anhídrido acético, 130 °C – 90 minutos	45
<b>Figura 2.9</b>	Obtención del intermediario “llave” (3) a partir de la <i>N</i> -acetildietanolamina (2) usando catálisis por transferencia de fases. Donde: (i) (±)- epíclorhidrina, NaOH ac., bisulfato de tetrabutilamonio (TBAB), 30°C – 5hs. El TBAB es utilizado como catalizador de transferencia de fases	46
<b>Figura 2.10</b>	Ruta sintética de los compuestos <i>gemi</i> sintetizados. Reactivos y condiciones: (i) 3, aminas primarias, bromuro de tetrabutilamonio (TBABr), etanol, 30°C – 18 hs; (ii) 3, <i>N,N</i> -dimetilaminas, TBABr, etanol, 30°C – 18 hs	47
<b>Figura 2.11</b>	Ruta sintética de los compuestos monoméricos análogos sintéticos de los surfactantes no iónico y catiónico de longitud de cadena de carbono 12. Reactivos y condiciones: (i) 5, (±)- epíclorhidrina, NaOH ac., bisulfato de tetrabutilamonio (TBAB), 30°C – 5hs; (ii) 6, dodecilamina, bromuro de tetrabutilamonio (TBABr), etanol, 30°C – 18 hs; (iii) 6, <i>N,N</i> -dimetildodecilamina, TBABr, etanol, 30°C – 18 hs	49
<b>Figura 2.12</b>	Asistencia del Bromuro de Tetrabutilamonio [(C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> ) <sub>4</sub> N <sup>+</sup> Br <sup>-</sup> ] en la aminoalquilación del intermediario “llave” o éter diglicídico (3) con aminas grasas terciarias para dar los compuestos <i>gemi</i> catiónicos (4 d-h)	56



<b>Figura 3.1</b>	Comportamiento de un surfactante convencional disuelto en un medio acuoso	63
<b>Figura 3.2</b>	Comportamiento de un agente tensoactivo disuelto en un medio acuoso a medida que aumenta su concentración. Formación de micelas al saturarse la superficie del líquido	64
<b>Figura 3.3</b>	Monocapa de surfactantes <i>gemini</i> en la interfase aire-agua con sus grupos hidrofóbicos orientados hacia el aire	65
<b>Figura 3.4</b>	Tensiómetro Semiautomático Cole-Parmer Surface Tensiomat 21	66
<b>Figura 3.5</b>	Tensión Superficial vs. Logaritmo de la Concentración Molar de los compuestos catiónicos a 20 °C y pH 7: (a) Curvas para los compuestos de diferentes longitudes de cadena hidrocarbonada C <sub>8</sub> , C <sub>12</sub> y C <sub>18</sub> , (4d-f). (b) Curvas para los compuestos 4e, 4g y 4h con regiones hidrofóbicas de diferente naturaleza: saturada, insaturada y perfluorada respectivamente	68
<b>Figura 3.6</b>	Tensión Superficial vs. Logaritmo de la Concentración Molar de los compuestos catiónicos dimérico (4e) y monomérico (7b) a 20 °C y pH 7	69
<b>Figura 4.1</b>	Estructura de la molécula de ergosterol presente en la membrana fúngica	76
<b>Figura 4.2</b>	Modelo simplificado de la bicapa fosfolipídica de los hongos (se omite la presencia de proteínas y carbohidratos): a) membrana plasmática fúngica con ergosterol, b) comportamiento hipotético sugerido para un surfactante del tipo <i>gemini</i> . Asociación letal de ergosterol- <i>gemini</i> -fosfolípidos en la membrana fúngica	78
<b>Figura 4.3</b>	Características de algunas de las levaduras ensayadas: a) observación macroscópica de colonias de <i>C.parapsilosis</i> . b) observación microscópica de <i>C.albicans</i>	82
<b>Figura 4.4</b>	Características microscópicas de: a) <i>Aspergillus niger</i> y b) <i>Alternaria sp.</i>	84
<b>Figura 4.5</b>	Cámara de Fuchs–Rosenthal: a) Imagen de una cámara de Fuchs–Rosenthal. b) Cuadrícula de recuento: muestra 16 cuadrados grandes, cada uno de 1mm <sup>2</sup> . Cada cuadrado grande está subdividido en 16 cuadrados pequeños con una superficie de 0,0625 mm <sup>2</sup>	85

<b>Figura 4.6</b>	Pruebas de susceptibilidad en caldo. Actividad antifúngica del compuesto 4b frente a: a) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763, donde el valor de CIM observado fue de 4 µg/ml (tubo N° 5) y b) <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019, donde dicho valor fue de 8 µg/ml (tubo N° 4)	91
<b>Figura 4.7</b>	Pruebas de susceptibilidad en caldo: a) actividad antifúngica del compuesto 4g frente a <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404. El valor de CIM observado fue de 64 µg/ml (tubo N° 4). b) actividad antifúngica del producto comercial Bio F-36 (Pellital S.A.) frente a <i>Alternaria sp.</i> El valor de CIM observado fue de 16 µg/ml (tubo N° 3)	94
<b>Figura 5.1</b>	Esquema básico de un reactor discontinuo de tipo tanque agitado	100
<b>Figura 5.2</b>	Reactor de vidrio de 2 litros de capacidad empleado para la síntesis de los <i>gemini</i> tanto no iónico (4b) como catiónico (4e), así como también de sus intermediarios sintéticos. El mismo se encuentra equipado con un refrigerante a bolas, una ampolla con brazo compensador, agitación mecánica y un encamisado conectado a un baño recirculador para el control de la temperatura del proceso	104
<b>Figura 5.3</b>	Aspecto físico de los formulados preparados a partir de los compuestos <i>gemini</i> escalados: a) compuesto dimérico no iónico o 4b (emulsión blanca), b) compuesto dimérico catiónico o 4e (solución amarilla)	107
<b>Figura 5.4</b>	Aspecto físico de los productos antes de su incorporación al fulón del proceso: a) producto comercial (Bio F-36, Pellital S.A.), b) Muestra A ( <i>gemini</i> 4b) y c) Muestra B ( <i>gemini</i> 4e). Se puede apreciar claramente la presencia de dos fases para el caso de la Muestra A	109
<b>Figura 5.5</b>	Cámara Tropical comúnmente empleada durante la evaluación de la resistencia al crecimiento fúngico sobre cueros “wet-blue”: a) aspecto característico externo de una cámara ambiental, b) Disposición interna de los cueros en la cámara	111
<b>Figura 5.6</b>	Localización del inóculo en la muestra de cuero “wet-blue”. La disposición de las tres gotas de inóculo se muestran con la letra (x)	113
<b>Figura 5.7</b>	Evaluación de la resistencia fúngica en placa sobre cueros “wet-blue” tratados con Bio F-36 (Pellital S.A.) en su concentración 1 (P1): a) fotografía tomada a los 7 días de ensayo sin desarrollo sobre la probeta (Grado 0), b) fotografía tomada a los 14 días de ensayo con desarrollo sobre la probeta (Grado 3)	114

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 3.1</b>	Actividad de superficie y datos de agregación de los compuestos catiónicos sintetizados (4 d-h y 7b) <sup>a</sup>	70
<b>Tabla 4.1</b>	Esquema utilizado para la preparación de las diluciones de los compuestos catiónicos ( <i>gemini</i> y monomérico) solubles en agua. Pruebas de susceptibilidad en caldo	86
<b>Tabla 4.2</b>	Procedimiento empleado para la preparación de las diluciones de los compuestos no iónicos ( <i>gemini</i> y monomérico) insolubles en agua. Pruebas de susceptibilidad en caldo	87
<b>Tabla 4.3</b>	Valores de CIM expresados en µg/ml para los compuestos (4a-h) y (7a-b) ensayados	89
<b>Tabla 4.4</b>	Valores de CIM expresados en µg/ml para los compuestos 4b, 4e, 4g y 4h ensayados.	93
<b>Tabla 5.1</b>	Formulación de los compuestos <i>gemini</i> sintetizados a mayor escala (4b y 4e) para pruebas de desempeño sobre cueros	107
<b>Tabla 5.2</b>	Evaluación de la resistencia fúngica en Cámara Tropical sobre cueros “wet-blue”. Condiciones de ensayo: 28 ± 2 °C y humedad en saturación, durante 4 semanas. Cepas de hongos empleadas <i>Aspergillus sp.</i> y <i>Penicillium sp.</i> Norma ASTM D 3273-00	111
<b>Tabla 5.3</b>	Evaluación de la resistencia fúngica en placa sobre cueros “wet-blue”. Condiciones de ensayo: 28 ± 2 °C durante un período de tres semanas (lectura de los resultados a los 3, 7, 14 y 21 días). Cepa de hongo empleada <i>Aspergillus sp.</i> Norma ASTM D 4576-08	115

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>AS</b>	Agar Sabouraud
<b>ASTM</b>	American Society for Testing and Materials
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b><math>a_w</math></b>	Actividad Acuosa
<b>CCD</b>	Cromatografía en Capa Delgada
<b>CIM</b>	Concentración Inhibitoria Mínima
<b>CLSI</b>	Clinical Laboratory Standards Institute
<b>CMC</b>	Concentración Micelar Crítica
<b>CS</b>	Caldo Sabouraud
<b>CTF</b>	Catálisis por transferencia de fases
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DMF</b>	Dimetilformamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>GC</b>	Cromatografía Gaseosa
<b>INTI</b>	Instituto Nacional de Tecnología Industrial
<b>NCCLS</b>	National Committee for Clinical Laboratory Standards
<b>NOIT</b>	<i>N</i> -octil-isotiazolina
<b>OPP</b>	<i>o</i> -fenilfenol
<b>PCMC</b>	<i>p</i> -cloro- <i>m</i> -cresol
<b>PCP</b>	Pentaclorofenol
<b>PNP</b>	<i>p</i> -nitrofenol
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>TBAB</b>	Bisulfato de Tetrabutilamonio
<b>TBABr</b>	Bromuro de Tetrabutilamonio

<b>TCMTB</b>	2-(tiocianometiltio) benzotiazol
<b>THF</b>	Tetrahidrofurano
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias

## RESUMEN

En el presente trabajo, se presenta el diseño sintético para la preparación de nuevas moléculas anfipáticas de la familia *gemini* con potencial actividad antifúngica para la aplicación en la conservación de cueros.

El propósito de esta tesis es generar una nueva librería de antifúngicos diméricos de la familia *gemini* con capacidad bioactiva, con el propósito de contribuir al desarrollo de productos aplicables en la conservación de cueros y cuya composición química perjudique lo menos posible al medio ambiente. Dichos compuestos tienen como finalidad intentar reemplazar a los ya existentes o bien actuar como sinergisantes de los mismos, reduciendo la cantidad empleada habitualmente y contribuyendo de manera favorable con los seres vivos.

El esquema de síntesis de las nuevas moléculas diméricas involucra no menos de tres etapas sintéticas. De esta manera, eligiendo cuidadosamente los materiales de partida, fue posible dirigir estratégicamente la síntesis de surfactante con dos grupos hidrofílicos y dos cadenas hidrofóbicas. El estudio de dichos compuestos constituye un área de investigación y desarrollo en expansión gracias a las excepcionales propiedades que presentan muchos de estos compuestos en disolución acuosa. Por ejemplo, concentraciones micelares críticas (CMC) menores a la de los surfactantes convencionales monoméricos, mejor desempeño en la disminución de la tensión superficial del agua y la propiedad de formar agregados con diferentes morfologías, entre otras.

Se presenta además el estudio y desarrollo de diferentes pruebas *in vitro* de actividad biológica de los productos sintetizados frente a cepas de colección tales como *Candida albicans* ATCC 64548, *C.parapsilosis* ATCC 22019, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Aspergillus niger* ATCC 16404 y dos aislamientos regionales, *C.parapsilosis* y *Alternaria sp.*, de interés para la industria curtidora.

A partir de los resultados obtenidos de los ensayos de actividad biológica *in vitro*, se realizó un ordenamiento jerárquico de los compuestos *gemini* sintetizados. A raíz de esto, emprendimos el escalado del proceso de síntesis de dos moléculas *gemini*. Ambas fueron seleccionadas ya que resultaron ser las moléculas de mejor desempeño en general,

demostrada acción antifúngica y bajo costo de producción. Finalmente, ambas muestras fueron enviadas al Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI – Cueros) para su evaluación como agente antifúngico (o preservante) en el proceso de fabricación de cueros.

En el Capítulo 1, “**Introducción**”, se presentan nociones básicas acerca de la problemática vinculada a la industria curtidora, el proceso industrial de producción del cuero, características generales de los hongos; así como también el objetivo general y los objetivos específicos de esta tesis.

En el Capítulo 2, “**Síntesis Química de nuevos biocidas derivados de amidas**”, se presentan los aspectos estratégicos para la obtención de nuevos surfactantes de naturaleza no iónica y catiónica con potencial actividad biológica. La ruta sintética para la obtención de los surfactantes comprende no menos de tres etapas de síntesis: (i) la obtención de la *N*-acetildietanolamina a partir de anhídrido acético y dietanolamina, (ii) la utilización de la catálisis por transferencia de fases sólido-líquido para la obtención del intermediario reactivo o éter diglicídico y (iii) la aminoalquilación de dicho intermediario con aminas grasas primarias y terciarias (*N,N*-dimetiladas) de diferente longitud y naturaleza para obtener los compuestos de interés.

En el Capítulo 3, “**Estudio de las propiedades activas de superficie de los compuestos *gemin* sintetizados**”, se estudiaron diversos parámetros tales como tensión superficial, concentración micelar crítica, concentración en exceso de superficie, entre otros; que definen las excepcionales propiedades de superficie que exhiben los surfactantes *gemin* en disolución acuosa. Las medidas de tensión superficial de las soluciones acuosas se determinaron por el método de desprendimiento del anillo de Du Nouy y se midieron a 20°C y pH 7 utilizando un tensiómetro semiautomático Cole-Parmer Surface Tensiomat 21

En el Capítulo 4, “**Estudio *in vitro* de las propiedades biológicas de los compuestos *gemin* sintetizados**”, se evaluó la actividad antifúngica (determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima) de los *gemin* frente a distintas cepas de hongos mediante la técnica de dilución en caldo utilizando los métodos de referencia aprobados por la CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute): M27-A2 y M38-A. Además, para cotejar los valores de CIM obtenidos se ensayaron dos compuestos de referencia:

Fluconazol (derivado azólico de uso clínico y de elevada actividad antifúngica) y Bio F-36 (conservante empleado en la curtición de pieles a base de TCMTB y un derivado carbámico).

En el Capítulo 5, “**Producción a mayor escala de los compuestos *gemi*ni de mejor desempeño como agentes antifúngicos. Evaluación de su actividad biológica sobre cueros**”, se llevó a cabo la producción a mayor escala de dos moléculas *gemi*ni previamente seleccionadas debido a su excelente desempeño *in vitro*, su formulación y su evaluación como preservante en el proceso de fabricación de cueros. Este último procedimiento, se realizó tomando como base las normas ASTM D 3273-00 y ASTM D 4576-08 en el Instituto Nacional de Tecnología Industrial, más precisamente al Centro de Investigación y Desarrollo del Cuero (INTI-Cueros) ubicado en Manuel B. Gonnert (Buenos Aires, Argentina).

En el Capítulo 6, “**Conclusiones**”, se presentan las principales consideraciones conclusivas.

## ABSTRACT

A series of new N-acetylated non-ionic and cationic *gemi*ni surfactants having dimeric structures derived from primary and tertiary amines were synthesized. In addition, two N-acetylated monomeric analogues were prepared. The synthesized compounds have a molecular structure able to interact with the fungi membrane and to promote their free entrance to the cell wall. Their antifungal potency and surface properties were also determined.

The surface tension of aqueous solutions (pH = 7) was measured at 20 °C using a semiautomatic tension-meter apparatus (Cole-Parmer Surface Tensiomat 21) by the Du Nouy ring method. Critical micelle concentration (CMC), effectiveness of surface tension reduction ( $\gamma_{CMC}$ ), surface excess concentration ( $\Gamma$ ), and area per molecule at the interface ( $A$ ) were also determined and the resulting values indicate that the cationic series is characterized by good surface-active and self-aggregation properties.



Antifungal activities of the dimeric and monomeric compounds were evaluated using the method for the broth macro dilution test (M27-A2 and M38-A, Clinical Laboratory Standards Institute - CLSI). Six microbial strains were used to perform the study: *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *C.albicans* (ATCC 64548), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), *Aspergillus niger* ATCC 16404 and two wild-type strains: *C.parapsilosis* and *Alternaria sp.* The antimicrobial activity was measured by fungi growth inhibition expressed as minimum inhibitory concentration (MIC) values. Results were compared to those obtained for their monomeric analogues and for two commercially available reference compounds: Fluconazole and Bio F-36 (Pellital).

Finally, *gemini* with a distinguished performance were synthesized on a large scale and sent to INTI (National Institute of Industrial Technology) to evaluate their behavior as leather preservatives.

# **CAPÍTULO 1**

## **“INTRODUCCIÓN”**

## **1.1 PROBLEMÁTICA VINCULADA A LA INDUSTRIA DEL CUERO**

Descubrimientos científicos recientes han logrado generar un notable interés tanto académico como tecnológico en diferentes áreas de la ciencia. Una de ellas, la química, ha permitido desarrollar diferentes compuestos de amplia y variada utilidad, los cuales han contribuido a solucionar en forma definitiva o momentánea diversas problemáticas. Entre ellas, podemos mencionar a las causadas por los microorganismos, los cuales resultan de gran importancia durante el control microbiológico en una de las industrias más antiguas de nuestro país, la industria de la curtiembre.

La República Argentina es uno de los países más destacados en cuanto a la producción de pieles y cueros, ocupando uno de los primeros lugares como exportador mundial de estos productos.

La industria curtidora está integrada por alrededor de 300 establecimientos, los cuales ocupan unas 20.000 personas, y donde se curten por año aproximadamente 11 millones de cueros vacunos y en menor cantidad otro tipo de pieles como ser ovinas, caprinas, entre otras (Frankel AM, 1995).

Esta industria utiliza su propia terminología denominando “cueros” a las pieles de animales grandes (vacunos adultos y equinos) mientras que denomina “pieles” a las provenientes de animales de menor tamaño (ovejas, cabras y terneros). Con las pieles se fabrican gran variedad de prendas exteriores, como abrigos, chaquetas, sombreros, guantes y botas, así como adornos para otros tipos de prendas. El cuero se utiliza para confeccionar prendas y puede emplearse en la fabricación de otros productos, como la tapicería para automóviles y muebles, y una amplia gama de artículos de piel, como correas de reloj, bolsos y artículos de viaje. El calzado es otro producto tradicional del cuero.

Sin embargo, los términos “cueros” y “pieles” pueden emplearse de manera diferente según el contexto. Durante el proceso de curtido, “piel” puede hacer referencia al material no curtido (putrescible) mientras que “cuero” hace referencia al material curtido (no deteriorable). Además, fuera de este ámbito, el término “piel” también puede hacer referencia a pieles de animales con pelo.

Desde hace mucho tiempo, el cuero es un subproducto de la industria frigorífica que se convierte en materia prima para la industria del cuero terminado. La producción del cuero requiere un proceso largo y complicado que solo se puede emprender contando con adecuados métodos y personal, técnico o no, pero especializado. Durante dicho proceso, los microorganismos pueden deteriorar los cueros disminuyendo, en gran medida, los rendimientos de la industria curtidora.

Los cálculos realizados indican que las pérdidas totales causadas por daños a los cueros y pieles durante su conservación ascienden anualmente a varios millones de dólares en todo el mundo.

En consecuencia, se deduce que tanto los cueros como las pieles constituyen artículos de gran valor en el comercio nacional e internacional, de modo que los procesos de conservación, así como también los sistemas tecnológicos adoptados durante el curtido de estos materiales desempeñan un rol fundamental en la comercialización exitosa de dichos productos.

Si bien la acción perjudicial o efecto deletéreo de los microorganismos sobre los cueros no es la única problemática del sector, consideramos que es de vital importancia para el mismo controlar este deterioro indeseado.

En la actualidad, para evitar la biodegradación durante el proceso de fabricación de cueros, se emplean una amplia gama de compuestos químicos de diversa naturaleza (por ejemplo, compuestos heterocíclicos o derivados del fenol, entre tantos). Su utilización como compuestos biocidas durante el proceso de producción en la industria curtidora ha sido llevada a cabo con éxito. Sin embargo, muchos de ellos presentan características poco favorables como ser una baja solubilidad en agua (Muthusubramanian L y col, 1997) o una síntesis poco sencilla y pueden considerarse peligrosos (de elevada toxicidad) para el hombre, para animales de sangre caliente y para el medio ambiente (Reemtsma T y col, 1995).

Los benzotiazoles son sustancias de elevada actividad biológica y de gran utilidad en la industria curtidora, así como también en diferentes procesos industriales como la producción de pinturas, maderas, papeles, entre otros. Por ejemplo, el biocida 2-(tiocianometiltio) benzotiazol o TCMTB es corrientemente empleado en la producción de cueros como un sustituto de los bien conocidos clorofenoles.

En estos últimos tiempos, su creciente utilización como agente antimicrobiano ha ganado mayor atención debido no solo a sus propiedades antimicrobianas, sino también a su aparición en ríos y suelos como potencial agente contaminante. Este tipo de compuestos y sus correspondientes metabolitos se asocian a datos toxicológicos desfavorables. Se los considera agentes mutagénicos, tóxicos para el agua y sus peces. Además han sido identificados como sustancias alergenas (Reemtsma T y col, 1995).

A pesar de los esfuerzos realizados, la eliminación de estos compuestos de las aguas residuales de la industria curtidora constituye un gran desafío ya que, generalmente, la biodegradación de dichas sustancias es un proceso insuficiente.

Por lo tanto, debido a lo comentado anteriormente y a nuestro interés de generar nuevos conocimientos, abordamos el camino de la búsqueda de diferentes compuestos antimicrobianos, enfocada en el desarrollo sintético de estructuras novedosas con una posible aplicación en la conservación de cueros en la industria curtidora.

Esta búsqueda pretende, no solo aportar al sector en cuanto a la disminución en el deterioro de los cueros sino también generar una librería de compuestos con capacidad bioactiva a partir de reactivos de partida accesibles comercialmente y de fácil provisión, cuya composición química perjudique lo menos posible al medio ambiente.

## **1.2 TECNOLOGÍA DEL CUERO**

Esta sección tiene como objetivo brindar algunos conocimientos básicos necesarios para el entendimiento del proceso industrial de producción del cuero.

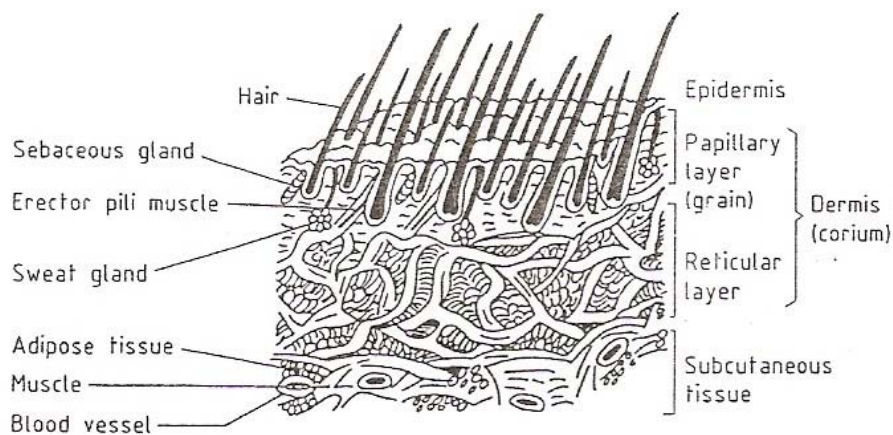
### **1.2.1 Generalidades**

Para un animal vivo la piel no sólo constituye una simple cubierta protectora exterior, sino que también desempeña otras funciones fisiológicas vitales como ser: el mantenimiento de la temperatura corporal, la excreción de determinados desechos, la protección frente a daños físicos, entre otros.

Desde el punto de vista histológico la piel está constituida por tres capas: una superficial denominada epidermis, una intermedia conocida como dermis y otra profunda o tejido subcutáneo.

La epidermis está formada por un epitelio estratificado de espesor variable, con orificios que corresponden a los folículos y glándulas cutáneas mientras que, la dermis comprende aproximadamente un 30 a un 35 % de proteína, que en su mayor parte es colágeno, siendo el resto agua y grasa. Además del colágeno, existe otra red de fibras casi químicamente inertes denominada elastina, que sirve para fortalecer aún más la piel. Más abajo, se encuentra el tejido subcutáneo.

La estructura de la piel puede observarse en detalle en la **Figura 1.1**.



**Figura 1.1.** Corte transversal de un cuero vacuno: partes principales de la piel.

De las capas mencionadas anteriormente es la dermis la que se utiliza para fabricar el cuero, luego de eliminar las demás capas con medios químicos y mecánicos.

Básicamente, el proceso de curtido consiste en reforzar la estructura proteica del cuero creando un enlace entre las cadenas de péptidos. Durante el mismo se emplean ácidos, álcalis, sales, enzimas y agentes curtientes para disolver las grasas y las proteínas no fibrosas y para enlazar químicamente las fibras de colágeno entre sí (Frankel AM, 1995).

El curtido se practica desde tiempos prehistóricos. El sistema más antiguo se basa en la acción química de material vegetal que contiene tanino (ácido tánico). Se obtienen extractos de las partes de plantas que son ricas en tanino y se procesan convirtiéndose en líquidos curtientes. Los cueros se remojan en fosos o tinajas de líquidos cada vez más

concentrados hasta que se curten, lo cual puede tardar semanas o meses. Este proceso se utiliza en países de escasos recursos tecnológicos así como también en países desarrollados para producir cueros más firmes y gruesos para suelas de zapatos, bolsos, artículos de viaje y correas.

El curtido químico, que utiliza sales minerales como el sulfato de cromo, se introdujo en el siglo XIX y se ha convertido en el proceso principal para la producción de piel más suave y delgada para artículos como bolsos, guantes, prendas de vestir, tapicería y calzado.

La escala y tipología de instalaciones de curtido son muy variadas. Algunas fábricas poseen sistemas altamente mecanizados y utilizan sistemas automáticos cerrados y muchos productos químicos, mientras que otras todavía emplean mucha mano de obra y sustancias curtientes naturales con técnicas que no han variado esencialmente en el curso de los siglos. El tipo de producto necesario (por ejemplo, cuero de gran resistencia o pieles finas flexibles) influye en la elección de los agentes curtientes y el acabado necesarios.

A continuación describiremos, de manera sencilla y generalizada, las diferentes etapas que atraviesan esa piel o cuero hasta convertirse en el producto final deseado.

### **1.2.2 Descripción del proceso**

La producción de cueros puede dividirse en diferentes etapas las cuales se resumen seguidamente y serán descritas con mayor detalle más adelante. Dichas etapas consisten en:

- **Curado y expedición de pieles y cueros.** En esta etapa, los cueros se mantienen en un estado de conservación hasta el momento de su curtición.
- **Operaciones de ribera.** Abarca el tramo de la curtiduría que transcurre entre el retiro de las pieles o cueros del lugar de almacenamiento y su preparación para el curtido propiamente dicho.
- **Proceso de curtido.** Por medio de la curtición los cueros y pieles de animales se convierten en materiales más resistentes a la descomposición.
- **Acabado del cuero.** Incluye tareas mecánicas para dar forma y alisar, métodos químicos para colorear, lubricar, suavizar y aplicar un acabado superficial al producto.

Todos estos procesos pueden tener lugar en las mismas instalaciones, aunque es común que el acabado se realice en instalaciones distintas del curtido (Frankel AM, 1995).

### ***CURADO Y EXPEDICIÓN DE PIELES Y CUEROS.***

Por lo general, durante esta etapa, los cueros crudos se mantienen en un estado de conservación hasta el momento de su curtición por especialistas.

En el mismo momento de la faena del animal comienza el proceso de descomposición debido a que el exterior de la piel está cubierto con suciedad proveniente del medio ambiente y su interior puede contener algunos microorganismos controlados por la defensa del animal mientras está vivo, las cuales desaparecen una vez muerto.

El cuero está compuesto de:

- 1 Proteínas fibrosas como queratina, colágeno y elastina.
- 2 Proteínas solubles o blandas como albúminas, globulinas, mucoproteínas.
- 3 Componentes grasos del cuerpo, tanto fisiológicos como para almacenamiento de lípidos.

De todas estas sustancias, las más resistentes al ataque químico y bacteriano son las proteínas fibrosas. Esto nos indica que la descomposición del cuero es un suceso a ocurrir en forma rápida, por lo tanto se deben emplear métodos de conservación que minimicen tanto la descomposición bacteriana como las alteraciones bioquímicas del mismo, con la finalidad de mantener las buenas cualidades que se requieren para la fabricación del cuero terminado.

Existen tres sistemas principales de conservación: el secado, el salado y el salmuerado o conservación en salmuera. A continuación describiremos cada uno de ellos.

#### **Secado.**

El secado al aire de cueros y pieles constituye uno de los métodos más antiguos de conservación. Tiene la ventaja de constituir la forma más sencilla de conservación de cueros y pieles, lo cual resulta práctico en los lugares donde la sal es cara y hay que conservar una pequeña cantidad de pieles. Por ello, este método es útil en zonas de clima tropical seco y en zonas rurales de naciones poco desarrolladas.



La técnica del secado varía según sean las condiciones climáticas de la zona, la disponibilidad de materiales auxiliares y la capacidad técnica de los operarios.

La práctica más utilizada es el secado en bastidores, estirando el cuero sobre un marco y dejándolo secar a la sombra o al sol. A medida que el cuero se va secando, se contrae y endurece quedando plano, permitiendo una buena circulación de aire durante este proceso.

Cuando las pieles deben doblarse para su embalaje, deben ser plegadas justamente antes de que hayan alcanzado su estado seco final ya que el plegado de pieles muy duras provoca el agrietamiento y la rotura de las fibras.

### **Salado.**

Comúnmente utilizado en zonas de clima templado, el sistema de conservación por salado es empleado en plantas frigoríficas y por comerciantes en cueros de gran escala.

El cuero fresco que proviene directamente de la plataforma de faena es llevado a la bodega de cueros y colocado en una estiba de sal. Los cueros se colocan planos en la pila y se doblan en los bordes para mantener la humedad. La sal se esparce de modo tal que queda entre cada par de cueros, necesitándose aproximadamente un kilo de sal por cada kilo de cuero fresco (**Figura 1.2**).



**Figura 1.2.** Curado o conservación de cueros: salado.

Una vez finalizado el curado (alrededor de 21 días de estiba o más), los cueros son sacados uno por uno, se les sacude el exceso de sal y son inspeccionados por los compradores. Luego los cueros se enfardan y pesan para su expedición.

Los cueros curados correctamente por este método se conservan hasta un año sin refrigeración, a temperatura moderada en lugares frescos, pero lo más frecuente es que los cueros salados sean procesados en las curtiembres tan pronto como se los recibe.

### **Salmuerado.**

Existen varios sistemas de salmuerado pero en la actualidad, el más importante es el que se utiliza para los cueros pesados de frigorífico.

Los cueros recibidos directamente de las plataformas de faenados son enviados a través de una máquina enfriadora para limpiarlos, siendo luego llevados a una máquina descarnadora. Esta operación se ve favorecida por el enfriamiento del cuero, el cual ha producido el endurecimiento de las grasas. Los cueros descarnados se remojan en salmuera saturada, ya sea en cubas o tinas, durante 48 horas o más.

A continuación se retiran los cueros y se escurren en una máquina o prensa, se los examina y se agrega una pequeña cantidad de sal protectora adicional. Luego se enfardan y se procede a despacharlos a destino.

Sin embargo, hay que destacar que el salmuerado no resulta tan efectivo como el salado convencional con respecto a la efectividad de la conservación de los cueros. Bajo circunstancias normales permite la conservación durante algo más de seis meses, pero no se puede proceder al almacenamiento durante períodos prolongados.

En la actualidad, estas metodologías de conservación están siendo lentamente reemplazadas por operaciones de conservación a corto plazo. Es decir, la conservación con sal sería un paso innecesario que podría eliminarse procesando de inmediato los cueros. Por lo tanto, una operación de este tipo puede ubicarse cerca de la fuente de origen de los cueros para tener la ventaja de la eliminación del curado.

### ***OPERACIONES DE RIBERA.***

La sección o taller de ribera abarca el tramo de la curtiduría que transcurre entre el retiro de las pieles o cueros del lugar de almacenamiento y su preparación para el curtido propiamente dicho.

Las operaciones de ribera constituyen el tramo más desagradable en la fabricación del cuero debido a la necesidad de utilizar sustancias malolientes, pero tienen una enorme importancia en la calidad final del cuero.

Para poder comenzar en forma óptima con estas operaciones es esencial realizar el DESCARNADO de la piel, el cual consiste en la eliminación mecánica de la grasa natural, del tejido conjuntivo y de los restos de carne que hayan quedado adheridos a la piel. Luego, el material se encuentra listo para continuar con las etapas del proceso de fabricación de cueros.

El taller de ribera incluye cinco pasos principales que se conocen como reverdecimiento, encalado (depilado), desencalado, purgado y “picklado”. Estos son comunes a todos los tipos de cuero que se producen, con variaciones importantes según el tipo de producto que se desee fabricar.

### **Reverdecimiento o remojo.**

Los cueros que se reciben en las curtiembres se encuentran en un estado de conservación basado en la deshidratación, ya sea por secado, salado o salmuerado.

Para poder realizar las operaciones subsiguientes resulta necesario remojar de nuevo a los cueros para tornarlos flácidos (estado en el que suelen denominarse “pieles en tripa”). Antes de dar comienzo al proceso de elaboración los cueros se recortan removiendo canillas, patas, colas y otros apéndices pequeños que pueden interferir en el correcto funcionamiento de las máquinas.

Por lo general, el reverdecimiento se logra sumergiendo las pieles en agua que puede contener algún aditivo. El agregado de una pequeña cantidad de sulfuro de sodio, tetrasulfuro de sodio u otras sustancias al remojo antes del depilado permite dar comienzo a esta última operación provocando una acción química sobre la queratina del folículo. Además, estos aditivos ayudan a la eliminación de las proteínas globulares blandas, lo cual también tiene relación con la eliminación de los pelos finos. Si estas proteínas no se eliminaran antes de proceder al curtido, interferirían en el proceso creando problemas técnicos.

Por lo tanto, las finalidades de este proceso son:

1. Ablandar los cueros deshidratados de modo tal que se asemejen a los de animales recién sacrificados, recobrando así su estado inicial.
2. Quitar la sangre, estiércol, tierra y otras impurezas no eliminadas durante la desecación.

3. Quitar la sal que impide la hinchazón de los cueros y ejerce influencias indeseables sobre los procesos posteriores.
4. Facilitar la penetración de las sustancias químicas en procesos posteriores provocando la ligera hinchazón que se conoce como “esponjado” ó “esponjamiento”.

Durante esta etapa pueden utilizarse agentes desinfectantes con el objetivo de evitar el deterioro bacteriano. Se recomienda el uso de compuestos aromáticos clorados ya que estos no interfieren en el proceso del depilado.

En la práctica actual el remojo de las pieles se efectúa en un período tan corto que el deterioro de este tipo ya no constituye un problema tan grave.

### **Encalado (depilado).**

Los cueros o pieles reverdecidos quedan en condiciones de pasar al tramo siguiente de la industrialización denominado encalado, con la finalidad de provocar el pelado.

La depilación de cueros y pieles puede efectuarse siguiendo distintos métodos, aunque todos se relacionan con la química del pelo. Esta operación se denomina encalado debido a que la principal sustancia que se utiliza es la lechada de cal, aunque también pueden emplearse otras sustancias como sulfuro sódico e hidrosulfuro sódico, sulfuro de arsénico, sales amónicas, enzimas, etc.

Las finalidades de este proceso son las siguientes:

1. Destruir o ablandar la epidermis para que se desprenda el pelo o lana.
2. Destruir las glándulas sudoríparas, nervios, venas y vasos sanguíneos.
3. Ablandar y destruir los tejidos interfibrilares que mantienen unidas las fibrillas.
4. Hinchar las fibras y fibrillas para facilitar la penetración de las materias curtientes.
5. Hinchar y esponjar la carne y tejidos conjuntivos laxos en la cara de la carne para facilitar su posterior eliminación.

La cal actúa sobre las proteínas produciendo su hidrólisis, el desdoblamiento gradual y su solubilización en forma de moléculas cada vez más pequeñas.

El agregado de un álcali (proceso a pH 12,5) provoca la solubilización de la queratina del pelo sin acción química nociva sobre el colágeno formador del cuero, siendo lo dicho la base de la mayoría de los sistemas de depilación con cal.

La elastina, otro componente principal de las proteínas del cuero, tiene escasa tendencia a la solubilización por el encalado. Su eliminación se realiza con posterioridad durante el purgado.

Por otra parte, la presencia de álcali en la piel ayuda a la saponificación de las grasas naturales.

### **Desencalado.**

El cuero encalado (pH 12,5) es una red tridimensional de fibras que han absorbido álcali en forma de cal y otras sustancias, por lo tanto, el proceso de desencalado tiene la finalidad de solubilizar el hidróxido de calcio absorbido llevando la piel hasta el pH deseado para el purgado (pH de 7 a 8).

El proceso debe tener lugar en forma gradual, manteniendo bajo control el pH, de manera de no dañar las fibras y por ende la calidad del cuero final.

El calcio tiene una buena solubilidad en sulfato de amonio o cloruro de amonio. En presencia de hidróxido de calcio y de las sales de amonio, el pH de la solución es modificado entre 7 y 8 resultando en una buena solubilidad de la cal que es eliminada de la piel por difusión con mínimos efectos de hinchamiento del cuero. Para obtener un desencalado mayor se agrega ácido clorhídrico, que ayuda a clarificar la superficie al disolver el hidróxido de calcio.

Esta parte del proceso es de gran importancia para la remoción de grasas (jabones de calcio de limitada solubilidad) permitiendo realizar de manera exitosa la siguiente etapa, el purgado.

### **Purgado.**

El purgado es otro paso más en la purificación (limpieza) del cuero antes de su curtido y consiste en la acción de ciertas enzimas.

En la práctica se emplea una cantidad muy baja de enzimas y se controlan estrictamente las condiciones del medio en el que deben actuar. Las enzimas deben aplicarse siguiendo con sumo cuidado las recomendaciones de los fabricantes con el objetivo de no producir cueros de calidad deficiente.

Una vez que el purgado ha llegado al punto deseado y la piel puede soportar la acción mecánica, conviene lixiviar las sustancias químicas y los productos de degradación con el propósito de detener la acción enzimática. Esto se consigue pasando las pieles por un tambor o paleta con un flujo continuo de agua hasta que el baño quede transparente y la temperatura llegue a un nivel deseado que por lo general es de unos 18 ° C.

Esta operación deja el cuero en condiciones óptimas para continuar con el siguiente paso, el picklado.

### **Picklado.**

El “picklado” consiste en el tratamiento del cuero con sal y ácido (por ejemplo cloruro de sodio - ácido sulfúrico) para que la piel adquiera, nuevamente, el pH deseado para el curtido o para su conservación. El ácido genera lugares activos para la fijación del cromo y es necesario porque los agentes curtientes de cromo no son solubles en condiciones alcalinas. La sal previene el hinchamiento del colágeno.

Al finalizar esta operación, la cual transcurre a un pH ácido (pH de 2 a 4) se tendría una red purificada de proteína del cuero.

Muchas de las operaciones de ribera se realizan procesando los cueros en grandes fosos, tinas o tambores. Las soluciones se trasladan a los recipientes a través de tuberías o se vierten directamente en los mismos. Los productos químicos pueden añadirse a los recipientes mediante dichas tuberías o manualmente. Se necesita una buena ventilación y equipo de protección personal para evitar la exposición respiratoria y dérmica.

### ***PROCESO DE CURTIDO.***

El curtido es el proceso a través del cual los cueros y pieles de animales se convierten en materiales más resistentes a la descomposición. Este proceso puede realizarse de diferentes maneras, es decir, utilizando sustancias de origen vegetal (taninos naturales) ó sintético (taninos sintéticos o aldehídos), sustancias como el cromo, entre otras.

El curtido al cromo se ha difundido con extraordinaria rapidez, convirtiéndose en el método más común para curtir cueros. Esta metodología debe acompañarse de procesos adicionales de terminación (acabado del cuero) para producir un producto final utilizable. Sus ventajas principales son la gran velocidad del sistema, su bajo costo, la obtención de un cuero de color claro y con sus proteínas en excelente conservación.

El descubrimiento del curtido al cromo se atribuye a Knapp en 1858 y la primera producción comercial de cuero al cromo la obtuvo Augustus Schultz en Nueva York en el año 1884 mediante un sistema por el cual las pieles se trataban con dicromato ácido, que luego se reducía hasta su estado trivalente en verde (curtición de dos baños).

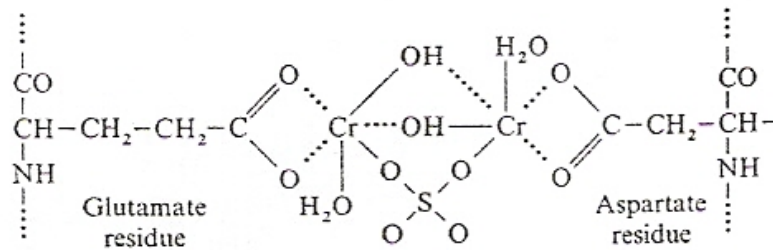
En la actualidad el curtido al cromo se realiza mediante el proceso de un solo baño en fulones de gran capacidad, basado en la reacción entre el cuero y una sal de cromo trivalente como el sulfato de cromo básico ( $\text{CrOH}\text{SO}_4$ ).

En la **Figura 1.3** se observan los fulones empleados durante el proceso productivo del cuero.



**Figura 1.3.** Fulones para curtido al cromo.

Las pieles en un estado “picklado” (pH alrededor de 2) se introducen en las sustancias de curtido. Luego de una penetración adecuada y de una absorción inicial de una parte de la sal de cromo, el pH se eleva (pH alrededor de 4) provocando alteraciones y produciendo una reacción entre las sales de cromo (complejos de cromo catiónicos) y los grupos carboxilos de los aminoácidos ácidos de las proteínas del cuero (**Figura 1.4**).



**Figura 1.4.** Reacción de los complejos de cromo catiónicos con los grupos carboxilo de los ácidos glutámico y aspártico.

Finalmente, el cuero se retira de la solución y el exceso de agua se elimina por ESCURRIDO. El cuero al cromo debe neutralizarse después de curtirse.

El producto final es el cuero curtido al cromo, llamado *wet blue* por su característico color azulado (**Figura 1.5**).



**Figura 1.5.** Aspecto característico del cuero luego del curtido al cromo (*wet blue*).

La química del proceso de curtido al cromo es complicada y su equilibrio se logra mediante el control de las condiciones de temperatura (que puede estar entre los 46-52°C debido a la acción mecánica), pH y sustancias usadas durante el mismo. Es fundamental entonces, la destreza del curtidor en el manipuleo de los factores intervinientes.

Finalmente, el cuero se **DIVIDE** pasándolo a través de una cuchilla que separa la capa de flor (lado externo del animal) del descarne (lado interno del animal) y se **REBAJA** (operación mecánica que se utiliza para dar un espesor final).



## **ACABADO DEL CUERO.**

Una vez curtido, el cuero es procesado para darle forma y acondicionarlo. Se lo clasifica, se define el artículo y se obtiene un material que, por contar con la humedad de estabilización final, no cambia con el tiempo. En general, este proceso incluye diferentes operaciones como ser:

### **Teñido (recurtido).**

Después del curtido, la mayoría de cueros, salvo los destinados a suelas de zapatos, se someten a coloreado (tintura). Se emplean tres tipos principales de tintes: ácidos, básicos y directos. Se utilizan mezclas de tintes para obtener el matiz exacto deseado, por lo que la composición no es siempre conocida, salvo por el proveedor.

Los fabricantes de colorantes han realizado profundas investigaciones y sus productos se describen en la literatura comercial indicando rasgos de penetración, la compatibilidad con diversos agentes curtientes y la estabilidad al desteñido bajo diversas condiciones.

### **Lubricación.**

La correcta lubricación de las fibras de cuero constituye uno de los factores más importantes para determinar las características del mismo, tanto desde el punto de vista utilitario como del estético. Se emplean aceites, grasas naturales, aceites minerales y varias grasas sintéticas. El aceitado tiene como finalidad lubricar el cuero para darle resistencia y flexibilidad.

### **Secado.**

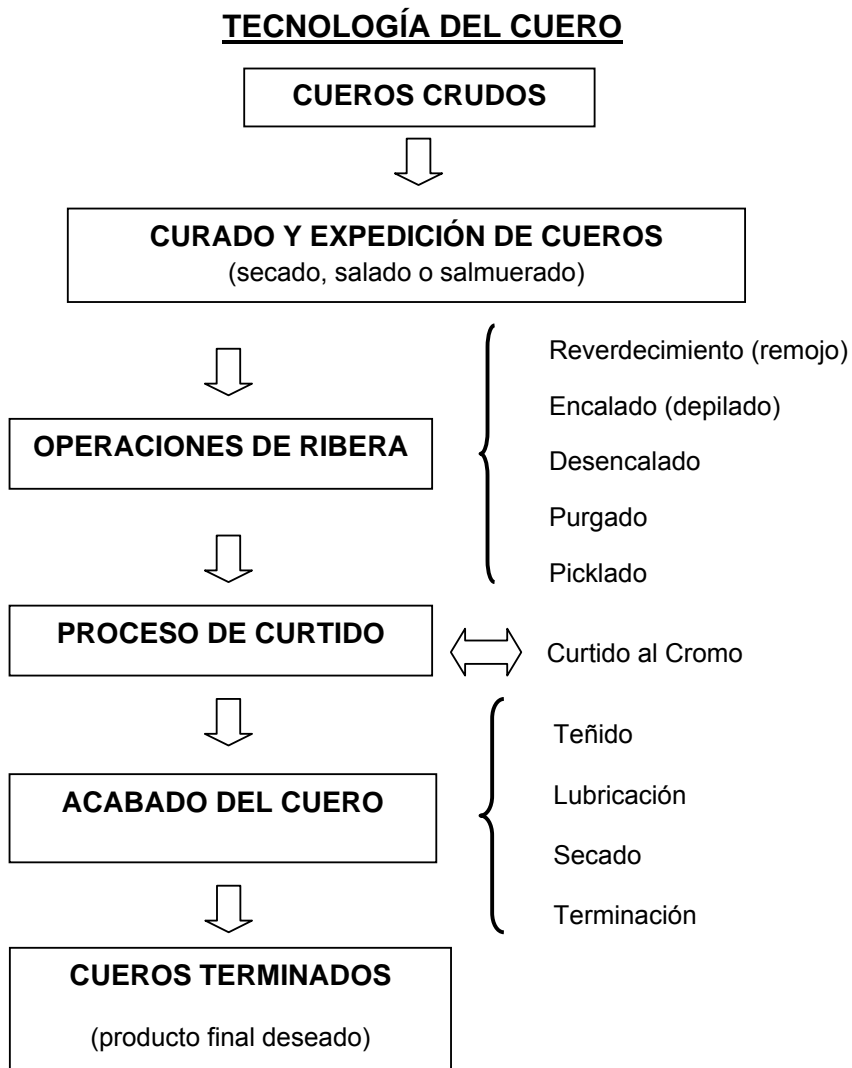
Las operaciones de curtido, el teñido y la lubricación del cuero son completadas por el secado. Este proceso es algo más que la simple eliminación de la humedad para permitir la utilización práctica del cuero, ya que fija efectivamente las sustancias en su interior y, por lo tanto, constituye un paso muy importante para la calidad final del producto.

### **Terminación.**

Los procesos de terminación del cuero consisten en diversas y variadas operaciones que tienen como finalidad no solo cubrir los errores de las operaciones previas, sino también aumentar su durabilidad y embellecerlo. La terminación constituye un paso fundamental para que la industria produzca cueros de mayor belleza y calidad. En este punto, el

producto está en condiciones de ser empleados directamente por los sectores manufactureros.

En la **Figura 1.6** podemos apreciar las diferentes etapas antes descritas de manera sintética y ordenada.



**Figura 1.6:** Etapas del proceso de elaboración del cuero.

### 1.3 HONGOS: LEVADURAS Y MOHOS

Los cueros son materiales sensibles a la degradación por microorganismos. En las primeras etapas del proceso de producción (hasta el picklado) el daño a los cueros es causado principalmente por bacterias como *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomona*, *Proteus* y *Escherichia* (Orlita A, 2004). Esta situación se encuentra, en la mayoría de los casos, bien controlada y generalmente no constituye un problema tan serio para el sector. En cambio, luego del curtido de los cueros, los hongos son la causa principal del deterioro de estos materiales, de la disminución de la calidad y del valor económico del cuero terminado. Estos microorganismos constituyen uno de los grupos dominantes responsables de la degradación de biopolímeros y de otros materiales orgánicos. Existen muchísimas especies de hongos capaces de atacar diversos materiales en diferentes grados, dependiendo esto, no solo de la composición específica del sustrato sino también de los atributos fisiológicos específicos de los microorganismos involucrados.

Como se dijo anteriormente, estos microorganismos resultan de gran importancia para el control microbiológico en la industria de la curtiembre. Varias especies de hongos pueden desarrollar en las distintas etapas del proceso de manufactura de cueros. Por esta razón, el enmohecimiento es un problema muy particular que puede causar serios inconvenientes, como por ejemplo la decoloración y la putrefacción de los mismos. Algunos de los géneros involucrados en esta problemática incluyen a *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Scopulariopsis*, *Candida*, entre otros. Es importante destacar que, la colonización de algunas especies de hongos en los cueros es frecuentemente limitada por la presencia de *Aspergillus* o *Penicillium* (microorganismos de elevado poder de síntesis). Pero en ausencia de los mismos, las demás especies pueden atacar y destruir el cuero con gran facilidad (Orlita A, 2004).

A continuación se explicarán los fundamentos teóricos elementales para conocer mejor a estos microorganismos y para comprender sus cualidades estructurales y fisiológicas.

### **1.3.1 Características Generales**

La palabra HONGOS deriva del griego: *mikes* y del plural latino: *fungi*. El término incluye una gran variedad de tipos celulares con diferentes formas, macroscópicos o microscópicos, móviles o inmóviles, parásitos o saprófitos.

Los hongos son organismos eucarióticos, constituidos por células que poseen orgánulos membranosos y núcleo rodeado por membrana. Se caracterizan porque no poseen clorofila, por lo que no pueden realizar fotosíntesis. Debido a que sólo utilizan el carbono de compuestos orgánicos se consideran heterótrofos.

Otra de sus características es que se nutren únicamente por absorción ya que sólo son capaces de incorporar nutrientes simples solubles.

Todos los hongos se reproducen de manera asexual o agámica. Algunos presentan, además, reproducción sexual, siendo considerados como hongos perfectos. Cuando un hongo es capaz de reproducirse sexualmente, las características de dicha reproducción se vuelven muy importantes para su identificación y clasificación taxonómica (Madigan MT y col, 2004).

### **1.3.2 Rol de los hongos en la Naturaleza**

Tienen gran facilidad para adaptarse a diferentes ambientes por lo que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo su hábitat muy diverso. Algunos son acuáticos, pero la mayoría son terrestres.

Tienen gran importancia para los seres humanos, tanto en términos de beneficio como de perjuicio. Cumplen un rol fundamental en el ciclo de la materia participando del proceso de biodegradación, permitiendo el reciclado natural de algunos elementos necesarios para la vida.

La mayoría de los hongos son saprófitos, lo que significa que utilizan materia orgánica muerta para su desarrollo y reproducción. Pueden degradar madera, lignina, vegetales, quitina, queratina, grasas, aceites, fenoles, asfalto, neumáticos, cera, huesos, almidón, pectinas, proteínas, polímeros, etc.

Algunos hongos, comestibles (como los champiñones), forman parte de la dieta. Otros, son indispensables para la maduración de ciertos quesos (roquefort, camembert, etc.) o son esenciales para la elaboración de alimentos y bebidas tales como el pan, la cerveza y los vinos. Los denominados hongos fitopatógenos son parásitos de vegetales.

Unos pocos son capaces de infectar a los animales, insectos y parásitos. En el hombre, producen enfermedades que se conocen como micosis. También son responsables de cuadros de alergia y de intoxicaciones de origen alimenticio.

Como se describirá más adelante, tienen muy pocos requerimientos nutricionales, por lo que pueden desarrollar sobre diferentes sustratos, lo que les permite causar, por ejemplo, el biodeterioro de los alimentos (son capaces de desarrollar aún a temperatura de heladera), instrumental óptico, todo tipo de papel, cuero y maderas.

Durante su digestión, producen sustancias orgánicas de vital importancia conocidas como metabolitos. Los denominados metabolitos primarios son los que les brindan la energía necesaria para crecer y multiplicarse. Los metabolitos secundarios no son necesarios para el crecimiento del organismo que los produce, sino que poseen una función específica. Actualmente, ciertos metabolitos secundarios son utilizados en la biotecnología de los alimentos, bebidas y en la industria farmacéutica (antimicrobianos). Otros metabolitos secundarios, las micotoxinas, pueden enfermar al hombre y los animales provocando intoxicaciones agudas, subagudas o, en la mayoría de los casos, crónicas (Prescott LM y col, 2004).

### **1.3.3 Características Fisiológicas**

- **Requerimientos Nutricionales**

Los hongos no son exigentes desde el punto de vista nutricional. Los requerimientos básicos para su desarrollo incluyen: un compuesto orgánico, que les sirve como fuente de energía y de carbono, nitrógeno orgánico o inorgánico, varios minerales y, en algunos casos, vitaminas. Otros elementos que demandan son magnesio, fósforo, azufre y potasio.

- **Temperatura**

Son capaces de desarrollar dentro de un amplio rango de temperaturas: desde  $< 0^{\circ}\text{C}$  -  $60^{\circ}\text{C}$ . La temperatura óptima de crecimiento se encuentra en el rango de  $25 - 35^{\circ}\text{C}$ , según del tipo de hongo de que se trate.

- **Condiciones de pH**

En general, no son afectados apreciablemente por los cambios en el pH del sustrato sobre el cual desarrollan y casi todas las especies pueden crecer dentro de un amplio rango de valores que abarca desde 2 a 10. El pH óptimo de desarrollo generalmente se encuentra entre 5,5 - 7,5.

- **Relación hacia el Oxígeno**

La mayoría son aerobios estrictos. Algunos pueden desarrollar con concentraciones muy bajas de oxígeno (microaerófilos) y, algunos pocos son anaerobios.

- **Actividad Acuosa**

Como todos los organismos vivos, los hongos son afectados por la disponibilidad de agua en el sustrato sobre el cual desarrollan. La actividad acuosa ( $a_w$ ) es un parámetro estrechamente ligado a la humedad de un sustrato que nos permite, al igual que la temperatura y el pH, estimar la posibilidad de propagación microbiana. Así, algunos hongos denominados xerófilos desarrollan con  $a_w$  menores a 0.85.

- **Luz**

Crecen con longitudes de onda correspondientes al espectro visible.

### **1.3.4 Estructura y Composición Química**

Básicamente la estructura y composición química de una célula fúngica es similar al resto de las células eucarióticas.

A continuación sólo se describirán la pared celular y la membrana citoplasmática que son las estructuras que presentan mayores diferencias.

- **Pared Celular**

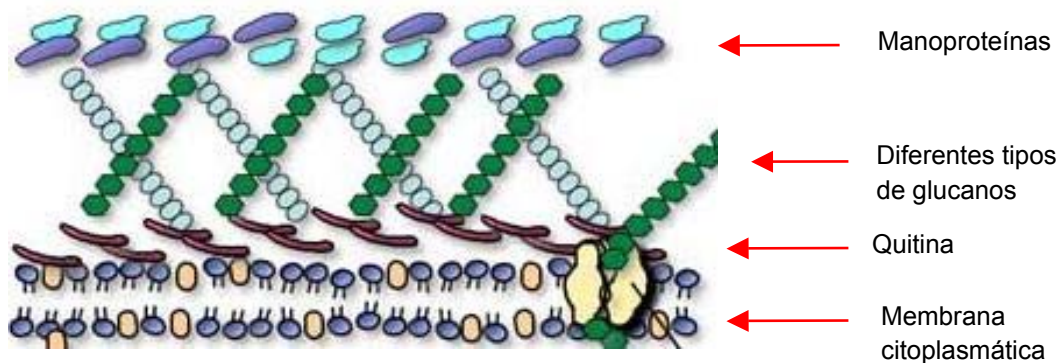
Los hongos poseen una pared celular rígida, de estructura pluriestratificada, dispuesta en capas (**Figura 1.7**). Está compuesta en un 80% o más por hidratos de carbono (en la mayoría de los casos, la quitina es el componente cuantitativamente más importante).

Fundamentalmente, en la pared celular fúngica se pueden diferenciar: fibrillas y matriz cementante. Las microfibrillas actúan a manera de barras rígidas que protegen la integridad de la célula. Los polisacáridos fibrilares más importantes son: la quitina, presente en la mayoría de los hongos y los glucanos, presentes en levaduras.

La matriz cementante permite la organización de la pared celular. Los compuestos cementantes son polisacáridos pequeños (diferentes a los fibrilares), proteínas, lípidos y pigmentos (responsables del color).

La composición química de las paredes fúngicas, es útil para clasificar a los hongos.

Entre las funciones que cumple la pared celular, se destacan: determinar la forma de la célula, actuar como interfase entre el hongo y el ambiente, proteger al hongo de la lisis osmótica y de metabolitos producidos por otros microorganismos. También, es el sitio de unión para algunas enzimas y posee, en algunos casos, propiedades antigénicas (Tortora GJ y col, 2007).



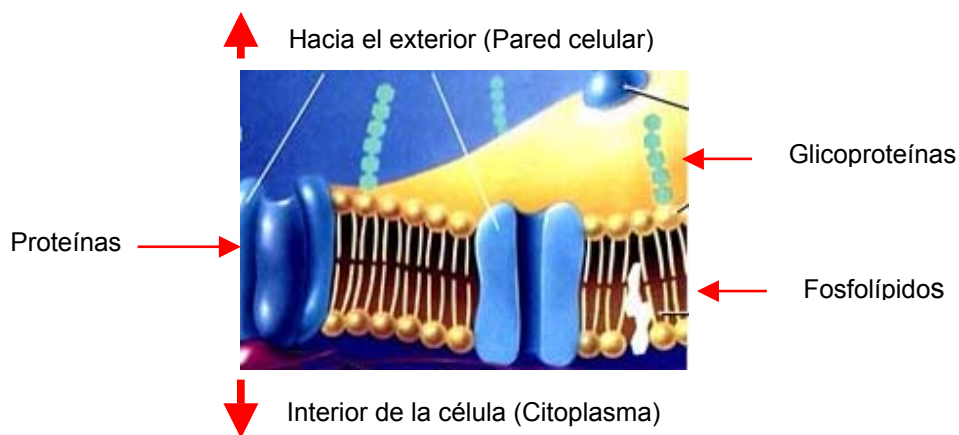
**Figura 1.7.** Pared celular fúngica. Representación esquemática.

- **Membrana Citoplasmática**

Inmediatamente por debajo de la pared celular se encuentra la membrana plasmática (**Figura 1.8**). De manera semejante a otras células, la membrana plasmática de los hongos está compuesta por una doble capa fosfolipídica.

Los principales lípidos que la constituyen son: fosfolípidos y esfingolípidos. Entre los esteroides el más importante es el ergosterol.

Además de los lípidos, se encuentran proteínas (en igual proporción a los lípidos) y pequeñas cantidades de carbohidratos. Algunas de las proteínas presentes juegan un rol estructural pero la mayoría son permeasas (permiten el ingreso y egreso de moléculas).



**Figura 1.8.** Membrana plasmática de hongos. Representación esquemática.

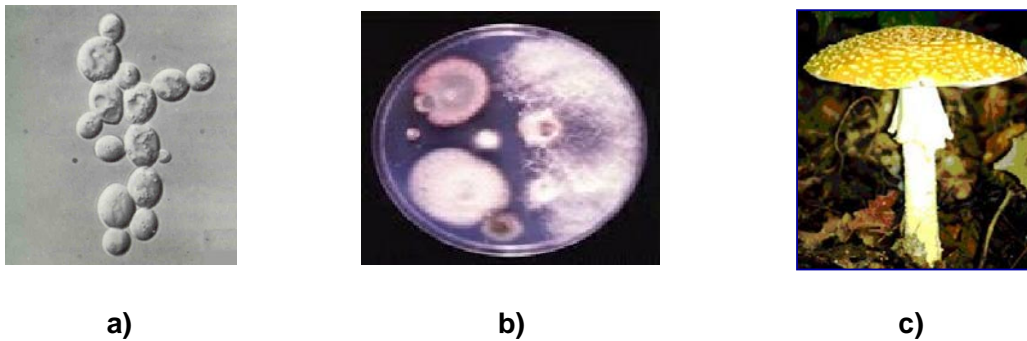
Entre las funciones de la membrana plasmática se destaca la permeabilidad selectiva ya que regula el pasaje de materiales desde afuera hacia adentro de las células y viceversa, y permite a la célula mantener una composición química celular distinta a la del medio donde se encuentra.

La membrana plasmática es un compartimiento esencial para la vida. En algunas etapas de su vida, ciertos hongos pueden carecer de pared celular. En esos casos, la membrana actuaría en su reemplazo (Tortora GJ y col, 2007).



### 1.3.5 Morfología

En la naturaleza pueden encontrarse hongos con morfologías muy variadas. Existen formas muy simples como los hongos levaduriformes o levaduras, otros con formas filamentosas multinucleadas u hongos filamentosos o mohos y los denominados “hongos de sombrero” quienes presentan estructuras macroscópicas más complejas (**Figura 1.9 a-c**).



**Figura 1.9.** Morfología de **a)** hongos levaduriformes, **b)** hongos filamentosos o mohos y **c)** hongos de sombrero.

La descripción de un hongo, cualquiera sea su morfología, debe efectuarse según sus características macroscópicas (lo que se observa a simple vista y con lupa estereoscópica) y sus características microscópicas (formas al microscopio óptico). Sin embargo, es importante destacar que estas características muchas veces son insuficientes y deben complementarse con otros estudios, por ejemplo: la fermentación de azúcares, la producción de algún metabolito de utilidad como el ácido cítrico o perjudicial para la salud, como alguna micotoxina.

## 1.4 ANTIFÚNGICOS: SUS PRINCIPALES GRUPOS

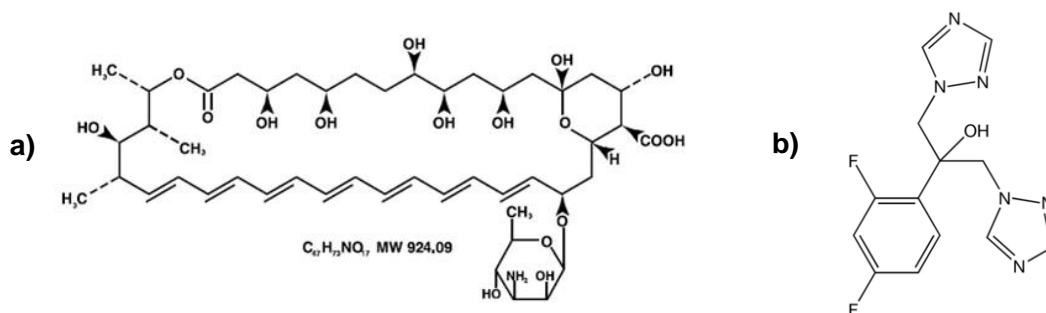
Bajo la denominación general de antifúngicos o antimicóticos se incluye a una gran variedad de sustancias químicas que alteran una o varias funciones bioquímicas de los hongos (compuestos fungistáticos o fungicidas).

Los antifúngicos pueden ser considerados de “primera generación” cuando derivan de productos naturales o también de la actividad metabólica de determinados microorganismos, ó de “segunda generación”, si para su obtención debemos recurrir a la síntesis química.

La clasificación de estos compuestos puede realizarse según criterios que atienden a sus características estructurales, origen, espectro de acción, mecanismos o sitios de acción, vía de administración, selectividad y toxicidad.

Aplicando entonces dichos criterios, podemos mencionar distintos grupos de antimicóticos clasificados en base a los sitios en donde actúan. Por ejemplo, a aquellos que inhiben la síntesis de la pared celular (equinocandinas y nikomicinas), a los que actúan sobre la membrana plasmática (polienos, azoles, alilaminas, terbinafinas, amorolfinas), a los que inhiben la síntesis de proteínas (sordarinas) y a los que bloquean la síntesis de ADN (griseofulvina y 5-fluorocitosina). Todos estos compuestos son de uso medicinal y de gran utilidad para el tratamiento de diversos tipos de infecciones fúngicas (Madigan MT y col, 2004; Prescott LM y col, 2004; Tortora GJ y col, 2007).

En la **Figura 1.10 a-b** se muestran, a modo de ejemplo, dos antifúngicos ampliamente utilizados en la actualidad.



**Figura 1.10.** Algunos antifúngicos de uso medicinal: **a)** Amfotericina B (polieno), **b)** Fluconazol (azol).

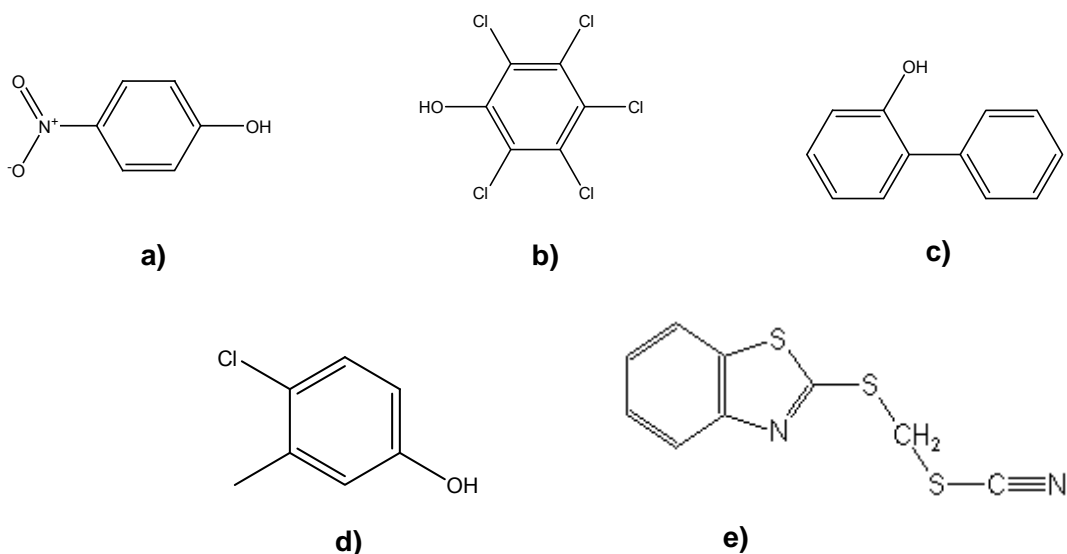
Sin embargo, para el controlar el crecimiento fúngico en la industria curtidora se emplean diferentes sustancias químicas efectivas como biocidas pero inaplicables desde el punto de vista médico.

Durante muchas décadas se utilizaron sustancias como el *p*-nitrofenol (PNP) y el pentaclorofenol (PCP) en el proceso de manufactura del cuero pero, desafortunadamente, sus propiedades toxicológicas y su pobre biodegradabilidad causaron la baja de estos productos como fungicidas comerciales (Orlita A, 2004).

Para la industria del cuero existen microbicidas con distintos mecanismos de acción, por ejemplo sustancias activas en membranas como son los derivados de fenol tales como el *o*-fenilfenol (OPP) y el *p*-cloro-*m*-cresol (PCMC), o bien sustancias electrofílicas activas como el TCMTB o la *N*-octil-isotiazolina (NOIT). Con respecto a los primeros, su mecanismo de acción se basa en procesos reversibles sobre la membrana celular, procesos que no implican consumo de sustancia activa. En cambio, la acción antimicrobiana de los microbicidas electrofílicos se basan en reacciones irreversibles con componentes nucleofílicos de la célula microbiana que llevan a la inactivación de la sustancia activa. Esto que parece una desventaja resulta en una clara ventaja cuando se pretende que el microbicida, cumplida su función, no perdure. Por esta razón, aunque su uso presente muchas otras desventajas, el TCMTB compite favorablemente con los derivados fenólicos (Asociación Argentina de Químicos y Técnicos de la Industria del Cuero, 1992).

En consecuencia y de manera ideal, cualquier biocida que pretenda ser usado en la industria curtidora debería reunir ciertas propiedades como ser: elevada actividad biológica, amplio espectro antimicrobiano, compatibilidad con los procesos de "picklado" y curtido, estabilidad en el cuero, no decolorar el material, medioambientalmente aceptable, de baja toxicidad para humanos y animales de sangre caliente y económico.

Algunos agentes biocidas empleados en la industria del cuero se presentan en la **Figura 1.11 a - e**.



**Figura 1.11.** Antifúngicos empleados en la industria del cuero: **a)** *p*-nitrofenol (PNP) , **b)** pentaclorofenol (PCP), **c)** *o*-fenilfenol (OPP), **d)** *p*-cloro-*m*-cresol (PCMC), **e)** 2-(tocianometiltio)benzotiazol (TCMTB).

Por último, debemos considerar que la creciente incidencia de las infecciones causadas por los hongos se ve reflejada en un mayor empleo de antifúngicos. Los problemas de seguridad y de toxicidad, a los que se añaden los relativos a fenómenos de resistencia, mantienen vigente la necesidad de profundizar en el desarrollo de nuevos antifúngicos que aporten ventajas apreciables respecto a los ya existentes.

## 1.5 OBJETIVO GENERAL

En virtud de estos antecedentes, el interés académico-tecnológico del presente trabajo es generar una nueva librería de antifúngicos diméricos de la familia *gemini*. Estas moléculas tienen como objeto contribuir al desarrollo de productos aplicables en la conservación de cueros, ocasionando al medioambiente el menor daño posible. Dichos compuestos tienen como finalidad intentar reemplazar a los ya existentes o bien actuar como sinergisantes de los mismos, reduciendo la cantidad empleada habitualmente y contribuyendo de manera favorable con los seres vivos.

### 1.5.1 Objetivos Específicos

- Estudiar la síntesis de nuevas moléculas diméricas tipo *gemi*ni con la funcionalidad  $\beta$ - hidroxil amino/amonio y la presencia de un grupo funcional amino acetil, derivadas de aminas primarias y terciarias de longitud de cadena variable (C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>) y de aminas grasas terciarias de diferente naturaleza (insaturada y perfluorada). Optimizar sus procesos de preparación.
- Desarrollar técnicas analíticas, de separación, filtración y purificación para los compuestos intermedios y los productos finales.
- Estudiar sus propiedades fisicoquímicas a través de las medidas de tensión superficial.
- Estudiar sus propiedades biológicas diseñando protocolos de análisis *in vitro* que permitan evaluar la eficacia de las nuevas moléculas sintetizadas frente a cepas de referencia.
- Seleccionar los *gemi*ni de mejor desempeño.
- Sintetizar a gran escala los *gemi*ni seleccionados, optimizando el proceso de preparación de los mismos.
- Realizar pruebas de eficacia en cueros.
- Recomendar los *gemi*ni al sector productivo.

## 1.6 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 1

- ✓ Asociación Argentina de Químicos y Técnicos de la Industria del Cuero. *Tecnología del Cuero*. Argentina, año 4 - N°14 (1992).
- ✓ Frankel AM. *Tecnología del Cuero*. Editorial Albatros. Argentina (1995).
- ✓ Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock. *Biología de los Microorganismos*. Pearson Prentice Hall. España (2004).
- ✓ Muthusubramanian L, Mitra RB and Sundara Rao VS. *2-(thiocyanomethylthio)-benzothiazole fungicide on leather: a review*. Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists. 82, 22-23 (1997).
- ✓ Orlita A. *Microbial biodeterioration of leather and its control: a review*. International Biodeterioration and biodegradation. 53, 157-163 (2004).
- ✓ Prescott LM, Harley JP, Klein DA. *Microbiología*. Mc Graw Hill. España (2004).
- ✓ Reemtsa T, Fiehn O, Kalnowski G and Jekel M. *Microbial transformation and biological effects of fungicide-derived benzothiazoles determined in industrial wastewater*. Environmental Science Technology. 29, 478-485 (1995).
- ✓ Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Introducción a la Microbiología*. Editorial Médica Panamericana. Argentina (2007).

## **CAPÍTULO 2**

### **“SÍNTESIS QUÍMICA DE NUEVOS BIOCIDAS DERIVADOS DE AMIDAS”**

## 2.1 SURFACTANTES: ASPECTOS GENERALES

Los surfactantes se encuentran entre las sustancias químicas más versátiles, pues tienen un amplio campo de aplicación, tanto en la industria como en el hogar. Están presentes en productos tan diversos como agentes lubricantes, anticorrosivos, agentes de flotación, acondicionadores textiles, formulaciones de agroquímicos, emulsificantes, detergentes, shampoos, cosméticos y fármacos, entre otros (Zhu Y y col, 1992).

Asimismo, sus aplicaciones en tecnologías emergentes han tenido una rápida expansión, como en biotecnología, bioquímica molecular, impresión electrónica, microelectrónica, medios de registro magnético, producción no convencional de energía, nuevos métodos para el control de la contaminación ambiental, y en nuevas técnicas de separación (Rosen MJ y col, 1989).

Estos usos tan diversos y a gran escala, y la creciente necesidad de surfactantes “a medida” para nuevas aplicaciones, han desencadenado en la última década una importante actividad de investigación en el campo de la química orgánica aplicada. A diferencia de lo sucedido en años anteriores, esta actividad no tiene como objetivo la producción de nuevas moléculas, sino de nuevas e interesantes propiedades (Menger FM y col, 2000; Menger FM y col, 2001).

En esta línea, no basta con acumular datos de nuevas familias de surfactantes, sino que se trata de dilucidar la relación entre las estructuras moleculares y las propiedades biológicas, desarrollando métodos específicos de preparación de nuevas estructuras intencionalmente prediseñadas sobre dicha base.

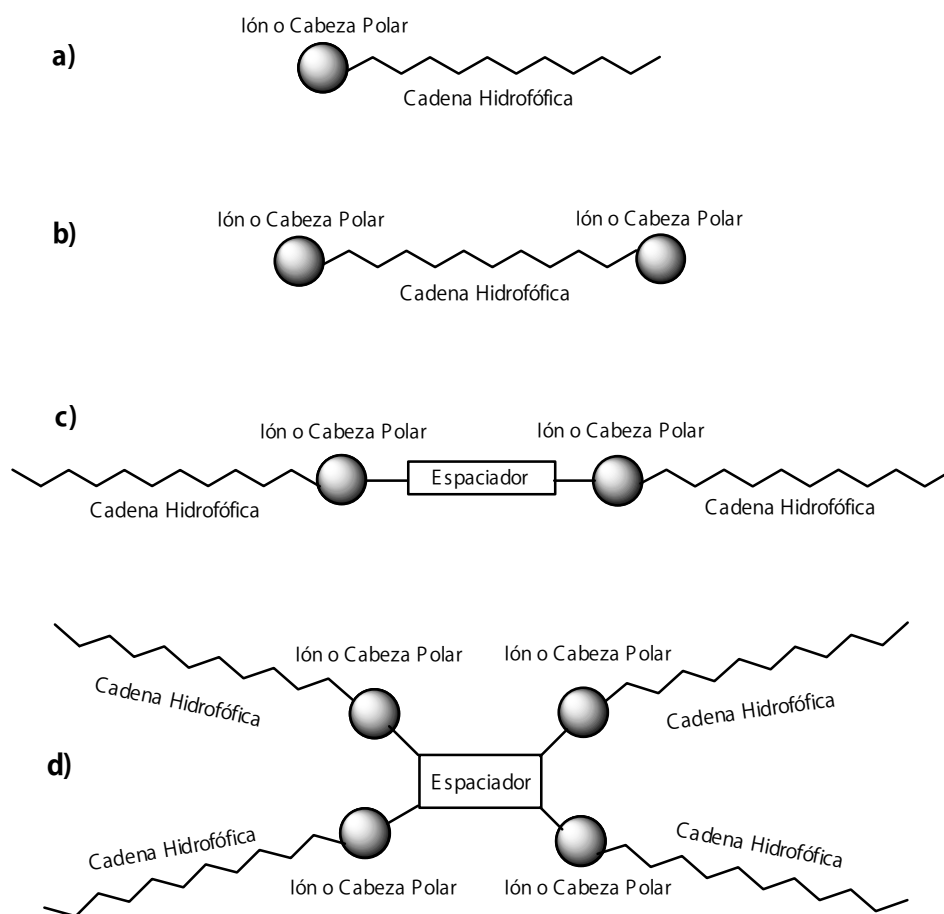
Se sabe que los surfactantes poseen una estructura anfipática, es decir, presentan grupos apolares o hidrofóbicos conectados a grupos polares o hidrofílicos. Estos compuestos han sido usualmente clasificados según la naturaleza de sus grupos polares como aniónicos (grupo iónico con carga negativa, por ejemplo alquilbencenosulfonato), catiónicos (grupo iónico con carga positiva, por ejemplo sales de amonio cuaternario), zwitteriónicos (grupos iónicos con cargas positivas y negativas, por ejemplo aminoácidos de cadena larga), y no iónicos (grupo polar sin carga iónica, por ejemplo alquilfenoles polioxietilenados) (Murguía MC y Grau RJ, 2001).



Una clasificación complementaria está surgiendo a la luz del desarrollo de nuevos surfactantes que poseen más de un grupo polar y más de una cola hidrofóbica.

Dependiendo de la cantidad de colas hidrofóbicas y de su disposición geométrica, cuatro grupos de surfactantes están siendo reconocidos (**Figura 2.1 a-d**):

- Surfactantes Convencionales: presentan la clásica estructura compuesta por una cola hidrofóbica y un grupo iónico o polar.
- Bolaform: presentan dos grupos hidrofílicos ubicados en los extremos de la molécula y unidos por una cadena hidrofóbica. Poseen excelentes propiedades activas de superficie así como también una notable actividad biológica. Pueden ser utilizados como agentes encapsulantes, tienen la habilidad de intercalarse en la membrana lipídica, dependiendo de su estructura, como un agente estabilizador o disruptor de la misma (Dubowchik GM y Firestone RA, 1996; Heeres EHJ y col, 2004).
- Surfactantes *gemin*: presentan, en secuencia, una cola hidrofóbica, un grupo iónico o polar, una molécula espaciadora, un segundo grupo iónico o polar y otra cola hidrofóbica. Su estructura dimérica tiene la particularidad de poseer una ordenada simetría geométrica manifestada en la posición que adopta el par de colas hidrofóbicas y grupos hidrofílicos, que están interconectados por un espaciador que puede ser largo o corto, rígido o flexible. Fueron denominados *gemin* en 1991 por Menger y colaboradores (Menger FM y Littau CA, 1993).
- Surfactantes Multiarmados Polivalentes: presentan una estructura compuesta por múltiples colas hidrofóbicas y varios grupos hidrofílicos, que están interconectados por un espaciador múltiple, rígido o flexible, y no son tan simétricos como los *gemin*.



**Figura 2.1.** Representación esquemática de los diversos grupos de surfactantes: **a)** Surfactante convencional; **b)** Bolaform; **c)** Surfactante *gemini*; **d)** Surfactante multiarmado polivalente.

Actualmente, los surfactantes pertenecientes a los tres últimos grupos están reemplazando a sus homólogos convencionales debido a sus notables propiedades activas de superficie, excelente biodegradabilidad, y favorables datos toxicológicos. Estos atributos han impulsado una creciente investigación en el campo del modelado molecular y de la química orgánica aplicada.

Los métodos para la preparación de esta clase de productos involucran sucesivas etapas de síntesis, no menos de tres. Polioles, hidratos de carbono, alcoholes grasos, y alquilglicósidos pueden ser usados entre otros compuestos orgánicos como materiales de partida para construcción del grupo conector. Alcoholes o ácidos grasos de variada longitud de cadena ( $C_4 - C_{18}$ ) son usualmente empleados como aportantes de las

cadena lipofílica. Por último, agentes capaces de generar grupos sulfonatos, sulfatos, fosfatos, carboxilatos o sales de amonio cuaternarias son utilizados para conferirles el carácter iónico.

En consecuencia, de los cuatro grupos de surfactantes mencionados y debido a sus destacables propiedades, es de nuestra elección trabajar con los denominados *gemini*. La naturaleza estructural que presentan estos compuestos y sus singulares propiedades de disolución les permiten, entre otras cosas, formar distintos tipos de interacciones, les confiere una alta actividad superficial, una mayor capacidad de interacciones hidrofóbicas intra e intermoleculares y además formar agrupaciones tridimensionales como micelas, vesículas o bicapas (Zhu Y y col, 1990 y Diamant H, 2003). En adición, estos compuestos oligoméricos cuentan con capacidades biocidas (Nouguier R y col, 2005), pueden generar disrupción sobre la membrana de microorganismos procariotas y eucariotas y provocar inhibición de enzimas esenciales para su desarrollo (Massi L y col, 2003 y Neetu Tewari VK y col, 2004).

Debido a todos estos antecedentes y a la creciente demanda de este tipo de compuestos a nivel mundial es nuestra intención generar una librería de antifúngicos de la familia *gemini* y estudiar sus propiedades tanto desde el punto de vista fisicoquímico como biológico con el objetivo de aportar al sector productivo (en este caso en particular a la Industria del Cuero) nuevas opciones o alternativas que les permitan desarrollar sus productos de manera más económica, ecológica y eficiente.

## **2.2 ESTRATEGIAS DE SÍNTESIS**

### **2.2.1 Grupo Funcional Amino-acetilo**

Según la bibliografía consultada, existen diferentes métodos para llevar a cabo acetilaciones. Entre estos, está el uso de cloruro de acetilo o ácido acético glacial. También pueden realizarse mediante la reacción de una amina, como por ejemplo dietanolamina, con metil o etil carboxilatos en metanol y en presencia de una cantidad catalítica de metóxido de sodio (Zhu Y y col, 1991). Otra manera de llevar a cabo la acetilación es a través de la reacción de la amina con anhídrido acético (Vogel AI, 1989). Este procedimiento con anhídrido acético es el método preferido para la síntesis en el

laboratorio debido a que es rápido, sencillo y de bajo costo. Además, nos permite obtener un producto de gran pureza y de alto rendimiento

En este caso en particular, es nuestro interés acetilar a la dietanolamina empleando anhídrido acético con el propósito de generar una molécula espaciadora versátil, a partir de la cual se generarán los surfactantes *geminis* con potencial actividad antifúngica.

### 2.2.2 Intermediario “llave”: éter diglicidílico

Una dificultad que frecuentemente se presenta cuando se quiere llevar a cabo reacciones de sustitución nucleofílica es que los reactantes no se mezclen. Típicamente, uno o más de los reactantes son líquidos orgánicos o sólidos disueltos en solventes no polares y los co-reactantes son sales o hidróxidos metálicos alcalinos en solución acuosa.

Existen varias maneras de sobrellevar dicha dificultad, una de ellas es empleando Catálisis por Transferencia de Fases (CTF). La CTF es una técnica por la cual se llevan a cabo o se aceleran reacciones entre dos solutos localizados en fases diferentes. En este método un catalizador es utilizado con el fin de llevar al nucleófilo (presente en la fase acuosa) a la fase orgánica. Sin la presencia de este catalizador, tales reacciones son lentas o directamente no ocurren. Los catalizadores de transferencia de fases se usan cuando el sustrato es insoluble en una de las fases y soluble en la otra, mientras que el nucleófilo es soluble en la fase en la que el sustrato no lo es y viceversa (March J, 1992).

Los catalizadores más usados son las sales de amonio cuaternario ( $R_4N^+$ ), sales de fosfonio ( $R_4P^+$ ), éteres corona, entre otros. Las sales de amonio cuaternario presentan ciertas ventajas que aconsejan su uso como catalizadores de transferencia de fases. Una sal de amonio cuaternario es un compuesto en el que se han reemplazado los hidrógenos del ión amonio por grupos alquilo R (metilo o, mejor aún, grupos *n*-butilo) (**Figura 2.2**). Para simplificar denominaremos a este catión cuaternario  $Q^+$ .

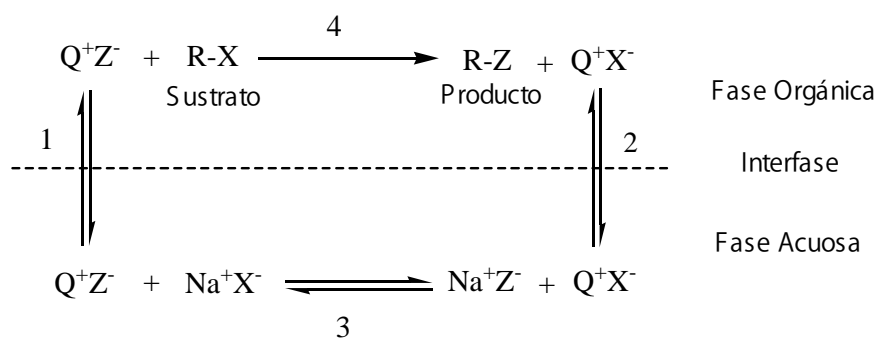


**Figura 2.2.** Estructuras de una sal de amonio y de una sal de amonio cuaternario

La CTF da lugar a extensas aplicaciones tales como, procesos de alquilaciones extractivas, reacciones catalizadas en sistemas bifásicos, activación de aniones, extracción preparativa de pares de iones, etc.

Este es un ejemplo de lo que Charles M. Starks (Starks CM, 1971), uno de los pioneros en este campo, ha denominado Catálisis por Transferencia de Fases. Starks, ha resumido el ciclo catalítico como se muestra en la **Figura 2.3**.

Todo depende del hecho de que los grupos alquilo del ión cuaternario  $Q^+$  lo hacen lipófilo y, por tanto, capaz de ser transferido a la fase orgánica (**equilibrio 2, Figura 2.3**). Sin embargo, no puede hacerlo solo, para equiparar su carga positiva debe llevar consigo un anión. Este será ocasionalmente su contraión original, por ejemplo, bisulfato; este anión débilmente básico carece virtualmente de poder nucleofílico, de modo que es inerte.



**Figura 2.3.** Catálisis por transferencia de fases. El ión de amonio cuaternario ( $Q^+$ ) es tanto hidrófilo como lipófilo, se mueve entre la fase acuosa y la orgánica transportando un anión: el nucleófilo ( $Z^-$ ) o el grupo saliente ( $X^-$ ). En la fase orgánica el nucleófilo no está virtualmente solvatado y reacciona rápidamente con el sustrato (R-X).

La mayoría de los aniones en la fase acuosa son  $Z^-$  (cualquier nucleófilo que se esté empleando), de modo que son los que tienen mayor probabilidad de ser conducidos a la fase orgánica (**equilibrio 1, Figura 2.3**). En un medio poco afín, como un disolvente no polar, la concentración de los iones  $Z^-$  puede ser muy baja, pero son muy reactivos y no están solvatados. La sustitución es rápida, formándose  $R-Z$  y liberándose un ión halogenuro. Este último es conducido a la fase acuosa por el ión cuaternario  $Q^+$  en su migración de regreso (**equilibrio 2, Figura 2.3**).

Y así, la reacción continúa. El ión, es transferido sucesivamente entre las dos fases transportando aniones: a veces, el contraión original, otras, uno de los iones halogenuros desplazados, y otras, el nucleófilo  $Z^-$ . Cuando esto último sucede, puede haber reacción. La catálisis se debe así a la transferencia del nucleófilo de una fase a otra.

En algunos casos, los iones  $Q^+$  poseen una baja solubilidad en agua. En consecuencia, se cree que el intercambio de iones (**equilibrio 3, Figura 2.3**) tiene lugar a través de la interfase.

Hay otro factor adicional involucrado en el proceso. Como se ha mencionado, en la mayoría de los disolventes, las sales existen en cierta medida como pares iónicos. Un ión y su contraión se atraen por tener cargas opuestas. Cuanto menos polar es un disolvente (esto es, cuanto más débil la solvatación), más fuerte es el apareamiento de iones. También, esta atracción electrostática tiende a estabilizar al anión, y esto lo desactiva como nucleófilo y como base. Así, se podría pensar que al pasar a un disolvente no polar, se está intercambiando un tipo de desactivación por otro.

Sin embargo, otra ventaja del ión cuaternario  $Q^+$  como catalizador de transferencia de fases es que los grupos alquilo que lo hacen lipófilo son voluminosos y protegen la carga positiva del nitrógeno, aislándola del anión. El anión es menos atraído hacia esta carga sumergida en el ión cuaternario que hacia una carga concentrada sobre un catión metálico. Este par iónico es muy débil, y el anión es comparativamente libre y muy reactivo.

La habilidad de la CTF está entonces basada en el hecho de que minimiza las dos principales fuerzas desactivadoras que actúan sobre un anión: la solvatación y el apareamiento de iones. Existen muchas variantes del método. No es necesaria una fase acuosa líquida, puede ser sólida. Tampoco se necesita la presencia de un disolvente

orgánico, el propio sustrato puede actuar de disolvente, si se trata de un líquido. El agente de transferencia de fase no tiene que ser necesariamente iónico, sino que puede ser una molécula neutra, como los éteres corona.

La CTF, proceso realizado en medio heterogéneo, fue reportada como un sustituto conveniente de la clásica reacción de Williamson (Freedman HH, 1975). En comparación a los sistemas homogéneos, la CTF tiene las siguientes ventajas: (a) no se necesitan solventes apróticos caros como el dimetilsulfóxido (DMSO) o la dimetilformamida (DMF), (b) el *workup* es más simple, (c) las condiciones de reacción implican tiempos más cortos y temperaturas más bajas y, (d) se emplean hidróxidos alcalinos acuosos a instancias de otros tipos de bases más caras y complejas.

En sus diversas formas, la CTF ha iniciado una revolución en la técnica para llevar a cabo reacciones orgánicas, tanto en el laboratorio como en la industria: no sólo en las reacciones de sustitución nucleofílica, sino en reacciones de todo tipo como eliminación, adición, oxidación, reducción, etc.

Debido a lo comentado anteriormente, la CTF ha sido empleada como una vía atractiva y económica para la preparación selectiva de nuestro intermediario "llave".

### **2.2.3 Moléculas *gemini***

En las últimas décadas, la preparación de nuevas moléculas anfipáticas, con dos o más cadenas hidrofóbicas y dos o más grupos hidrofílicos con excelentes propiedades activas de superficie han sido comunicadas (Menger FM, 2001). El intenso interés que ha generado el descubrimiento de estos nuevos compuestos radica en que, en comparación con los tensoactivos típicos, la presencia de dos o más cabezas polares y de dos o más colas hidrofóbicas confiere a estas moléculas una alta actividad superficial y una mayor interacción hidrofóbica intra e intermolecular. Por ende, en la industria y el hogar, estos productos tienen un amplio rango de aplicación.

Procedimientos típicos para la preparación de moléculas anfipáticas partiendo de glicerol, de éteres diglicidilglicólicos, de etilenglicoles y de azúcares han sido descritos en la bibliografía. En general, estos procedimientos involucran no menos de tres etapas de síntesis cuyos rendimientos individuales no superan el 95% (Zhu Y y col, 1992).

En consecuencia y sobre la base de los diversos esquemas sintéticos mencionados en la literatura, nos propusimos desarrollar una nueva familia de compuestos diméricos del tipo *gemini* a partir del intermediario “llave” o éter diglicídico, derivado de la *N*-acetildietanolamina.

La metodología aplicada incluye estudios básicos de diseño y síntesis dirigida para la obtención de dichas moléculas con potencial actividad antifúngica (Murguía MC, Grau RJ, 2001; Murguía MC, Cabrera MI, 2002). Las técnicas experimentales, que serán descritas más adelante, involucran: la obtención de la *N*-acetildietanolamina a partir de anhídrido acético y dietanolamina, la síntesis de intermediarios altamente reactivos (éteres diglicídicos) y la aminoalquilación de estos últimos con aminas grasas primarias y terciarias (*N,N*-dimetiladas) de diferente longitud y naturaleza mediante un mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular.

## 2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Los espectros RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{19}\text{F}$  fueron realizados en un espectrómetro Bruker FT-300, usando  $\text{CDCl}_3$  ó  $\text{D}_2\text{O}$  (según la solubilidad del compuesto) como disolvente. Todos los espectros están informados en partes por millón ( $\delta$ ), relativos al tetrametilsilano. Los espectros IR se realizaron en espectrómetro Shimadzu 8201 PC. En los análisis de cromatografía se emplearon los siguientes equipos: cromatógrafo gaseoso Shimadzu modelo GC-17AATF; cromatógrafo de gases-espectrómetro de masa Shimadzu modelo GCMS-QP 5000.

La cromatografía en columna fue realizada sobre sílica gel (70-230 mesh ASTM).

Se emplearon reactivos y solventes de grado analítico. Las purificaciones de los compuestos se realizaron de acuerdo a los métodos descritos en la literatura (Perrin DD y col, 1980).

Los reactivos monoetanolamina (Sigma-Aldrich), dietanolamina (Sigma-Aldrich), y ( $\pm$ )-epiclorhidrina (Fluka) 98% fueron adquiridos comercialmente.

Tanto el bisulfato como el bromuro de tetrabutilamonio de alta pureza (Strem) empleados como catalizadores fueron secados bajo vacío a 100 °C (Perrin DD y col, 1980).



Para la síntesis de los surfactantes no iónicos y catiónicos se utilizaron aminas primarias y terciarias respectivamente. Las aminas primarias octilamina (Aldrich) 98%, dodecilamina (Aldrich) 98% y octadecilamina (Aldrich) 98% fueron adquiridas comercialmente. En cambio, las aminas terciarias fueron preparadas a partir de sus correspondientes aminas primarias y halogenuros de alquilo y de perfluoralquilo (Kim T y col, 1996; Szlávik Z y col, 2001).

El clorhidrato de dimetilamina (Aldrich) 99%, el bromuro de *trans, trans*-farnesilo (Aldrich) 95% y el heptadecafluoro-1-iodoctano (Aldrich) 98% fueron adquiridos comercialmente.

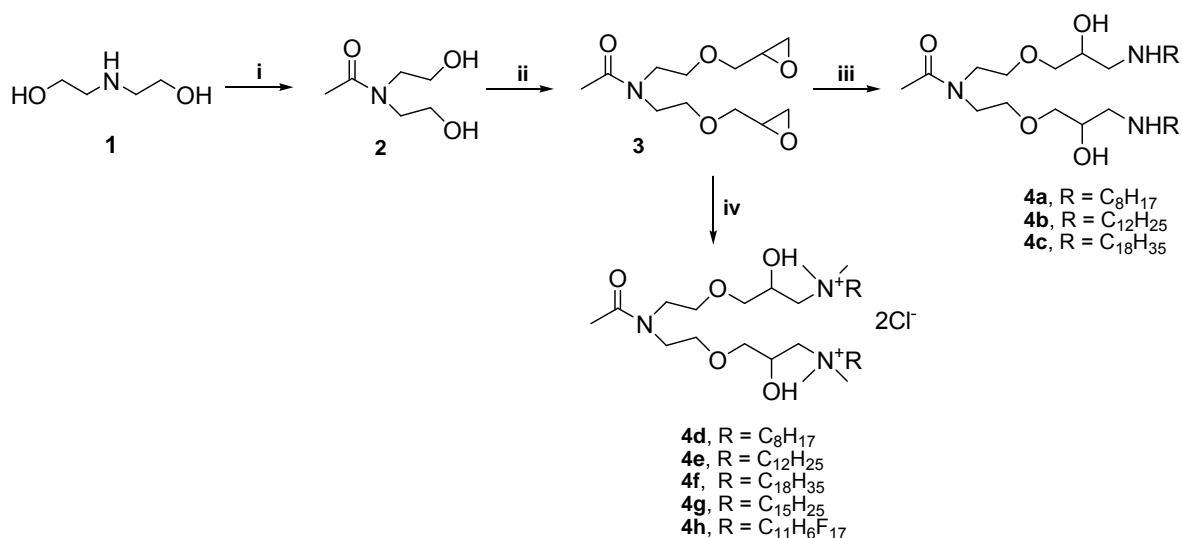
## 2.4 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Según la bibliografía consultada, existen numerosas y variadas metodologías propuestas para la síntesis de surfactantes *gemini*. En general, la obtención de este tipo de compuestos implica dos o más reacciones en las cuales se ven involucrados reactivos de diferente naturaleza y técnicas comúnmente empleadas durante una síntesis química.

En nuestro caso, para la síntesis de las nuevas moléculas fue necesario llevar a cabo una serie de reacciones que se muestran de manera resumida en la **Figura 2.4**. El primer paso consistió en la obtención de la *N*-acetildietanolamina (**2**) a partir de anhídrido acético y dietanolamina (**1**). Luego, se sintetizó el intermediario “llave” o éter diglicídico (**3**) altamente reactivo. El siguiente paso consistió en la aminoalquilación de dicho intermediario con aminas grasas primarias y terciarias (*N,N*-dimetiladas) de diferente longitud y naturaleza para obtener los compuestos de interés (**4 a-h**).

Cabe destacar que, cada uno de los intermediarios así como también los productos finales obtenidos en las distintas etapas de síntesis fueron purificados adecuadamente y caracterizados mediante técnicas espectroscópicas.

Los procedimientos experimentales utilizados para la síntesis de los surfactantes *gemini* se explicarán en detalle a continuación.



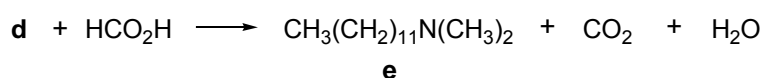
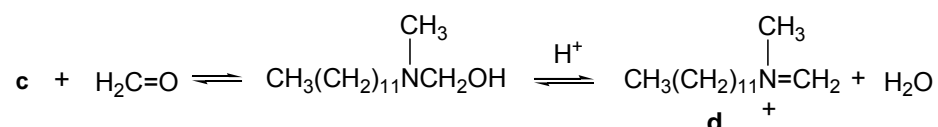
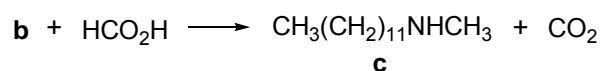
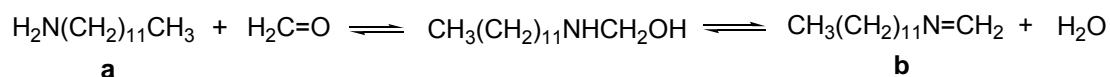
**Figura 2.4.** Ruta sintética de los compuestos *gemini* sintetizados. Reactivos y condiciones: **(i)** 1, anhídrido acético, 130 °C – 90 minutos; **(ii)** 2, (±)- epiclorhidrina, NaOH ac., bisulfato de tetrabutilamonio (TBAB), 30°C – 5 hs; **(iii)** 3, aminas primarias, bromuro de tetrabutilamonio (TBABr), etanol, 30°C – 18 hs; **(iv)** 3, *N,N*-dimetilaminas, TBABr, etanol, 30°C – 18 hs.

#### 2.4.1 Síntesis de aminas grasas terciarias de longitud de cadena variable

La reacción de Leuckart es un procedimiento típico y de gran utilidad para la metilación (alquilación reductiva) de aminas primarias o secundarias empleando diferentes aldehídos y cetonas. Cuando, en particular, aminas primarias y terciarias son metiladas reductivamente con formaldehído y ácido fórmico, el método es llamado procedimiento o reacción de Eschweiler-Clarke (March J, 1992).

En contraste con las mezclas frecuentemente obtenidas a través de la metilación de aminas primarias con yoduro de metilo, la alquilación reductiva con formaldehído y ácido fórmico nos permite obtener buenos rendimientos de aminas terciarias *N,N*-dimetiladas (Pine SH y Sanchez BL, 1971).

En la **Figura 2.5** puede apreciarse, a modo de ejemplo, la ruta sintética empleada para la síntesis de la *N,N*-dimetildodecilamina.



**Figura 2.5.** Alquilación reductiva mediante el procedimiento de Eschweiler-Clarke de la dodecilamina (**a**) con formaldehído y ácido fórmico para dar la *N,N*-dimetildodecilamina (**e**).

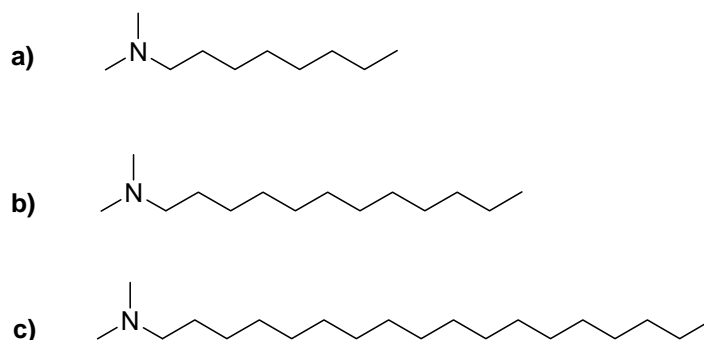
Por lo tanto, esta metodología ha sido aplicada con éxito para síntesis de la *N,N*-dimetiloctilamina, *N,N*-dimetildodecilamina y *N,N*-dimetiloctadecilamina a partir de sus correspondientes aminas primarias.

A continuación se describe el procedimiento experimental empleado para la síntesis de las aminas terciarias antes mencionadas.

Diferentes mezclas de octilamina (34.83 g, 0.27 mol), dodecilamina (49.95 g, 0.27 mol), octadecilamina (40.35 g, 0.15 mol) y metanol (120 ml) fueron colocadas en reactores de vidrio provistos de un sistema de condensación de reflujo, enfriados en baño de hielo y bajo agitación constante. Luego, fueron agregados lentamente ácido fórmico (87.4 g, 1.9 mmol) y formaldehído (108 g, 3.6 mmol). Posteriormente, las mezclas de reactivos fueron calentadas a la temperatura de reflujo del disolvente (65.5 °C) durante 12, 18 y 24 horas para la octil, dodecil y octadecilamina respectivamente. Luego, los compuestos de bajo punto de ebullición fueron evaporados a 50 °C y las mezclas fueron llevadas a pH 9 con la ayuda de una solución de NaOH 25% p/v. Los crudos de reacción se calentaron a reflujo durante 3, 5 y 7 horas más para cada síntesis respectivamente. Terminada la reacción, los tres crudos fueron extraídos cada uno con cloroformo (3 x 60 ml), secados

con sulfato de magnesio anhidro y filtrados. Finalmente, se evaporó el disolvente utilizando un evaporador rotatorio y los crudos fueron purificados por destilación fraccionada a presión reducida (Ricci C y col, 2002).

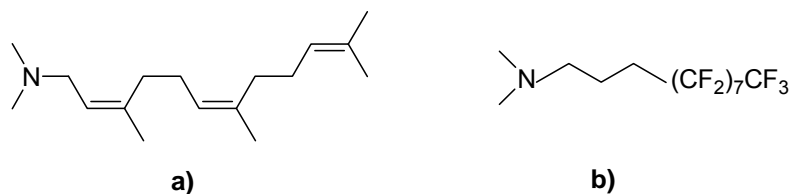
Los productos sintetizados y purificados a través de esta metodología se obtuvieron en muy buenos rendimientos (90%). En la **Figura 2.6 (a-c)** puede observarse la estructura química correspondiente a cada uno de ellos.



**Figura 2.6.** Aminas grasas terciarias de longitud de cadena variable empleadas para la síntesis de surfactantes *gemini*: **a)** *N,N*-dimetiloctilamina, **b)** *N,N*-dimetildodecilamina, **c)** *N,N*-dimetiloctadecilamina.

#### 2.4.2 Síntesis de *N,N*-dimetilfarnesilamina y *N,N*-dimetil-perfluorooctil-propilamina

Debido a que para la síntesis de ***N,N*-dimetilfarnesilamina** ( ó *N,N*-dimetil-(*E,E*)-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrienilamina) y ***N,N*-dimetil-perfluorooctil-propilamina** ( ó *N,N*-dimetil-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11)-heptadecafluoroundecilamina) (**Figura 2.7 a-b**) fue necesario emplear una solución de dimetilamina en tetrahidrofurano (THF), la preparación de dicha solución será descrita en primer lugar seguidamente de la síntesis correspondiente a cada amina dimetilada, insaturada y perfluorada.



**Figura 2.7.** Aminas grasas terciarias de diferente naturaleza empleadas para la síntesis de surfactantes *geminis*: **a)** *N,N*-dimetilfarnesilamina y **b)** *N,N*-dimetil-perfluorooctil-propilamina.

En un balón de dos bocas conteniendo 10 g de KOH y equipado con un refrigerante se le adicionó, gota a gota, a través de una columna de vidrio, una solución acuosa de Me<sub>2</sub>NH HCl (18 g; 0,22 mmol). La dimetilamina gaseosa generada en el transcurso de esta reacción se hizo pasar a través de una columna de secado rellena con KOH y fue condensada y colectada en un recipiente con 20 g de THF a -80°C (acetona/aire líquido). Finalmente, se le adicionaron 20g más de THF frío obteniéndose de este modo una solución de dimetilamina al 20%. Una vez obtenida la solución en cuestión, se continuó con el siguiente paso: la síntesis de las aminas grasas insaturada y fluorada.

**N,N-dimetilfarnesilamina:** se colocó en un balón de reacción el halogenuro de alquilo ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>C=CH[CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)=CH]<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>Br), (983.25mg, 3.45 mmol) y una solución de dimetilamina en THF al 20 % (3.78 g, 84 mmol). La mezcla de reacción se mantuvo bajo agitación magnética durante toda la noche a temperatura ambiente. Luego, se agregó 70 ml de éter etílico y la mezcla fue extraída con una solución saturada de carbonato de sodio (3 x 15 ml). A continuación, la fase acuosa se extrajo con éter etílico (3 x 20 ml). Las fracciones orgánicas fueron combinadas, extraídas con agua destilada (2 x 15 ml), brine (2 x 15 ml) y secadas con sulfato de magnesio anhidro. Finalmente, se evaporó el solvente y se obtuvo el producto en forma de aceite de color anaranjado con un rendimiento del 80%. La *N,N*-dimetilfarnesilamina fue utilizada en síntesis sin mayores purificaciones (Kaplánek R y col 2007).

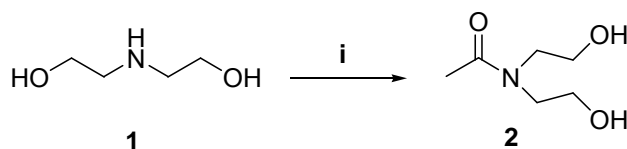
**N,N-dimetil-perfluorooctil-propilamina:** se colocó en un balón de reacción el halogenuro de perfluoroalquilo (CF<sub>3</sub>(CF<sub>2</sub>)<sub>7</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>I), (7.06 g, 12 mmol) y la solución de dimetilamina al 20% en THF (2.61 g, 58 mmol). La mezcla se agitó por 24 horas a temperatura ambiente, el producto de reacción se trató con una solución de NaOH 1M y se extrajo con éter sulfúrico (3 x 10 ml). La fase etérea se lavó con agua destilada y se

secó con sulfato de magnesio anhidro. Finalmente el disolvente se evaporó bajo presión reducida y se obtuvo el producto con un rendimiento del 60%. La *N,N*-dimetilperfluorooctil-propilamina fue utilizada en síntesis sin mayores purificaciones (Szlávik Z y col, 2001).

### 2.4.3 Síntesis de la molécula espaciadora: *N*-acetildietanolamina

En un mini-reactor de vidrio de 100 ml, equipado con un refrigerante, se colocó dietanolamina (9.6 ml, 0.1 mol). Utilizando un baño de hielo (reacción exotérmica) se adicionó anhídrido acético gota a gota (23.6 ml, 0.25 mol). Luego, la mezcla se calentó gradualmente a reflujo y se mantuvo la reacción a 130 °C durante una hora y media y bajo agitación magnética. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar la mezcla y se eliminó el ácido acético formado en el transcurso de la reacción con la ayuda de un microdestilador Kurgelrohr (destilación a presión reducida). El rendimiento conseguido fue de un 91% (porcentaje de recuperación de producto puro) (Vogel AI, 1989).

Un esquema sencillo de la síntesis puede observarse en la **Figura 2.8**.



**Figura 2.8.** Síntesis de la molécula espaciadora, *N*-acetildietanolamina (**2**), a partir de dietanolamina (**1**). Donde (**i**): anhídrido acético, 130 °C – 90 minutos.

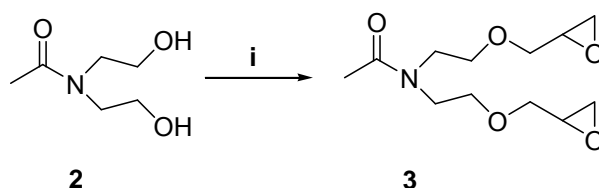
### 2.4.4 Síntesis del intermediario “llave” a partir de la *N*-acetildietanolamina empleando Catálisis por Transferencia de Fases

Los experimentos fueron llevados a cabo en un mini-reactor de vidrio de 100 ml equipado con un eficiente agitador mecánico (100-1000 rpm). Por cuestiones prácticas, la reacción fue realizada a una temperatura de 30 °C. Esto se debe a que la (±) Epiclorhidrina, uno de

los reactivos utilizados además como medio líquido en la reacción, polimeriza a temperaturas superiores a los 40 °C. La velocidad de agitación fue establecida y controlada (700 rpm) de modo tal que la fase orgánica estuvo finamente dispersa en la mezcla de reacción.

Un procedimiento típico consistió en lo siguiente. A una mezcla de hidróxido de sodio 99% p/p (0.6 g, 24 mmol), agua (0.016 g, 1%) y *N*-acetildietanolamina (0.6 g, 4 mmol), previamente agitadas durante 20 minutos para favorecer la formación de la especie nucleofílica, se le adicionó bisulfato de tetrabutilamonio (TBAB) (0.068 g, 0.2 mmol) como catalizador de transferencia de fases. Luego, a esta mezcla se le agregó, gota a gota, (±) Epiclorhidrina (6.25 ml, 80 mmol) y se mantuvo la reacción a una temperatura de 30 °C durante 5 horas, bajo agitación mecánica. El período seleccionado fue suficientemente prolongado para alcanzar una buena conversión del reactivo limitante y rendimientos de productos constantes. En este caso la CTF es sólido-líquida.

Un esquema sencillo de la síntesis puede observarse a continuación en la **Figura 2.9**.



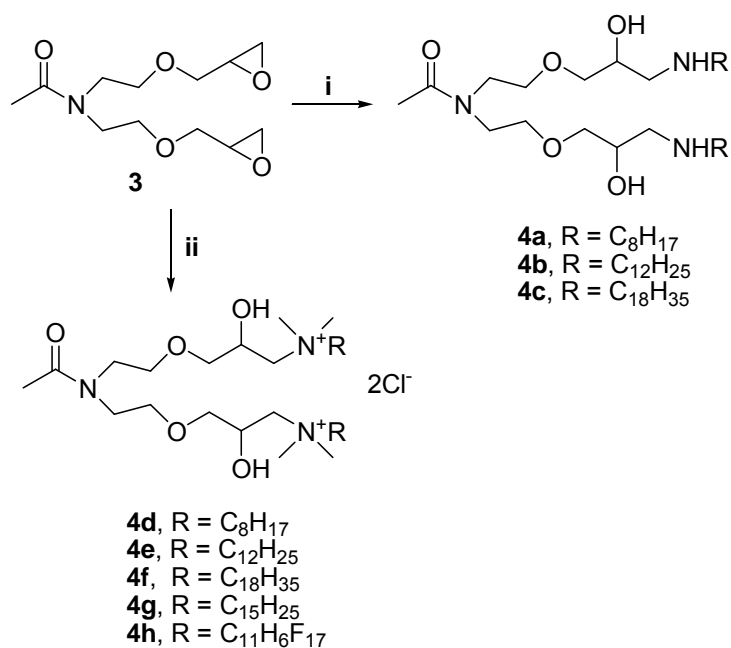
**Figura 2.9.** Obtención del intermediario “llave” (3) a partir de la *N*-acetildietanolamina (2) usando catálisis por transferencia de fases. Donde: (i) (±)- epiclorhidrina, NaOH ac., bisulfato de tetrabutilamonio (TBAB), 30°C – 5hs. El TBAB es utilizado como catalizador de transferencia de fases.

Luego de finalizada la reacción se realizó una filtración y lavado del crudo con 50 ml de diclorometano (DCM). Luego, se llevó a cabo una Cromatografía en Capa Delgada (CCD ó TLC) con el fin de visualizar, a priori, los productos presentes en el crudo de reacción. Para tal fin se usó una mezcla de dos disolventes orgánicos, Éter de Petróleo y Acetato de Etilo (1:1). Se evaporaron los disolventes orgánicos con la ayuda de un evaporador rotatorio y se hicieron extracciones con éter etílico (3x 20 ml). Se colectó la fase orgánica,

se secó con sulfato de magnesio y se filtró. A continuación se evaporó nuevamente el disolvente y se siguió con la purificación del compuesto de interés utilizando como metodología una Cromatografía en Columna sobre sílica gel con una mezcla de disolventes Éter de Petróleo y Acetato de Etilo (3:1) obteniéndose un 80% de producto aislado (líquido oleoso amarillo pálido) (Nouguier R, 1988; Zhu Y y col, 1991; Murguía MC y col 2002).

### 2.4.5 Síntesis de las moléculas *gemini* derivadas de aminas primarias y terciarias

El procedimiento experimental que se explicará a continuación es válido para el conjunto de compuestos que nos hemos planteado sintetizar y está representado en la **Figura 2.10**.



**Figura 2.10.** Ruta sintética de los compuestos *gemini* sintetizados. Reactivos y condiciones: **(i)** **3**, aminas primarias, bromuro de tetrabutilamonio (TBABr), etanol, 30°C – 18 hs; **(ii)** **3**, *N,N*-dimetilaminas, TBABr, etanol, 30°C – 18 hs.



Para la obtención de los surfactantes se utilizó un balón de 50 ml equipado con un refrigerante y agitación magnética.

A una mezcla de etanol (12 ml), diglicidiléter (**2**) (0.397 g, 1.53 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (TBABr) (0.049 g, 0.153 mmol) se adicionó la amina correspondiente: (octilamina 0.494 g, dodecilamina 0.708 g, octadecilamina 1.022 g, *N,N*-dimetiloctilamina 0.601 g, *N,N*-dimetildodecilamina 0.815 g, *N,N*-dimetiloctadecilamina 1.129 g, *N,N*-dimetilfarnesilamina 0.952 g, *N,N*-dimetil-perfluorooctil-propilamina 1.932 g; 3.825mmol). La mezcla de reacción se mantuvo a una temperatura de 30 °C durante 18 horas, bajo agitación magnética.

Finalizada la reacción (desaparición de **2**) visualizada por cromatografía en capa delgada (CCD), se evaporó el etanol con la ayuda de un evaporador rotatorio y a continuación se les aplicó vacío para garantizar la eliminación total del disolvente. A continuación, se realizó la purificación de los compuestos de interés utilizando cromatografía de adsorción en gel de sílice. Para los compuestos *gemi*ni no iónicos la mezcla empleada como eluyente fue diclorometano / etanol (1:1). Luego, la mezcla de disolventes fue evaporada bajo presión reducida. Este procedimiento permitió obtener a los surfactantes no iónicos (**4 a-c**) como compuestos puros aislados en un 40, 33 y 30 % respectivamente.

Para los *gemi*ni catiónicos se utilizó la siguiente mezcla de disolventes como eluyente: Acetato de Etilo / Etanol / Agua Destilada / Hidróxido de Amonio 28-30 % (4:1:0.25:0.5). Luego, la mezcla de disolventes fue evaporada bajo presión reducida y la adición de una solución de ácido clorhídrico aportó los correspondientes contraiones. Finalmente, los surfactantes catiónicos (**4 d-h**) fueron obtenidos como compuestos puros aislados en un 92, 61, 39, 30 y 45 % respectivamente (Kim T, Hirao T y col, 1996; Kim T, Kida T y col 1996; Ricci C y col, 2002; Neetu Tewari VK y col, 2004).

#### 2.4.6 Síntesis de análogos monoméricos

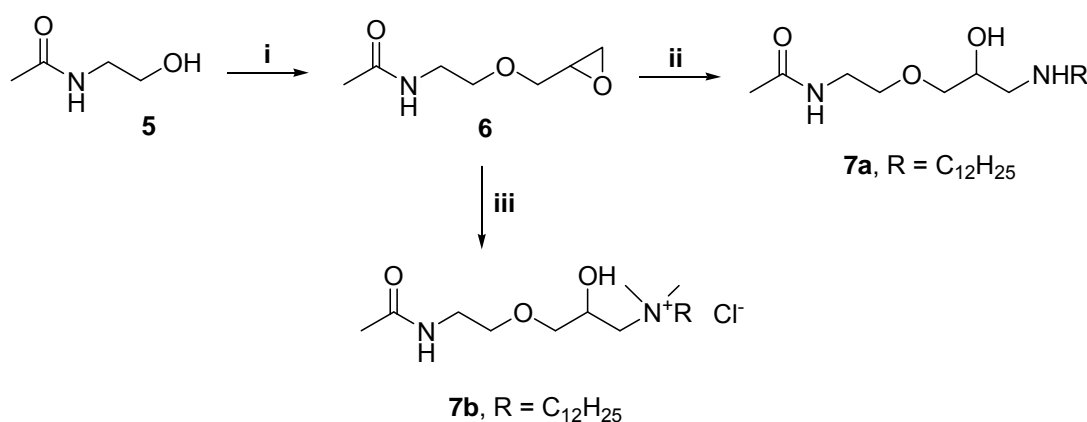
Como ya se ha mencionado anteriormente, los surfactantes que poseen más de un grupo polar y más de una cola hidrofóbica (como los *gemi*ni y los multiarmados o polivalentes) están reemplazando a sus homólogos convencionales (de estructura clásica compuesta

por una cola hidrofóbica y un grupo iónico o polar) debido a sus notables propiedades activas de superficie, excelente biodegradabilidad, favorables datos toxicológicos, etc.

Como consecuencia de estos antecedentes y con el objetivo de comparar el desempeño o comportamiento de los compuestos *gemini* frente al de sus análogos monoméricos, se sintetizaron dos moléculas monoméricas no iónica y catiónica de longitud de cadena hidrocarbonada intermedia o C<sub>12</sub>, las cuales se visualizan más adelante en la **Figura 2.11**.

La decisión de sintetizar sólo los compuestos monoméricos (**7a**) y (**7b**) análogos de los surfactantes no iónico (**4b**) y catiónico (**4e**) respectivamente radica en los resultados microbiológicos (*screening*) obtenidos para los compuestos *gemini* antes mencionados. Dichos resultados serán descriptos y discutidos más adelante (Capítulo 4).

Tanto la ruta de síntesis como los procedimientos experimentales empleados y anteriormente descriptos para la obtención del intermediario “llave” (**3**) y de las moléculas *gemini* (**4 a-h**) fueron aplicados para generar los compuestos análogos (**6**) y (**7 a-b**) con un rendimiento del 78, 86 y 80 % respectivamente (ver **Figura 2.11**).



**Figura 2.11.** Ruta sintética de los compuestos monoméricos análogos sintéticos de los surfactantes no iónico y catiónico de longitud de cadena de carbono 12. Reactivos y condiciones: **(i)** **5**, (+/-)- epiclorhidrina, NaOH ac., bisulfato de tetrabutilamonio (TBAB), 30°C – 5hs; **(ii)** **6**, dodecilamina, bromuro de tetrabutilamonio (TBABr), etanol, 30°C – 18 hs; **(iii)** **6**, N,N-dimetildodecilamina, TBABr, etanol, 30°C – 18 hs.

## 2.5 CARACTERIZACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS

### ***N,N*-Bis-(2-hidroxi-etil)acetamida (2):**

Datos físicos del compuesto: aceite amarillo.

IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 3462.0, 2960.5, 1643.2, 1423.4, 1371.3, 1234.4, 1043.4, 607.5.  $^1\text{H}$  NMR [200 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )]:  $\delta$  = 1.98 (s, 3H), 3.27 (t, 4H  $J$  = 4.1), 3.65 (t, 4H  $J$  = 2.1), 5.2 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR [50 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )]:  $\delta$  = 20.70, 44.46, 57.44, 59.72, 169.10. MS:  $m/z$  (% rel. int.) = 147 ( $\text{M}^+$ , 2), 129 (10), 116 (48), 104 (5), 87 (32), 74 (40), 56 (20), 43 (100). ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_3$  - PM: 147.172).

### ***N,N*-Bis[2-(oxiran-2-il) metoxietil]acetamida (3):**

Datos físicos del compuesto: aceite amarillo claro.

IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 761.8, 804.3, 933.5, 1105.1, 1251.7, 1336.6, 1458.1, 1637.5, 2862.2, 2999.1.  $^1\text{H}$  NMR [200 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )]:  $\delta$  = 2.05 (s, 3H), 2.44–2.61 (m, 4H), 2.98–3.03 (m, 2H), 3.18–3.22 (dd, 2H  $J$  = 4.1, 3.9), 3.24–3.27 (m, 4H), 3.38–3.42 (dd, 2H  $J$  = 4.3, 2.7), 3.53–3.57 (t, 4H  $J$  = 6.5).  $^{13}\text{C}$  NMR [50 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )]:  $\delta$  = 20.71, 41.64, 44.64, 44.67, 53.96, 67.07, 71.90, 169.10. MS:  $m/z$  (% rel. int.) = 260 ( $\text{M}^+$ , 2), 230 (1), 202 (8), 172 (4), 144 (3), 130 (60), 112 (5), 86 (15), 70 (10), 55 (90), 43 (100). ( $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_5$  - PM: 259.299).

### ***N,N*-Bis[2-(3-octilamino-2-hidroxi)propoxi]etil]acetamida (4a):**

Datos físicos del compuesto: aceite amarillo pálido.

IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 760.0, 930.2, 1120.0, 1460.3, 1620.0, 2850.1, 2930.4, 3450.1.  $^1\text{H}$  NMR [200 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )]:  $\delta$  = 0.90 (t, 6H  $J$  = 2.3), 1.22–1.38 (m, 24H), 2.05 (s, 3H), 2.59–2.72 (m, 8H), 2.76–2.80 (t, 4H  $J$  = 12), 3.14–3.17 (m, 4H), 3.26 (t, 4H  $J$  = 6), 3.52 (t, 4H  $J$  = 5), 4.01–4.06 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR [50 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )]:  $\delta$  = 14.20, 20.70, 23.10, 27.41, 29.30, 29.80, 30.35, 32.35, 41.64, 44.64, 48.84, 52.45, 66.80, 71.21, 72.90, 169.10. FAB-HRMS: calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_5$ : 517.7963, encontrado: 517.7955.

### ***N,N*-Bis[2-(3-dodecilamino-2-hidroxi)propoxi]etil]acetamida (4b):**

Datos físicos del compuesto: producto blanco ceroso.

IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 760.4, 930.1, 1120.1, 1460.3, 1620.0, 2850.7, 2930.0, 3450.1.  $^1\text{H}$  NMR [200 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )]:  $\delta$  = 0.94 (t, 6H  $J$  = 2.7), 1.21–1.40 (m, 40H), 2.07 (s, 3H), 2.57–2.73

(m, 8H), 2.78 (t, 4H J = 10), 3.14–3.18 (m, 4H), 3.25 (t, 4H J = 6), 3.54 (t, 4H J = 5), 3.98–4.06 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$ NMR [50 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )]:  $\delta$  = 14.18, 20.70, 22.69, 27.18, 29.39, 29.62, 29.63, 29.65, 29.73, 29.76, 31.94, 41.64, 44.64, 48.84, 52.45, 66.80, 71.21, 72.90, 169.0. FAB-HRMS: calculado para  $\text{C}_{36}\text{H}_{75}\text{N}_3\text{O}_5$ : 630.0122, encontrado: 630.0118.

***N,N*-Bis[2-(3-octadecilamino-2-hidroxi)propoxi]etil]acetamida (4c):**

Datos físicos del compuesto: producto blanco ceroso.

IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 760.3, 930.2, 1120.6, 1460.1, 1620.3, 2850.1, 2930.4, 3450.0.  $^1\text{H}$  NMR [200 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )]:  $\delta$  = 0.88 (t, 6H J = 3.1), 1.20–1.41 (m, 64H), 2.05 (s, 3H), 2.59–2.72 (m, 8H), 2.80 (t, 4H J = 7.8), 3.13–3.17 (m, 4H), 3.24 (t, 4H J = 7.1), 3.43–3.46 (m, 4H), 3.52 (t, 4H J = 6.5), 4.01–4.06 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR [50 MHz, ( $\text{CDCl}_3$ )]:  $\delta$  = 14.01, 19.77, 20.70, 27.18, 29.29, 29.36, 29.38, 29.40, 29.62, 29.66, 29.68, 29.71, 29.76, 32.01, 41.64, 44.64, 48.84, 52.45, 66.80, 71.21, 72.90, 169.10. FAB-HRMS: calculado para  $\text{C}_{48}\text{H}_{99}\text{N}_3\text{O}_5$ : 798.3361, encontrado: 798.3359.

**Dicloruro de *N,N*-Bis[2-(3-octildimetilammonio-2-hidroxi)propoxi]etil]acetamida (4d):**

Datos físicos del compuesto: aceite amarillo pálido.

IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 760.0, 930.2, 1120.1, 1460.4, 1620.0, 2850.1, 2930.3, 3450.0.  $^1\text{H}$  NMR [200 MHz, ( $\text{D}_2\text{O}$ )]:  $\delta$  = 0.81–0.93 (m, 10H), 1.25–1.45 (m, 16H), 1.94–1.97 (m, 4H), 2.05 (s, 3H), 3.12–3.14 (m, 6H), 3.23–3.27 (m, 4H), 3.32 (s, 12H), 3.35–3.45 (m, 4H), 3.53–3.56 (m, 4H), 3.80–4.02 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR [50 MHz]:  $\delta$  = 14.07, 20.70, 22.68, 24.13, 26.31, 27.19, 28.46, 31.73, 41.64, 44.64, 59.43, 63.50, 64.84, 66.93, 70.11, 70.25, 169.10. FAB-HRMS ( $\text{M} - \text{Cl}$ ) $^+$ : calculado para  $\text{C}_{32}\text{H}_{69}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5$ : 611.3727, encontrado: 611.3716.

**Dicloruro de *N,N*-Bis[2-(3-dodecildimetilammonio-2-hidroxi)propoxi]etil]acetamida (4e):**

Datos físicos del compuesto: producto blanco ceroso.

IR (KBr):  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) = 760.1, 930.4, 1120.0, 1460.0, 1620.5, 2850.0, 2930.1, 3450.2.  $^1\text{H}$  NMR [200 MHz, ( $\text{D}_2\text{O}$ )]:  $\delta$  = 0.84–0.91 (m, 10H), 1.22–1.40 (m, 32H), 1.94–2.01 (m, 4H), 2.06 (s, 3H), 3.12–3.16 (m, 6H), 3.25–3.27 (m, 4H), 3.32 (s, 12H), 3.36–3.45 (m, 4H), 3.53–3.57 (m, 4H), 3.79–4.04 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR [50 MHz]:  $\delta$  = 14.05, 20.70, 22.62, 23.79, 26.08, 27.88, 29.37, 29.45, 29.61, 29.62, 31.68, 41.64, 44.64, 44.64, 59.43, 63.50, 64.84, 66.93,

70.11, 70.25, 169.10. FAB-HRMS (M-Cl)<sup>+</sup>: calculado para C<sub>40</sub>H<sub>85</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 723.5886, encontrado: 723.5875.

**Dicloruro de *N,N*-Bis[2-(3-octadecildimetilammonio-2-hidroxi)propoxi]etil]acetamida (4f):**

Datos físicos del compuesto: producto blanco ceroso.

IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 760.0, 930.1, 1120.0, 1460.0, 1620.2, 2850.1, 2930.0, 3450.0. <sup>1</sup>H NMR [200 MHz, (D<sub>2</sub>O)]:  $\delta$  = 0.83–0.90 (m, 10H), 1.21–1.40 (m, 56H), 1.94–1.98 (m, 4H), 2.05 (s, 3H), 3.12–3.16 (m, 6H), 3.25–3.27 (m, 4H), 3.32 (s, 12H), 3.38–3.45 (m, 4H), 3.53–3.56 (m, 4H), 3.79–4.04 (m, 6H). <sup>13</sup>C NMR [50 MHz]:  $\delta$  = 13.10, 19.77, 20.70, 23.79, 26.08, 26.87, 27.88, 29.22, 29.29, 29.36, 29.38, 29.40, 29.62, 29.66, 29.68, 29.70, 32.01, 41.64, 44.64, 59.43, 63.50, 64.84, 66.93, 70.11, 70.25, 169.10. FAB-HRMS (M-Cl)<sup>+</sup>: calculado para C<sub>52</sub>H<sub>109</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 891.9125, encontrado: 891.9113.

**Dicloruro de *N,N*-Bis{2-[3-(*E,E*)-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrienildimetilammonio-2-hidroxi]propoxi]etil}acetamida (4g):**

Datos físicos del compuesto: producto amarillo ceroso.

IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 1085.9, 2940.0, 3640.0. <sup>1</sup>H-NMR [200 MHz, (CDCl<sub>3</sub>)]:  $\delta$  = 1.63 (s, 18H), 1.69 (s, 6H), 1.96-2.02 (m, 16H), 2.05 (s, 3H) 3.14-3.54 (m, 12H), 3.32 (s, 12H), 3.87-4.06 (m, 10H), 5.04-5.10 (m, 6H). <sup>13</sup>C-NMR [50 MHz]:  $\delta$  = 15.23, 17.56, 22.00, 23.22, 24.26, 25.56, 27.03, 34.22, 38.48, 39.95, 41.11, 53.58, 60.92, 62.77, 63.07, 66.95, 68.83, 71.20, 98.28, 124.17, 124.90, 129.89, 135.27, 144.63, 169.19. FAB-HRMS (M/2- Cl)<sup>+</sup>: calculado para C<sub>46</sub>H<sub>85</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 397.827, encontrado: 398.2815; y (M/2-2Cl)<sup>+</sup>: calculado para C<sub>46</sub>H<sub>85</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 362.374, encontrado: 360.2669.

**Dicloruro de *N,N*-Bis{2-[3-(4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11)-heptadecafluoroundecildimetilammonio-2-hidroxi]propoxi]etil}acetamida (4h):**

Datos físicos del compuesto: producto blanco ceroso.

IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 1085.9, 2940.0, 3640.0. <sup>1</sup>H-NMR [200 MHz, (CDCl<sub>3</sub>)]:  $\delta$  = 2.05 (s, 3H), 2.22-2.34 (m, 8H), 3.23-3.54 (m, 16H), 3.34 (s, 12H), 3.84-4.04 (m, 6H). <sup>13</sup>C-NMR [50 MHz, (CDCl<sub>3</sub>)]:  $\delta$  = 14.00, 22.80, 25.95, 28.93, 29.23, 29.55, 29.60, 29.90, 32.20, 42.24, 62.74, 64.09, 70.11, 71.14, 72.71, 73.77, 98.28, 110.36, 115.24, 126.65, 130.50, 169.10. <sup>19</sup>F-NMR [200 MHz, (CD<sub>3</sub>OD/CFCl<sub>3</sub>)]:  $\delta$  = -82.0 (m, 6F, 2CF<sub>3</sub>), -115.1 (m, 4F, 2CF<sub>2</sub>), -123.1

(m, 12F, 6CF<sub>2</sub>), -123.3 (m, 4F, 2CF<sub>2</sub>), -124.0 (m, 4F, 2CF<sub>2</sub>), -124.9 (m, 4F, 2CF<sub>2</sub>), -127.5 (m, 4F, 2CF<sub>2</sub>). FAB-HRMS (M/2- Cl)<sup>+</sup>: calculado para C<sub>38</sub>H<sub>49</sub>F<sub>34</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>: 654.6115, encontrado: 654.1095.

**N-[2-(oxiran-2-il)metoxietil] acetamida (6):**

Datos físicos del compuesto: aceite amarillo claro.

IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 761.6, 804.0, 932.7, 1105.1, 1252.0, 1336.3, 1458.4, 1637.5, 2862.1, 2998.8. <sup>1</sup>H NMR [200 MHz, (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 2.02 (s, 3H), 2.45–2.61 (m, 2H), 3.03 (m, 1H), 3.18–3.48 (m, 6H), 6.35 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR [50 MHz, (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 22.27, 35.44, 44.47, 53.96, 71.90, 73.12, 174.04. MS: m/z (% rel. int.) = 159 (M+, 2), 144 (3), 130 (60), 112 (5), 86 (15), 70 (10), 55 (90), 43 (100). (C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>3</sub> – PM: 159.185).

**N-[2-(3-dodecilamino-2-hidroxiopoxi) etil]acetamida (7a):**

Datos físicos del compuesto: producto ceroso amarillo claro.

IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 760.4, 930.1, 1120.1, 1460.3, 1620.0, 2850.7, 2930.0, 3450.1. <sup>1</sup>H NMR [200 MHz, (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 0.88–0.92 (m, 3H), 1.20–1.41 (m, 20H), 1.91 (s, 3H), 2.57–2.79 (m, 4H), 3.14–3.46 (m, 6H), 4.03– 4.05 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR [50 MHz]:  $\delta$  = 14.10, 22.27, 27.18, 29.39, 29.76, 31.94, 35.44, 48.84, 52.45, 71.21, 72.90, 174.04. FAB-HRMS: calculado para C<sub>19</sub>H<sub>40</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 344.5401, encontrado: 344.5399.

**N-[2-(3-dodecildimetilamonio-2- hidroxiopoxi)etil]acetamida cloruro (7b):**

Datos físicos del compuesto: producto blanco ceroso.

IR (KBr):  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) = 760.1, 930.4, 1120.0, 1460.0, 1620.5, 2850.0, 2930.1, 3450.2. <sup>1</sup>H NMR [200 MHz, (D<sub>2</sub>O):  $\delta$  = 0.84–0.88 (m, 3H), 1.24– 1.39 (m, 18H), 1.91 (s, 3H), 1.93–1.97 (m, 2H), 3.14–3.16 (m, 2H), 3.32 (s, 6H), 3.38–3.51 (m, 4H), 3.86–3.51 (m, 4H), 3.86–4.01 (m, 2H), 4.71–4.74 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR [50 MHz]:  $\delta$  = 14.04, 22.27, 23.79, 26.87, 29.37, 29.45, 29.61, 31.68, 35.44, 59.43, 63.50, 66.93, 70.11, 70.25, 70.89, 174.02. FAB-HRMS (M- Cl)<sup>+</sup>: calculado para C<sub>21</sub>H<sub>45</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 373.6018, encontrado: 373.6013.

## 2.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La elección de la *N*-acetildietanolamina como grupo espaciador para la obtención de los surfactantes *gemi* no ha sido arbitraria. El empleo de este diol como grupo conector nos ha permitido dirigir estratégicamente la síntesis de los compuestos diméricos de manera exitosa. Además, esta molécula espaciadora posee cierta particularidad, la funcionalidad amida. La naturaleza de dicho grupo funcional habría de contribuir con la actividad biológica presente en las moléculas *gemi* sintetizadas (Massi L y col, 2008).

Por otra parte, la síntesis de la molécula espaciadora, *N*-acetildietanoamina (**2**), se llevó a cabo en forma sencilla, con un tiempo de reacción breve y con buenos resultados, se recuperó el producto puro de interés en un 91%. En adición, los reactivos empleados para su obtención (la dietanolamina y el anhídrido acético) son compuestos baratos y fáciles de conseguir. Seguidamente, el producto obtenido fue utilizado en la preparación del éter diglicídico o intermediario "llave".

La síntesis de dicho intermediario o diglicídil éter (**3**), se realizó mediante la eterificación de la *N*-acetildietanolamina con ( $\pm$ )-Epiclorhidrina, bajo la presencia de TBAB como catalizador de transferencia de fases. La misma fue llevada a cabo con la utilización directa de pellets de hidróxido de sodio con el agregado de un 1% de agua, lo cual condujo a un sistema sólido-líquido de apariencia semi-pastosa.

El sistema de agitación mecánico, empleado para la realización de la reacción, es clave para conseguir buenos resultados. El mismo es fundamental para que la fase orgánica esté finamente dispersa en la mezcla de reacción.

Todo el proceso transcurrió a 30 °C y por un tiempo de aproximadamente 5 horas. La temperatura a la cual se llevó a cabo la reacción es un punto importante, ya que por encima de 40 °C puede ocurrir la polimerización de la ( $\pm$ )-Epiclorhidrina.

El porcentaje de catalizador (TBAB) adicionado con respecto al reactivo limitante, la *N*-acetildietanolamina, fue del 5 mol %. En muchos casos, un incremento del mismo, ha logrado un aumento en el rendimiento.

Cabe destacar que la elección del catalizador no ha sido arbitraria. Las sales de amonio cuaternario, como el TBAB  $[(C_4H_9)_4N^+HSO_4^-]$ , son habitualmente utilizadas como catalizadores de transferencia de fases debido a que son capaces de transferir

eficientemente un reactivo desde la fase en la que este se encuentra disuelto hacia otra fase en la cual se halla disuelto el segundo reactivo involucrado en la reacción. Además, poseen una elevada actividad, son compuestos estables, disponibles o de fácil preparación y de bajo costo (Starks C, 1980).

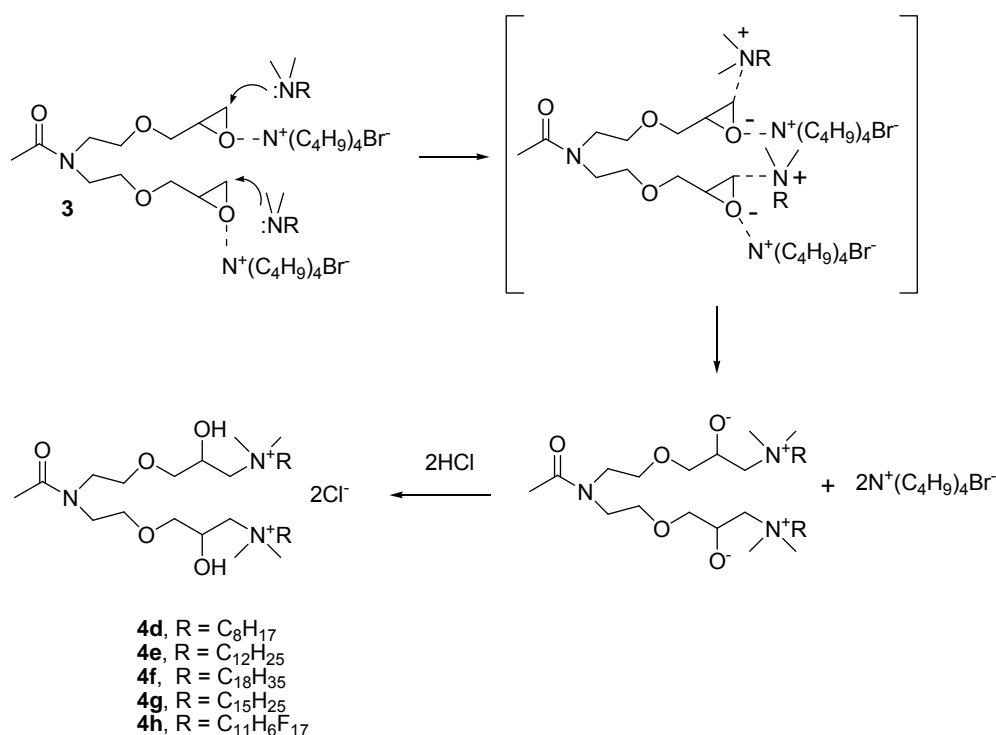
Finalmente, las cantidades obtenidas de éter diglicídico (80% de producto aislado) fueron suficientes como para realizar la siguiente etapa: la síntesis de los compuestos anfipáticos no iónicos (**4 a-c**) y catiónicos (**4 d-h**).

Durante esta etapa se procede con la aminoalquilación del intermediario llave, la cual no es más que una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ) (Morrison RT y col, 1987). La reacción se llevó a cabo en presencia de la correspondiente amina primaria o terciaria, TBABr (10 mol % con respecto al reactivo limitante o éter diglicídico) y etanol, a 30°C durante 18 h obteniéndose la nueva familia de compuestos *gemi*.

Es importante destacar que el TBABr  $[(C_4H_9)_4N^+Br^-]$  se incorpora en la mezcla de reacción como catalizador, ya que posee la capacidad de elevar la nucleofilicidad de las aminas. Gracias a la asistencia del TBABr y al medio básico en el cual transcurre la reacción, el nitrógeno de la amina (primaria o terciaria) ataca de manera efectiva y rápida al carbono menos sustituido de ambos epóxidos presentes en el intermediario "llave". Además, las aminas terciarias, en medio etanólico, son más nucleofílicas que las correspondientes aminas primarias (Kim T, Hirao T y col, 1996; Ricci C y col, 2002).

La función de la molécula catalizadora se muestra a modo de ejemplo para los *gemi* catiónicos en la **Figura 2.12**.





**Figura 2.12.** Asistencia del Bromuro de Tetrabutilamonio [(C<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>4</sub>N<sup>+</sup>Br<sup>-</sup>] en la aminoalquilación del intermediario “llave” o éter diglicídico (**3**) con aminas grasas terciarias para dar los compuestos *gemini* catiónicos (**4 d-h**).

En conclusión, una nueva familia de surfactantes tipo *gemini* fueron sintetizados de manera exitosa a partir de la *N*-acetildietanolamina.

Además, se sintetizaron dos análogos monoméricos **7a** y **7b** de longitud de cadena hidrocarbonada intermedia (C<sub>12</sub>). Como se dijo anteriormente, la decisión de sintetizar sólo los compuestos monoméricos análogos de los surfactantes no iónico (**4b**) y catiónico (**4e**) de longitud de cadena de carbono 12 radica en los resultados microbiológicos (screening) obtenidos para los compuestos *gemini* antes mencionados. Todos estos resultados serán analizados en más adelante en el Capítulo 4.

Es importante aclarar que, a pesar de observar buenos rendimientos en cada una de las síntesis realizadas, el porcentaje exacto de conversión de reacción para cada una de ellas no fue determinado. Los procesos sintéticos fueron monitoreados por cromatografía gaseosa (CG) o cromatografía en capa delgada (CCD) y las reacciones fueron detenidas

al observar el consumo total del reactivo limitante o al evidenciar una cantidad constante y considerable de producto a través del tiempo (sin consumición total del ya mencionado reactivo limitante). Los rendimientos mencionados corresponden a porcentajes de recuperación del producto en su estado puro.

## 2.7 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 2

- ✓ Diamant H, Andelman D. *Models of Gemini Surfactants*. Gemini Surfactants: Interfacial and Solution Phase Behavior. 1-16 (2003).
- ✓ Dubowchik GM, Firestone RA. *A lipophilic polyamino-bolaamphiphile designed to dissipate pH gradients across a bilayer membranes: synthesis and proton transport*. Tetrahedron Letters. 37, 6465-6468 (1996).
- ✓ Freedman, H. H.; Dubois, R. A. *An improved Williamson ether synthesis using phase transfer catalysis*. Tetrahedron Lett. 16, 3251-3254 (1975).
- ✓ Heeres EHJ, Schuur B, Wagenaar A, Heeres A. *A synthetic strategy for novel nonsymmetrical bola amphiphilic based on carbohydrates*. Carbohydrate Research. 339, 1147-1153 (2004).
- ✓ Kaplánek R, Paleta O. *Amphiphilic perfluoroalkylated sulfones and sulfonate betaines*. Journal of Fluorine Chemistry. 128, 789-796 (2007).
- ✓ Kim T, Hirao T, Ikeda I. *Preparation of bis-Quaternary Ammonium Salts from Epichlorohydrin*. JAOCS. 73, 67-71 (1996).
- ✓ Kim T, Kida T, Nakatsuji Y, Hirao T, Ikeda I. *Surface-active properties of novel cationic surfactants with two alkyl chains and two ammonio groups*. Journal of Oleo Science 73, 907-911 (1996).
- ✓ March J. *Advanced Organic Chemistry. Reactions, mechanisms and structure*. 4<sup>th</sup> ed, Wiley. New York (USA), (1992).
- ✓ Massi L, Guittard F, Geribaldi S, Levy R, Duccini Y. *Antimicrobial properties of highly fluorinated bis-ammonium salts*. International Journal of Antimicrobial Agents. 21, 20-26 (2003).
- ✓ Massi L, Guittard F, Geribaldi S, Levy R, Duccini Y. *Preparation and antimicrobial behaviour of gemini fluorosurfactants*. European Journal of Medicinal Chemistry. 38, 519-523 (2003).
- ✓ Massi L, Guittard F, Levy R, Geribaldi S. *Enhanced Activity of Fluorinated Quaternary Ammonium Surfactants against Pseudomonas aeruginosa*. European Journal of Medicinal Chemistry XXX, 1-8 (2008).

- ✓ Menger FM, Keiper J. *Gemini Surfactants*. Angew. Chem., Int. Ed. 39, 1906-1920 (2000).
- ✓ Menger FM, Littau CA. *Gemini Surfactants: A New Class of Self-Assembling Molecules*. J. Am. Chem. Soc. 115, 10083-10090 (1993).
- ✓ Menger FM, Mbadugha BNA. *Gemini Surfactants with a Disaccharide Spacer*. J. Am. Chem. Soc. 123, 875-885 (2001).
- ✓ Morrison, RT and Boyd RN. *Química Orgánica*. 5<sup>th</sup> ed, New York University, (1987).
- ✓ Murguía MC, Grau RJ. *Synthesis of New Pentaerythritol-Based Gemini Surfactants*. Synlett. 8, 1229-1232 (2001).
- ✓ Murguía, MC, Cabrera MI, Grau RJ. *Selective Preparation of Key Intermediates for the Synthesis of Gemini Surfactants by Phase Transfer Catalysis*. React. Kinet. Catal. Lett., 75, 205-211 (2002).
- ✓ Neetu Tewari VK, Tiwari RP, Tripathi V, Chaturvedi A, Srivastava R, Srivastava PK, Shukla AK, Chaturvedi A, Gaikward A, Sinha S, Srivastava BS. *Synthesis of Galactopyranosyl Amino Alcohols as a New Class of Antitubercular and Antifungal Agents*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 14, 329-332 (2004).
- ✓ Nougier R, Mchich M. *Alkylation of Pentaerythritol by Phase-Transfer Catalysis*. Tetrahedron 44, 2477-2481 (1988).
- ✓ Nougier R. *Biocidal Activity of some Mannich Base Cationic Derivates*. Bioorganic and Medicinal Chemistry. 13, 5921-5926 (2005).
- ✓ Perrin DD, Armarego WLF, Perrin D. *Purification of Laboratory Chemicals*. 2<sup>da</sup> ed. Pergamon Press, (1980).
- ✓ Pine SH, Sanchez SL. *The Formic Acid-Formaldehyde Methylation of Amines*. Journal Organic Chemistry 36,829-832 (1971).
- ✓ Ricci C, Cabrera MI, Luna JA, Grau RJ. *A convenient synthesis of ammonium gemini surfactants from long-chain alkyldimethylamines and epichlorohydrin*. Synlett. 11, 1811-1812 (2002).
- ✓ Rosen, M.J. *In Surfactants and Interfacial Phenomena*. 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley and Sons. New York, N.Y. 212 (1989).
- ✓ Starks C. *Selecting a Phase Transfer Catalyst*. Chemtech, 110-117 (1980).

- ✓ Starks CM. *Phase-transfer catalysis. I. Heterogeneous reactions involving anion transfer by quaternary ammonium and phosphonium salts.* J. Am. Chem. Soc. 93, 195-199 (1971).
- ✓ Szlávik Z, Tárkányi G, Gömöry Á, Tarczay G, Rábai J. *Convenient syntheses and characterization of fluorophilic perfluorooctyl-propyl amines and ab initio calculations of proton affinities of related model compounds.* Journal of Fluorine Chemistry 108: 7-14 (2001).
- ✓ Vogel, A.I. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry.* 5<sup>th</sup> ed, Longman Group. London, (1989).
- ✓ Zhu Y, Masuyama A, Kirito Y, Okahara M, Rosen MJ. JAOC. 69, 626-632 (1992).
- ✓ Zhu Y, Masuyama A, Kirito Y, Okahara M. *Preparation and Properties of Double-or Triple-Chain Surfactants with to Sulfonate Groups Derived from N-Acyldiethanolamines.* JAOC. 68, 539-543 (1991).
- ✓ Zhu Y, Masuyama A, Okahara M. *Preparation and Surface Active Properties of Amphipatic Compounds with Two Sulfate Groups and Two Lipophilic Alkyl Chains.* JAOC. 67, 459-462 (1990).

## **CAPÍTULO 3**

# **“ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES ACTIVAS DE SUPERFICIE DE LOS COMPUESTOS *GEMINI* SINTETIZADOS”**

### 3.1 TENSIÓN SUPERFICIAL

Los tensoactivos son sustancias con propiedades fisicoquímicas fascinantes que pueden ser utilizadas de diferentes maneras, ya sea como detergentes, inhibidores de la corrosión, lubricantes, emulsificantes, antimicrobianos, etc. (Jungermann E, 1970).

Como se dijo en el capítulo anterior, las moléculas *gemini* están compuestas por dos surfactantes monoméricos unidos por una cadena espaciadora. Estas constituyen una nueva clase de moléculas anfipáticas de comportamiento particular y numerosas ventajas (Diamant H y col, 2003).

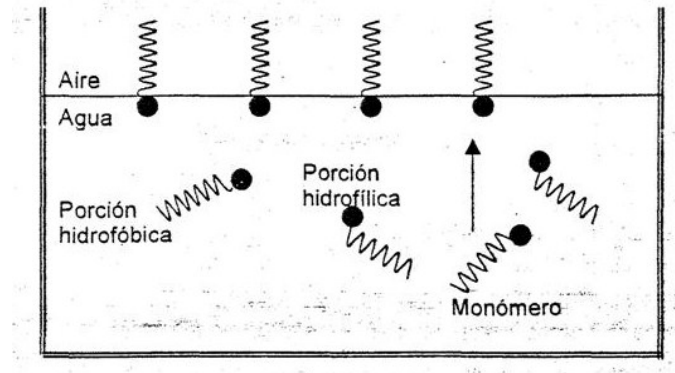
Los compuestos *gemini*, al igual que otros tensoactivos, presentan una característica dual, ya que poseen una cabeza polar la cual es altamente soluble en agua y una cola hidrofóbica cuya tendencia es disminuir el contacto con el agua. La cabeza polar puede ser de naturaleza catiónica (grupos amonio, piridinio), aniónica (grupos sulfato, sulfonatos, fosfatos y carboxilatos), no iónica (carbohidratos) o zwitteriónica (betaína). Las colas consisten en una o más cadenas alquílicas las cuales pueden ser ramificadas o no ramificadas, saturadas o insaturadas, entre otras.

Durante la última década, el descubrimiento de este tipo de surfactantes diméricos con propiedades activas de superficies mejoradas, en comparación con las de los tensoactivos monoméricos, fue razón suficiente para motivar el estudio y diseño de dichos compuestos por parte de los investigadores (Renouf P y col, 1999).

Una manera práctica y sencilla de estudiar el comportamiento fisicoquímico de un compuesto tensoactivo es a través de las medidas de tensión superficial. Este parámetro se define como la cantidad de energía necesaria para disminuir la superficie de un líquido por unidad de área. Suele representarse mediante la letra  $\gamma$  y expresarse en mN/m.

Cuando un agente tensoactivo se disuelve en un medio acuoso el grupo hidrofóbico distorsiona la estructura del agua (por ruptura de enlaces puente hidrógeno y por reestructuración de las moléculas de agua en la vecindad del grupo hidrofóbico). Como resultado de esta distorsión, algunas de las moléculas del surfactante son expulsadas hacia la interfase del sistema, con sus grupos hidrofóbicos orientados a fin de reducir al mínimo el contacto con las moléculas de agua. Así, la superficie del agua se cubre con una sola capa de tensoactivo con sus grupos hidrofóbicos predominantemente orientados

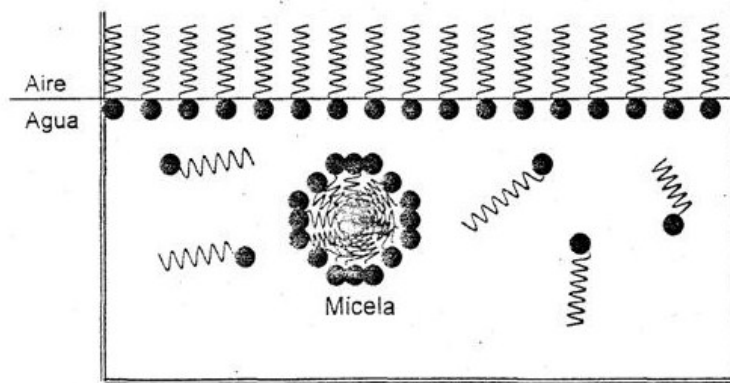
hacia el aire. Este comportamiento se traduce en una disminución de la tensión superficial del agua y dependiendo de las características estructurales de las cadenas hidrofóbicas, estas adoptarán un tipo específico de conformación sobre el área superficial. En la **Figura 3.1** se muestra, por ejemplo, dicho comportamiento para un surfactante convencional.



**Figura 3.1.** Comportamiento de un surfactante convencional disuelto en un medio acuoso.

Cuando la superficie de la disolución se encuentra totalmente ocupada por el agente superficial (a medida que aumenta la concentración del tensoactivo), las moléculas en el seno de la solución recurren a una segunda alternativa energética que consiste en la agregación espontánea o formación de micelas en solución (mínimo de energía). Estos agregados, distribuidos en el seno del líquido, mantienen un equilibrio con las moléculas libres del tensoactivo en disolución y en la superficie (**Figura 3.2**). Así, la concentración del surfactante en la que las moléculas individuales se agregan para formar micelas puede definirse como Concentración Micelar Crítica (*CMC*).





**Figura 3.2.** Comportamiento de un agente tensoactivo disuelto en un medio acuoso a medida que aumenta su concentración. Formación de micelas al saturarse la superficie del líquido.

Esta descripción cualitativa surge de la ecuación fundamental de la termodinámica de superficies: la Ecuación de Adsorción de Gibbs en fases fluidas, referida al proceso de adsorción líquido-vapor y a la observación del comportamiento de la tensión superficial de tensoactivos en disolución, relativa a la variación de la concentración. Esta ecuación puede ser expresada como:

$$\Gamma = - (1/n \cdot 2.303 RT) \cdot (d\gamma / d \log C),$$

donde  $\Gamma$  es la concentración de superficie del tensoactivo ( $\text{mol/m}^2$ ),  $n$  es igual a 2 para surfactantes iónicos,  $R$  es la constante de los gases ( $8,3144 \text{ J/K}\cdot\text{mol}$ ),  $T$  la temperatura absoluta (K),  $\gamma$  la tensión superficial ( $\text{mN/m}$ ) y  $C$  la concentración del surfactante (M). La ecuación de adsorción de Gibbs indica que  $\Gamma$  depende de los cambios en las medidas de tensión superficial con respecto a la composición de la disolución, bajo condiciones isotérmicas.

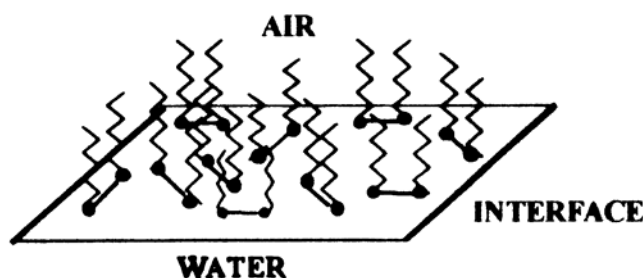
Por otro lado, conociendo el valor de  $\Gamma$  y asumiendo una monocapa de surfactante en la interfase aire-agua, el área por molécula ( $A$ ) en dicha interfase es otro parámetro de gran importancia que puede calcularse a partir de la siguiente expresión:

$$A = 1/N\Gamma,$$

donde  $N$  es el número de Avogadro y  $T$  la temperatura (Eastoe J y col, 2000, Chlebicki J y col, 2005 y Han y col, 2009).

En consecuencia, las medidas de tensión superficial de un determinado compuesto a diferentes concentraciones nos permiten estimar algunos parámetros como ser  $CMC$ ,  $\Gamma$ ,  $A$ , entre otros. Estos valores son de gran utilidad y nos acercan al comportamiento que puede tener un compuesto en una disolución o en la interfase de la misma.

A continuación, en la **Figura 3.3**, se presenta, a modo de ejemplo, una monocapa de surfactantes *gemini* en la interfase aire-agua.



**Figura 3.3.** Monocapa de surfactantes *gemini* en la interfase aire-agua con sus grupos hidrofóbicos orientados hacia el aire.

En el capítulo 2, se detalló la síntesis o preparación de una serie de nuevas e interesantes moléculas tanto diméricas como monoméricas. En el transcurso de este capítulo se presentarán los conceptos y metodologías empleados en la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Con el propósito de estudiar las propiedades de superficie de los compuestos sintetizados se realizaron medidas de *tensión superficial* utilizando, para cada compuesto ensayado, una serie de soluciones acuosas a diferentes concentraciones. Estas medidas se llevaron a cabo solo para los compuestos catiónicos (**4d-h y 7b**), debido a que la solubilidad en agua de los mismos excede ampliamente a la de los compuestos no iónicos (**4a-c y 7a**).

Las medidas de tensión superficial de las soluciones acuosas se determinaron por el método de desprendimiento del anillo de Du Nouy y se midieron a 20°C y pH 7 utilizando un tensiómetro semiautomático Cole-Parmer Surface Tensiomat 21 (**Figura 3.4**).



**Figura 3.4.** Tensiómetro Semiautomático Cole-Parmer Surface Tensiomat 21.

El equipo fue calibrado usando como referencia compuestos puros y/o soluciones estándares cuyas tensiones superficiales cubrieron el rango de 20-70 mN/m (a 20 °C y pH 7). La tensión superficial fue medida tres veces para cada muestra con un intervalo de 40 minutos para cada lectura de manera de alcanzar un estado de equilibrio ya que se observaba un incremento en los valores experimentales sobre las sucesivas medidas de cada una de las soluciones.

Con la ayuda de estos datos se construyó la gráfica de Tensión Superficial (mN/m) vs. Log Concentración (Log M) y a partir de la misma se determinaron los valores de Concentración Micelar Crítica (CMC) para cada compuesto (estimados a partir del punto de quiebre de la curva), así como también, los valores para otros parámetros fisicoquímicos que serán presentados y analizados a continuación (Murguía MC, Vaillard VA y col, 2008).

### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Realizando medidas de tensión superficial y por medio de la construcción de las gráficas correspondientes para cada compuesto [Tensión Superficial (mN/m) vs. Log Concentración (Log M)] fue posible estudiar el comportamiento fisicoquímico de las moléculas catiónicas sintetizadas **4d-h** y **7b**. Los compuestos catiónicos fueron ensayados debido su buena solubilidad en agua. Las propiedades tensoactivas y de agregación de los compuestos no iónicos **4a-c** y **7a** no pudieron ser determinadas debido a su baja solubilidad en agua y a que fueron incapaces de mantener una emulsión estable.

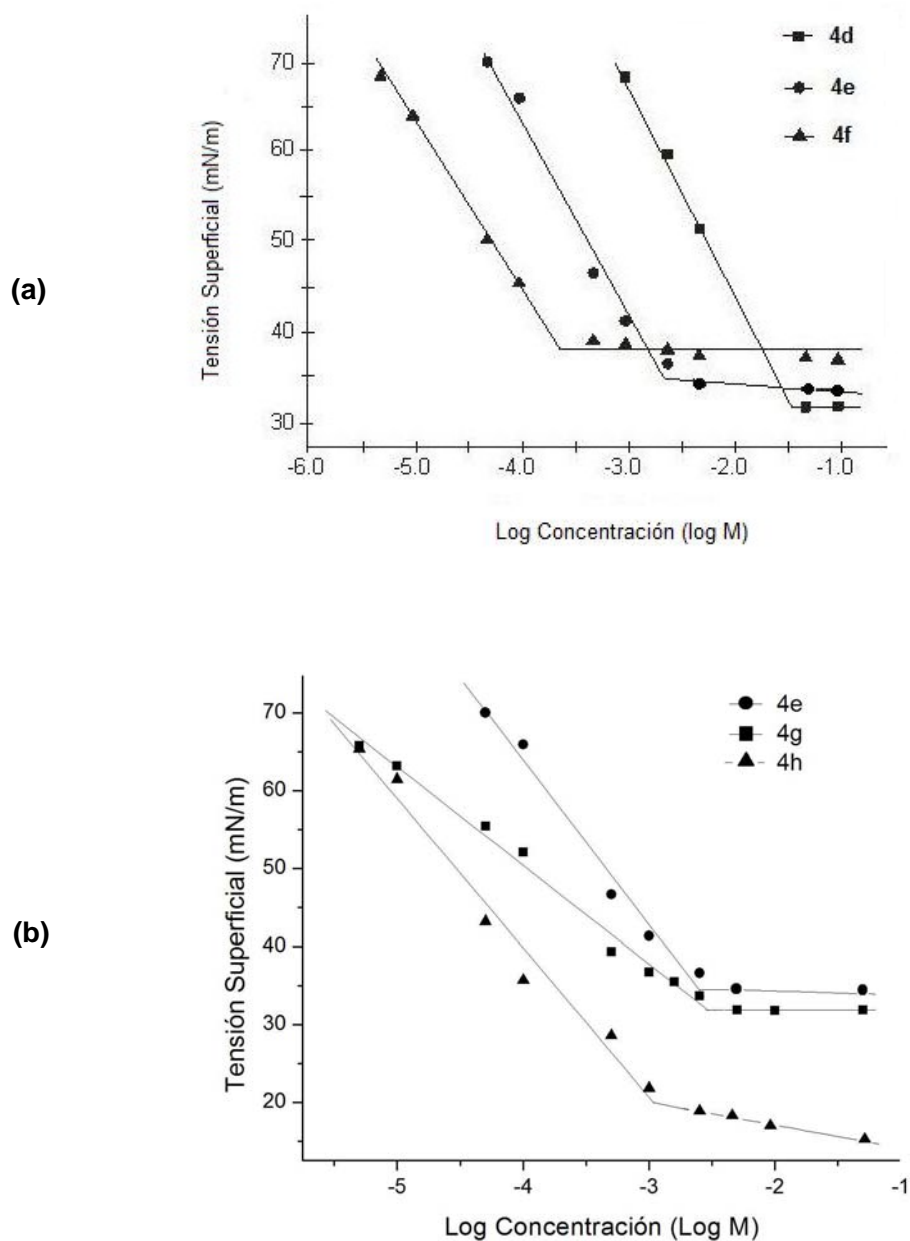
En la **Figura 3.5 a-b** podemos observar los valores de tensión superficial obtenidos para las soluciones acuosas de los compuestos *geminis* en función de la concentración.

De modo general, podemos afirmar que a bajas concentraciones de surfactante la tensión superficial decrece bruscamente con el incremento de la concentración hasta alcanzar lo que se denomina “punto de quiebre” de la gráfica. La concentración de surfactante lograda en este punto es asumida como la concentración micelar crítica (*CMC*) de cada molécula de ensayada. Luego, se observa una pequeña disminución en la tensión superficial aún cuando la concentración del surfactante excede la *CMC*. Esta disminución ha sido observada por diferentes autores para otros compuestos *geminis*, aunque la razón exacta por la cual ocurre aún no ha sido presentada (Sakai K y col, 2008).

Analizando los resultados obtenidos para los compuestos de diferentes longitudes de cadena hidrocarbonada (**Figura 3.5 a**), podemos afirmar que dichos compuestos poseen una buena actividad detergente y que a mayor número de átomos de carbono (porción hidrofóbica de la molécula), se obtienen valores menores de *CMC*.

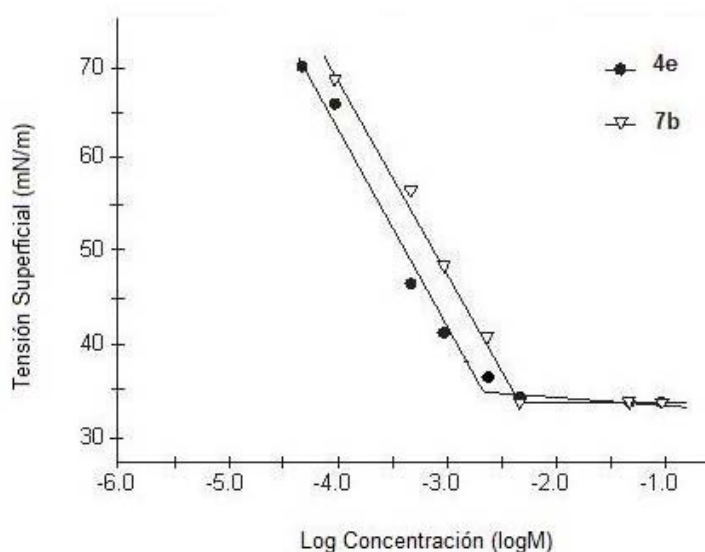
Por otro lado, para los compuestos con regiones hidrofóbicas de diferente naturaleza saturada, insaturada y perfluorada (**Figura 3.5 b**) podemos decir que, un cambio en la naturaleza de la porción no polar de la molécula de surfactante (manteniendo aproximadamente constante la longitud de la misma) puede modificar significativamente los valores de *CMC*. En este caso en particular, observamos una disminución en el valor de *CMC* para **4e** con respecto a **4g**, así como también para **4h** con respecto a **4e** y **4g**.

Es importante aclarar que tanto los valores de *CMC* para cada compuesto como otros parámetros fisicoquímicos calculados se presentarán más adelante en la **Tabla 3.1**.



**Figura 3.5.** Tensión Superficial vs. Logaritmo de la Concentración Molar de los compuestos catiónicos a 20 °C y pH 7: **(a)** Curvas para los compuestos de diferentes longitudes de cadena hidrocarbonada  $C_8$ ,  $C_{12}$  y  $C_{18}$ , **(4d-f)**. **(b)** Curvas para los compuestos **4e**, **4g** y **4h** con regiones hidrofóbicas de diferente naturaleza: saturada, insaturada y perfluorada respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, el comportamiento fisicoquímico del compuesto monomérico catiónico **7b** también fue evaluado. En este caso, el objetivo fue comparar su desempeño o comportamiento frente al *gemi*ni correspondiente (análogo de  $C_{12}$ , **4e**). La curva de Tensión Superficial vs. Log Concentración para los compuestos antes mencionados, dimérico y monomérico, de igual longitud de cadena puede apreciarse en la **Figura 3.6**.



**Figura 3.6.** Tensión Superficial vs. Logaritmo de la Concentración Molar de los compuestos catiónicos dimérico (**4e**) y monomérico (**7b**) a 20 °C y pH 7.

A partir de esta gráfica, podemos afirmar claramente que las propiedades activas de superficie del compuesto *gemi*ni (**4e**) son mucho más alentadoras que para el compuesto (**7b**). Estos resultados, coincidentes con lo expresado por otros autores, confirman la superioridad de los compuestos diméricos frente a los monoméricos. Además, se observó que los valores de tensión superficial medidos por encima de la *CMC* para el compuesto monomérico son prácticamente constantes, a diferencia de lo que ocurre en esa región para la molécula dimérica (Sakai K y col, 2008).

Finalmente, la concentración micelar crítica (*CMC*), la capacidad de disminuir la tensión superficial por encima de la *CMC* ( $\gamma_{CMC}$ ), la eficiencia de adsorción en la interfase aire-

agua ( $C_{20}$ : concentración de surfactante necesaria para reducir en  $20 \text{ mN m}^{-1}$  la tensión superficial del agua a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $pC_{20}$ : que se define como el  $-\log C_{20}$ ), la relación ( $CMC/C_{20}$ ) que mide la tendencia de los tensoactivos a adsorberse a la interfase con respecto a la tendencia a formar micelas, la cantidad de surfactante adsorbido en la interfase que manifiesta el efecto cooperativo entre las moléculas  $\Gamma$  y el área interfacial ocupada por una molécula de surfactante  $A$  de cada uno de los tensoactivos ensayados se muestran a continuación en la **Tabla 3.1**.

Como se explicó anteriormente, el exceso de superficie en la interfase aire-agua o  $\Gamma$  para cada compuesto, fue calculado aplicando la ecuación de adsorción de Gibbs (isoterma de Gibbs). El área por molécula en la interfase aire-agua o  $A$ , se estimó a partir del correspondiente valor de  $\Gamma$ .

**Tabla 3.1.** Actividad de superficie y datos de agregación de los compuestos catiónicos (**4 d-h y 7b**)<sup>a</sup>.

Compuesto	$CMC$ (mM)	$C_{20}$ (mM)	$\gamma_{CMC}$ (mN/m)	$pC_{20}$	$CMC/C_{20}$	$\Gamma \times 10^6$ (mol/m <sup>2</sup> )	$A \times 10^{20}$ (m <sup>2</sup> )
<b>4d</b> <sup>b</sup>	34.787	5.475	31.84	2.26	6.35	2.10	78.88
<b>4e</b> <sup>b</sup>	2.455	0.410	34.58	3.39	5.99	1.85	90.14
<b>4f</b> <sup>b</sup>	0.219	0.049	39.24	4.31	4.47	1.58	105.18
<b>4g</b> <sup>b</sup>	2.925	0.089	31.84	4.04	32.86	1.12	148.24
<b>4h</b> <sup>b</sup>	0.621	0.024	19.22	4.61	25.87	2.01	82.60
<b>7b</b> <sup>c</sup>	4.974	0.854	33.94	3.06	5.82	1.95	84.94

<sup>a</sup> Condiciones experimentales: Temperatura  $20 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Solución acuosa a  $\text{pH}=7$ . La incertidumbre experimental estimada sobre los valores de  $CMC \pm 0.03 \text{ mM}$  y sobre los valores de  $\gamma_{CMC} \pm 1 \text{ mN/m}$ .

<sup>b</sup> Compuestos diméricos catiónicos (*gemini*)

<sup>c</sup> Compuesto monomérico catiónico

Los resultados presentados en la Tabla 3.1 se encuentran acorde al comportamiento de surfactantes clasificados como de moderados a buenos. A partir de éstos podemos afirmar que, para **4d-f**, un aumento en la longitud de la cadena carbonada resulta en una disminución significativa en los valores de  $CMC$  y un incremento en la  $pC_{20}$ . La combinación de estos resultados sugiere que la adsorción de dichos compuestos en la interfase aire-agua de la solución ocurre más eficientemente para los surfactantes de cadena larga (de mayor carácter hidrofóbico) que para los de cadena más corta. Estos resultados nos permiten pensar en la formación de un film, una capa empaquetada o llena en la interfase para los compuestos de cadena hidrocarbonada larga. Asimismo, se puede observar claramente la superioridad del compuesto dimérico **4e** con respecto a su análogo monomérico **7b**.

Por otro lado, el cambio en la naturaleza de la porción hidrofílica de la molécula también modifica los parámetros fisicoquímicos calculados proporcionando valores favorables de  $CMC$  como de  $pC_{20}$  para los compuestos que presentan insaturaciones (**4g**) y átomos de flúor (**4h**) en la porción hidrofóbica de la molécula.

El exceso de superficie  $\Gamma$  y el área por molécula  $A$  mostraron variedad de valores para los compuestos de la serie catiónica. Efectivamente,  $A$  en los surfactantes de dicha serie se encontró en un rango de entre 78.88 y 148.24 Å<sup>2</sup>, mostrando un área por molécula mayor con el incremento del largo de la cola carbonada para los compuestos **4d-f**. Esto podría atribuirse a la flexibilidad del grupo espaciador y a las fuerzas intermoleculares de *Van der Waals* incrementadas con el largo de la cadena.

Por otro lado, se observó un incremento en el valor de la relación  $CMC/C_{20}$ , para los compuestos **4g** y **4h** donde la cola hidrocarbonada fue reemplazada por una cola insaturada y fluorada respectivamente. Este incremento significa que la adsorción de estos surfactantes respecto de **4d-f** es aún más eficiente. Si observamos la gráfica (Figura 3.5 a-b), podemos apreciar que las pendientes para **4g** y **4h** son muy diferentes a la de sus homólogos hidrocarbonatos **4d-f**. Estas pendientes marcadamente diferentes, muestran las distintas capacidades de adsorción de cada surfactante a la interfase agua-aire, antes que se agrupen y formen estados de agregación.

En conclusión podemos decir que dados los valores de  $CMC$ ,  $C_{20}$ ,  $\gamma_{CMC}$ ,  $pC_{20}$ ,  $CMC/C_{20}$ ,  $\Gamma$  y  $A$ , la serie de compuestos catiónicos sintetizados presentó buenas propiedades activas



de superficie y de agregación. De la serie, se destacan principalmente los gemini **4f** y **4h** que muestran valores de  $pC_{20}$  de 4.31 y 4.61 y valores de  $CMC$  de  $2.19 \times 10^{-4}$  M y  $6.21 \times 10^{-4}$  M respectivamente.

### 3.4 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 3

- ✓ Chlebicki J, Wegrzynska J, Maliszewska I, Oswiecimska M. *Preparation, Surface-Active Properties, and Antimicrobial Activities of Bis-quaternary Ammonium Salts from Amines and Epichlorohydrin*. Journal of Surfactants and Detergents. 8, 227-232 (2005).
- ✓ Diamant H, Andelman D. *Models of Gemini Surfactants*. Gemini Surfactants: Interfacial and Solution Phase Behavior. 1-16 (2003).
- ✓ Eastoe J, Dalton JS. *Dynamic surface tension and adsorption mechanisms of surfactants at the air-water interface*. Advances in Colloid and Interface Science. 85, 103-144 (2000).
- ✓ Han L, Zhang Y, Li H, Li L. *The synthesis and surface activity of perfluoro-2,5-dimethyl-3,6-dioxanonanoic acid ester fluorocarbon surfactants*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 334, 176-180 (2009).
- ✓ Jungermann Eric. *Cationic Surfactants*. Surfactant Science Series. Volumen 4, Marcel Dekker INC. New York, USA (1970).
- ✓ Murguía MC, Vaillard VA, Sánchez VG, Di Conza J, Grau RJ. *Synthesis, surface-active properties, and antimicrobial activities of new double-chain gemini surfactants*. Journal of Oleo Science. 57, 301-308 (2008).
- ✓ Renouf P, Hebrault D, Desmurs JR, Mercier JM, Mioskowski C, Lebeau L. *Synthesis and surface-active properties of a series of new anionic gemini compounds*. Chemistry and Physics of Lipids. 99, 21-32 (1999).
- ✓ Sakai k, Umezawa S, Tamura M, Takamatsu Y, Tsuchiya K, Torigoe K, Ohkubo T, Yoshimura T, Esumi K, Sakai H, Abe M. *Adsorption and micellization behavior of novel gluconamide-type gemini surfactants*. Journal of Colloid and Interface Science. 318, 440-448 (2008).

## **CAPÍTULO 4**

# **“ESTUDIO *IN VITRO* DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS COMPUESTOS *GEMINI* SINTETIZADOS”**

## 4.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Actualmente, se conocen diferentes maneras de efectuar el control del crecimiento microbiano. En general, puede ejercerse dicho control limitando el crecimiento de los microorganismos (proceso llamado inhibición), o bien, provocando la pérdida de su viabilidad (muerte o eliminación).

En la práctica, esto se consigue mediante la aplicación de agentes físicos o químicos, destacándose entre estos últimos los compuestos antimicrobianos.

Un agente antimicrobiano es un compuesto de naturaleza química, de origen natural o sintético, que inhibe el crecimiento o mata a los microorganismos, pudiendo hasta provocar su lisis (Madigan MT y col, 2004).

Cuando se añade un agente antimicrobiano a un cultivo de microorganismos en fase exponencial de crecimiento pueden producirse tres efectos diferentes:

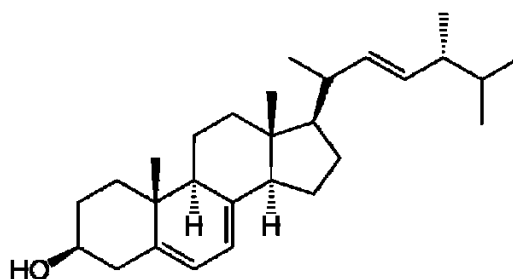
- ❖ -stático: donde se inhibe el crecimiento pero las células no mueren. Cuando disminuye la concentración del agente en cuestión, el crecimiento se reanuda.
- ❖ -cida: en el cual las células mueren pero no hay lisis ni rotura de las mismas. Este efecto no se elimina por dilución del compuesto antimicrobiano.
- ❖ -lítico: aquí se provoca la muerte celular por lisis, la rotura se detecta por un descenso en el número de células o de la turbidez después de añadir el agente.

En algunas industrias, los agentes antimicrobianos se utilizan en forma rutinaria y extensiva. Con frecuencia, los residuos tóxicos que se producen cuando se liberan al ambiente grandes cantidades de agentes antimicrobianos como mercurio, otros compuestos de metales pesados o fenoles (como en las industrias papeleras, del cuero, o de la madera) generan serios problemas ambientales.

Por lo tanto, un buen agente antimicrobiano es aquel que se dirige selectivamente hacia los microorganismos, siendo lo más seguro posible para el hospedero y para el medio

ambiente. Estas características son importantes a considerar cuando se trata de diseñar nuevos antimicrobianos o de evaluar la eficacia de este tipo de compuestos.

Otra característica a tener en cuenta al momento de idear un compuesto químico con posible actividad biológica es el conocimiento de las diferentes estructuras y composición química de los distintos tipos de microorganismos. En el caso de los hongos, si bien se trata de células eucariotas, su membrana citoplasmática, aunque estructuralmente es similar a la de otras células contiene ergosterol, compuesto de naturaleza lipídica que se transforma en un “blanco” potencial por encontrarse sólo en células fúngicas (**Figura 4.1**).



**Figura 4.1.** Estructura de la molécula de ergosterol presente en la membrana fúngica

En consecuencia, a la hora de diseñar un compuesto químico con potencial actividad antimicrobiana, el abanico de exigencias que se plantea actualmente es el siguiente: eficacia y seguridad, estabilidad y espectro de acción reguladas de acuerdo a la aplicación, toxicidad muy baja, preservación del medio ambiente (ecotoxicidad muy baja), y economía de uso.

A raíz de esto, es nuestro interés estudiar las propiedades biológicas de las nuevas moléculas de naturaleza anfipática sintetizadas: los *gemini*.

La selección y el diseño de las estructuras desarrolladas no son arbitrarios, provienen del estudio de antifúngicos del tipo de la Amfotericina B (ver Figura 1.10 a del capítulo 1). Analizando su estructura química podemos observar la presencia de un anillo lactónico con muchos dobles enlaces unido a residuos de azúcar (Botana López L y col, 2002). Este antimicótico poliénico y anfipático, de gran efectividad pero de elevada toxicidad, es no iónico y se fija al ergosterol de la membrana celular del hongo formando poros que

originan la pérdida de iones, especialmente potasio, y otros componentes esenciales de la célula. Esto produce la permeabilización de la membrana y la muerte celular (Milhaud J y col, 2002).

Si bien las estructuras químicas de las moléculas sintetizadas no están íntimamente relacionada con la de la Anfotericina B, tienen una característica en común: ambas son moléculas anfipáticas. Esta característica es de vital importancia a la hora de intentar conseguir daño a nivel de membrana.

En consecuencia, podríamos plantear como hipótesis que las diferentes regiones presentes en los *gemini* sintetizados les brindarían las siguientes capacidades:

- ❖ Todos los compuestos poseen una región apolar conformada por dos cadenas hidrofóbicas con función lipofílica que los haría permeables a las membranas celulares (Caillier L y col, 2009). Además, cuentan con la presencia del grupo aminoacetilo, de consabida actividad biológica (Massi L y col, 2008). Finalmente, esta porción no polar podría favorecer la unión o fijación de los *gemini* al ergosterol de la membrana fúngica.
- ❖ Los compuestos catiónicos se caracterizan por una región polar con dos cargas netas positivas derivadas de las sales de bis-amonio cuaternario. Esta característica les permitiría adsorberse sobre la superficie celular e interactuar con especies de cargas opuestas (Kobuke Y y col, 1992).
- ❖ Los tres compuestos no iónicos utilizarían la funcionalidad  $\beta$ -hidroxi amino, capaz de inhibir una serie de enzimas vitales para el metabolismo de algunos microorganismos, siendo una de ellas, la glicosil transferasa (Neetu Tewari VK y col, 2004).

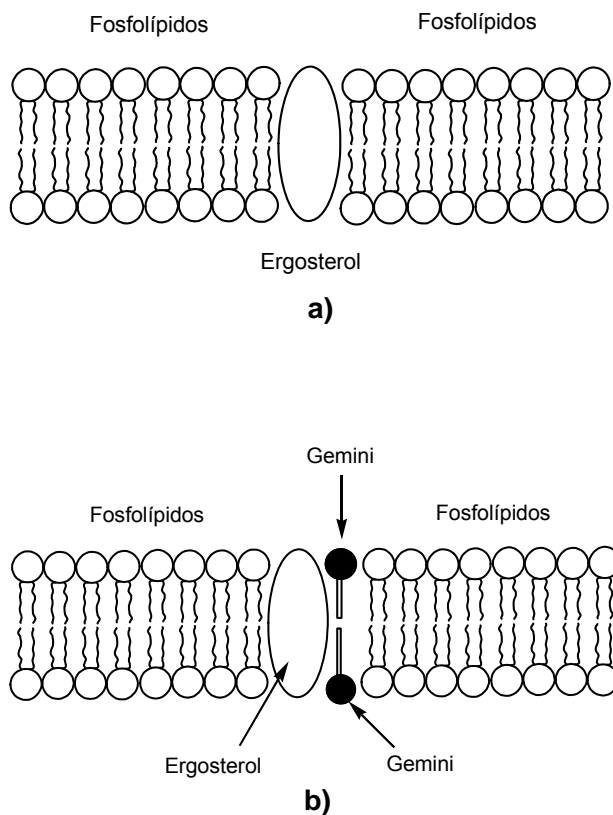
Es importante dejar en claro que, para que una droga sea capaz de formar poros en la membrana plasmática de algún organismo es necesario que la misma posea en su estructura una porción hidrofóbica en contacto con el ambiente lipídico de la membrana y

una porción hidrofílica que permita la formación de un canal y el intercambio de iones con el medio.

Por lo tanto, dejamos planteada la posibilidad de que los compuestos *gemini* se internalicen en la membrana fúngica, tal vez atraídos por las moléculas de ergosterol, provocando un cambio letal en las propiedades de la misma (Milhaud J y col, 2002). Sin embargo, dada la estructura química de estos compuestos, sería difícil pensar en la generación de canales o poros.

Actualmente, el mecanismo de acción de la Amfotericina B no está completamente dilucidado. Como se dijo anteriormente, se acepta su capacidad para formar poros en la membrana celular causando cambios desfavorables en ella (Paquet MJ, 2002).

En la **Figura 4.2**, podremos apreciar el comportamiento hipotético sugerido anteriormente para los compuestos *gemini*, en el cual dichas moléculas presentarían la habilidad de internalizarse en la membrana plasmática e interactuar con los fosfolípidos y, en el mejor de los casos, con el ergosterol presente en ella.



**Figura 4.2.** Modelo simplificado de la bicapa fosfolipídica de los hongos (se omite la presencia de proteínas y carbohidratos):

**a)** membrana plasmática fúngica con ergosterol.

**b)** comportamiento hipotético sugerido para un surfactante del tipo *gemini*. Asociación letal de ergosterol-*gemini*-fosfolípidos en la membrana fúngica.

Debido a lo dicho anteriormente, a continuación, se presentará la metodología empleada en la determinación de la actividad biológica de los compuestos sintetizados.

#### **4.1.1 Técnica de Dilución en Caldo**

Un aspecto importante a la hora de evaluar la actividad biológica de un compuesto químico es el concepto de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).

La actividad antimicrobiana se mide determinando la menor concentración del agente en cuestión, capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo determinado. A este valor se lo denomina CIM.

La CIM puede realizarse en medios líquidos (también en medios sólidos). Para ello se prepara una serie de diluciones decrecientes del antimicrobiano a probar, que se enfrentarán con la cepa para la que se pretende determinar la CIM.

Este procedimiento simple y eficaz para medir la actividad antimicrobiana, se conoce como técnica de dilución en caldo y es la metodología de elección para evaluar el desempeño de las moléculas sintéticas obtenidas.

Es importante destacar que, el valor de CIM no es una constante para un determinado agente ya que la misma se ve afectada por la naturaleza del organismo utilizado, el tamaño del inóculo, la composición del medio de cultivo, el tiempo de incubación y las condiciones de incubación tales como la temperatura, el pH y la aireación. Cuando se estandarizan rigurosamente todas estas condiciones, es posible comparar entre sí diferentes agentes antimicrobianos y determinar cuál de ellos es el más efectivo frente a un determinado organismo o valorar la actividad de un agente frente a una variedad de organismos.

Finalmente, este método no distingue entre un agente microbicida y un agente microbiostático, dado que el agente está presente en el medio de cultivo durante todo el período de incubación (Madigan MT y col, 2004).

## **4.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

Para la determinación de la concentración inhibitoria mínima de los compuestos catiónicos y no iónicos sintetizados frente a diferentes cepas de hongos se emplearon:



- Caldo Sabouraud Glucosado (CS) de Laboratorios Britania SA, adquirido comercialmente (ver composición en ANEXO).
- Agar Sabouraud (AS), preparado a partir de CS y Agar-Agar (Laboratorios Britania SA).
- Dimetilsulfóxido (DMSO) comercial (Sintorgan S.A. Argentina).
- Estándar de turbidez 0.5 de McFarland (sulfato de bario), preparado a partir de cloruro de bario y ácido sulfúrico según indicaciones de CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) (ver preparación en ANEXO).
- Microorganismos de referencia provenientes de la colección ATCC (*American Type Culture Collection*): *Candida albicans* ATCC 64548, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Aspergillus niger* ATCC 16404.
- Aislamiento regional de *Candida parapsilosis* y *Alternaria sp.* (gentileza del Dr. Arturo Simonetta de la facultad de Ingeniería Química y de la Dra. Cristina Lurá de la Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas – Universidad Nacional del Litoral).
- Fluconazol (Todofarma S.A), el cual fue adquirido comercialmente.
- Bio F-36 (Pellital S.A.) adquirido comercialmente (ver descripción del producto y hoja de seguridad en ANEXO).

### 4.3 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

La actividad antifúngica fue evaluada usando medidas de CIM expresadas en µg/ml. Para determinar la CIM se utilizó la técnica de dilución en caldo. Estos procedimientos se ajustaron a los métodos de referencia aprobados por la CLSI o antiguamente llamada NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (NCCLS: M27-A2 y M38-A, 2002).

El procedimiento general consistió en la preparación de una batería de tubos, donde cada tubo contenía medio de cultivo (caldo) con una concentración diferente del compuesto a ensayar. Como medio de cultivo se utilizó Caldo Sabouraud Glucosado (Laboratorios Britania S.A.) al que se le ajustó el pH a  $7.0 \pm 0.1$  con una solución de NaOH 3 M. Luego, se procedió a la inoculación de los tubos con el correspondiente microorganismo.

Una vez inoculados los tubos, los mismos fueron incubados a  $35 \pm 0.2$  °C por un período que varió entre 48 y 72 horas según el microorganismo empleado en el ensayo. Transcurrida la incubación, se procedió a observar la presencia o ausencia de desarrollo del microorganismo en cada uno de los tubos.

El valor de la CIM correspondió al tubo con la menor concentración del antimicrobiano, en el que no se observó desarrollo visible del microorganismo utilizado en el ensayo.

Para el ensayo de dilución en caldo se emplearon hongos levaduriformes y filamentosos.

A continuación se describen las especies de hongos utilizadas, la preparación del inóculo y la visualización del valor de CIM para cada caso (levaduras y mohos).

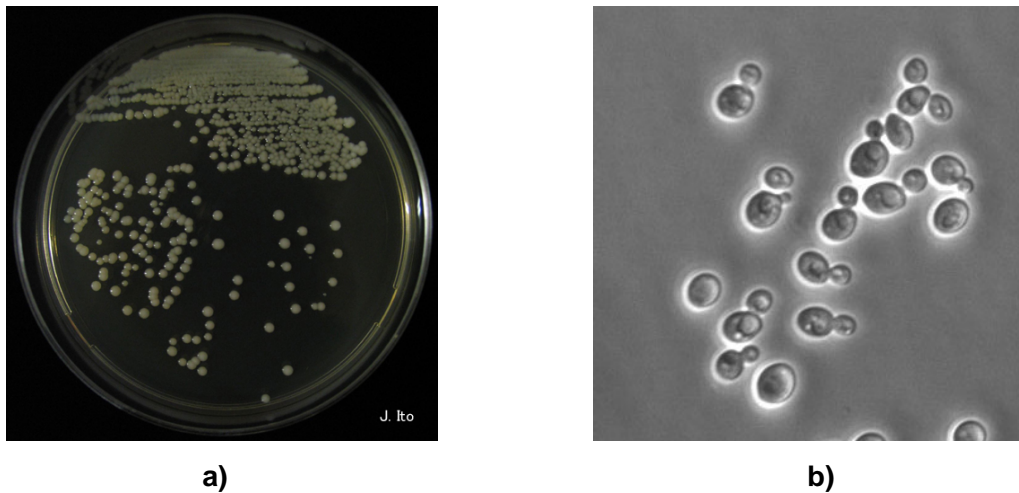
La estrategia (secuencia en que fueron ensayados los compuestos) empleada para la determinación de la actividad antifúngica de los compuestos sintetizados será explicada, más adelante, en el punto 4.4.

#### **Hongos Levaduriformes:**

Durante el estudio de la actividad biológica de los compuestos sintetizados, las levaduras ensayadas fueron:

- ❖ *Candida albicans* ATCC 64548
- ❖ *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763
- ❖ *Candida parapsilosis* ATCC 22019
- ❖ *Candida parapsilosis* (aislamiento regional)

A continuación, en la **Figura 4.3 a-b** podemos observar el aspecto macroscópico y microscópico de dos de las levaduras antes mencionadas: *C.parapsilosis* y *C.albicans* respectivamente.



**Figura 4.3.** Características de algunas de las levaduras ensayadas: **a)** observación macroscópica de colonias de *C.parapsilosis*. **b)** observación microscópica de *C.albicans*.

#### **Inoculo:**

Con respecto a la preparación del inoculo, en cada caso, el mismo fue realizado utilizando tubos estría con cultivos jóvenes de entre 24 - 48 horas (incubados a 35 °C) de las diferentes especies, a partir de los cuales se preparó una suspensión en solución fisiológica (NaCl 0.85%). La densidad celular de dicha suspensión se ajustó con la ayuda de un estándar 0.5 de McFarland. Luego, la suspensión resultante se diluyó adecuadamente para conseguir  $5.0 \times 10^2 - 2.5 \times 10^3$  células/ml (rango de concentración que provee valores de CIM reproducibles).

Debido a que la densidad celular del inoculo no pudo ser verificada con un espectrofotómetro, se realizó un recuento microbiológico en superficie con la finalidad de corroborar la correcta preparación del mismo.

Para ello, se prepararon cajas de Petri con 10 ml de AS y por otro lado, diluciones del inoculo ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ). De cada dilución se sembró 0,1 ml en la superficie de una placa y se distribuyó homogéneamente con espátula de Drigalski, previamente flameada con alcohol etílico al 70% (en todo momento se trabajó por duplicado).

Luego de 48-72 horas de incubación (a 28-30°C) se seleccionaron las placas que tenían entre 30 y 300 colonias, se promediaron la cantidad de colonias que había entre ellas y se calculó la concentración inicial del inoculo.

### **Visualización del valor de CIM:**

En el caso de las CIM en medios líquidos, el punto de corte para su determinación se efectuó evaluando si existe turbidez en los tubos. Las medidas de turbidez son un método muy rápido y útil para obtener estimaciones del número de células.

Una suspensión celular aparece turbia a la vista porque las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión. Cuanto más células estén presentes mayor será la luz dispersada, y por lo tanto, mayor la turbidez. La misma puede medirse con aparatos como el espectrofotómetro (densidad óptica, DO) que hace pasar la luz a través de suspensiones celulares y detecta la cantidad de luz emergente, no dispersada.

Dentro de determinados límites, las medidas de turbidez pueden ser razonablemente precisas y tienen la virtud de ser rápidas y fáciles de realizar. Además, estas determinaciones se pueden hacer normalmente sin destruir o modificar significativamente la muestra.

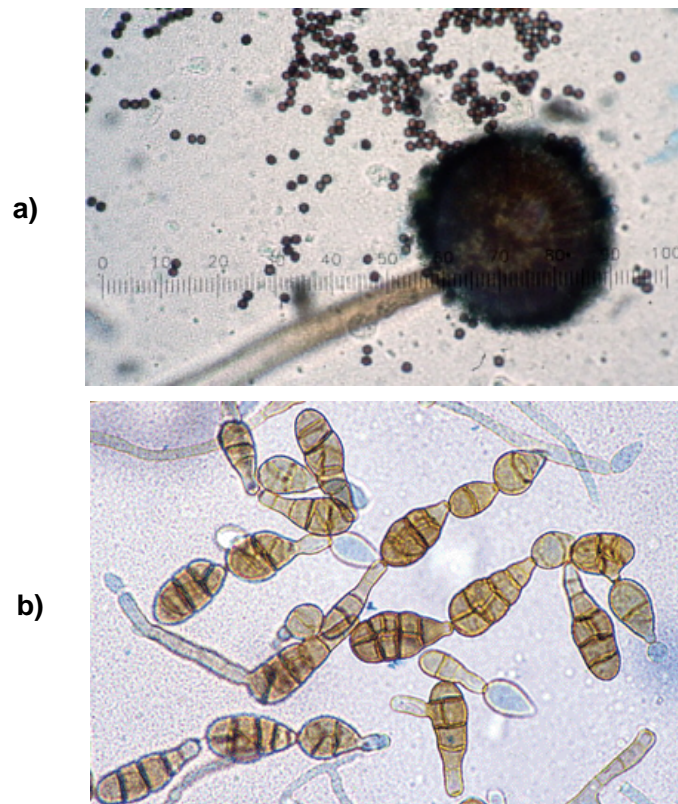
Por lo tanto, transcurrido el tiempo adecuado de incubación, el valor de CIM determinado en cada caso en particular correspondió al tubo con la menor concentración del antimicrobiano, en el que no se observó turbidez.

### **Hongos Filamentosos:**

Las especies de hongos filamentosos empleadas para determinar la actividad antimicrobiana de las moléculas sintetizadas fueron:

- ❖ *Aspergillus niger* ATCC 16404
- ❖ *Alternaria* sp.

En la **Figura 4.4 a-b** podemos observar el aspecto microscópico de las especies de mohos antes mencionados.

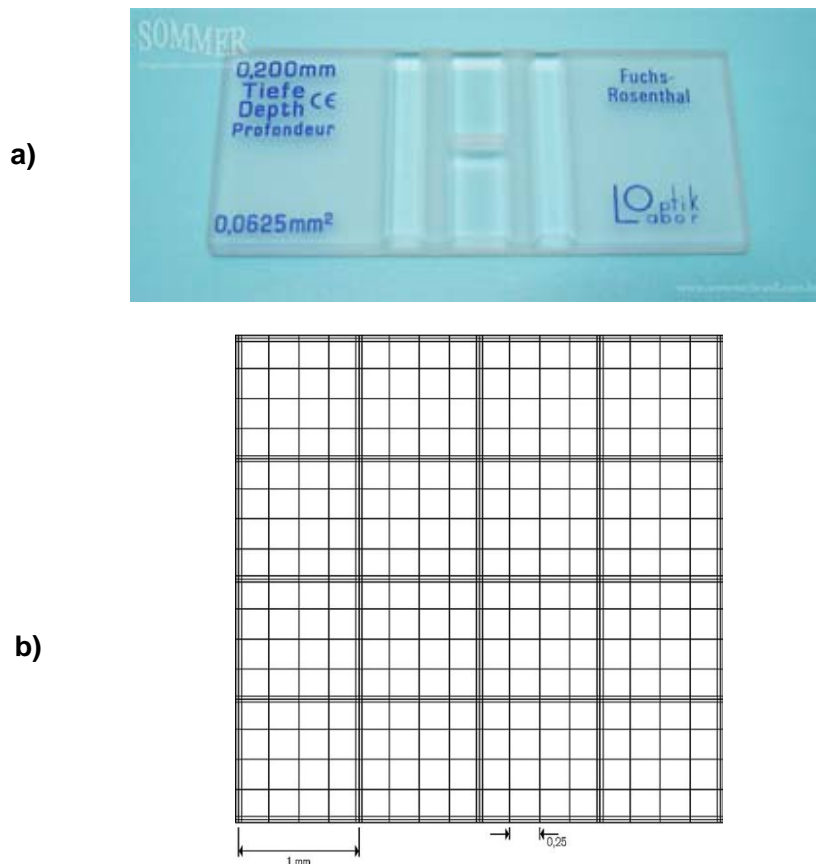


**Figura 4.4.** Características microscópicas de: **a)** *Aspergillus niger* y **b)** *Alternaria sp.*

### **Inoculo:**

Para la preparación del inoculo se utilizaron tubos estría con cultivos de 7 días de incubación a 35 °C de las diferentes especies. A partir de ellos se preparó una suspensión de conidios en solución fisiológica (NaCl 0.85%). En el caso de *A.niger* ATCC 16404, la adición de una gota de Tween 20 puede facilitar la preparación del inoculo. La mezcla resultante de conidios y fragmentos de hifas se transfiere a un tubo estéril y se deja reposar durante 3 a 5 minutos para que las partículas más pesadas sedimenten. Luego, la suspensión homogénea (sin las partículas pesadas) se vierte en otro tubo estéril y se diluye adecuadamente.

La concentración del inoculo se ajustó mediante el recuento en cámara de Fuchs-Rosenthal (**Figura 4.5 a-b**) para lograr una concentración final de  $0,4 \cdot 10^4$  -  $5 \cdot 10^4$  UFC/ml (rango de concentración que provee valores de CIM reproducibles).



**Figura 4.5.** Cámara de Fuchs–Rosenthal: **a)** Imagen de una cámara de Fuchs–Rosenthal. **b)** Cuadrícula de recuento: muestra 16 cuadrados grandes, cada uno de  $1\text{mm}^2$ . Cada cuadrado grande está subdividido en 16 cuadrados pequeños con una superficie de  $0,0625\text{mm}^2$ .

Además, se efectuó el control del inóculo mediante un recuento microbiológico en superficie. Se prepararon cajas de Petri con 10 ml de AS y por otro lado, diluciones del inóculo ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ). De cada dilución se sembró 0,1 ml en la superficie de una placa y se distribuyó homogéneamente con espátula de Drigalski, previamente flameada con alcohol etílico al 70% (aquí también se trabajó por duplicado).

Luego de 48-72 horas de incubación (a  $28\text{-}30^\circ\text{C}$ ) se seleccionaron las placas que tenían entre 30 y 300 colonias, se promediaron la cantidad de colonias que había entre ellas y se calculó la concentración inicial del inóculo.

### **Visualización del valor de CIM:**

Para la determinación del valor de CIM se tuvo en cuenta al tubo con la menor concentración del agente antifúngico que inhibe el crecimiento visible del microorganismo en cuestión.

Es importante dejar en claro que, para la dilución en caldo de los compuestos catiónicos y no iónicos (diméricos y monoméricos), se realizaron dos procedimientos diferentes:

En el caso de las moléculas de naturaleza catiónica, al ser estas solubles en agua, no se presentaron problemas de solubilidad al diluirlos con el caldo preparado previamente. El procedimiento empleado en la preparación de la experiencia puede ser apreciado en la **Tabla 4.1**.

**Tabla 4.1** Esquema utilizado para la preparación de las diluciones de los compuestos catiónicos (*gemini* y monomérico) solubles en agua. Pruebas de susceptibilidad en caldo.

Paso	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Fuente	Volumen (+) (ml)	Medio (=) (ml)	Concentración (=) Intermedia ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentración (=) Final (1/10) ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	5120	Stock	1	7	640	64
2	640	Paso 1	1	1	320	32
3	640	Paso 1	1	3	160	16
4	160	Paso 3	1	1	80	8
5	160	Paso 3	0,5	1,5	40	4
6	160	Paso 3	0,5	3,5	20	2
7	20	Paso 6	1	1	10	1
8	20	Paso 6	0,5	1,5	5	0,5
9	20	Paso 6	0,5	3,5	2,5	0,25
10	2,5	Paso 9	1	1	1,25	0,125
11	2,5	Paso 9	0,5	1,5	0,625	0,0625
12	2,5	Paso 9	0,5	3,5	0,3125	0,03125

Sin embargo, para los compuestos no iónicos, al no ser solubles en agua, nos encontramos con dificultades a la hora de diluirlos con caldo. Para solucionar este inconveniente se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) en la preparación de la solución stock o madre, a partir de la cual fueron preparados los demás tubos. La concentración final de éste solvente se redujo al 1 %, de manera que no interfirió en las experiencias realizadas. El DMSO, a esta concentración y sin el agregado de la droga se utilizó como control con el fin de corroborar el desarrollo del microorganismo en estudio. El esquema utilizado se presenta en la **Tabla 4.2**.

**Tabla 4.2** Procedimiento empleado para la preparación de las diluciones de los compuestos no iónicos (*gemini* y monomérico) insolubles en agua. Pruebas de susceptibilidad en caldo.

Paso	Concentración (µg/ml)	Fuente	Volumen (ml)	DMSO (ml)	Concentración Intermedia 1 (µg/ml)	Concentración Intermedia 2 (µg/ml)	Concentración Final (µg/ml) (1/100)
1	6400	Stock			6400	640	64
2	6400	Stock	0,5	0,5	3200	320	32
3	6400	Stock	0,5	1,5	1600	160	16
4	1600	Paso 3	0,5	0,5	800	80	8
5	1600	Paso 3	0,5	1,5	400	40	4
6	1600	Paso 3	0,5	3,5	200	20	2
7	200	Paso 6	0,5	0,5	100	10	1
8	200	Paso 6	0,5	1,5	50	5	0,5
9	200	Paso 6	0,5	3,5	25	2,5	0,25
10	25	Paso 9	0,5	0,5	12,5	1,25	0,125
11	25	Paso 9	0,5	1,5	6,25	0,625	0,0625
12	25	Paso 9	0,5	3,5	3,125	0,3125	0,03125



Es importante aclarar que en todos los ensayos se realizó un control positivo o de desarrollo del inóculo (ausencia de agente antimicrobiano) y un control negativo o de droga (ausencia del inóculo).

Además, para cotejar los valores de CIM obtenidos se ensayaron dos compuestos de referencia:

- ❖ Fluconazol, derivado azólico de uso clínico y de elevada actividad antifúngica.
- ❖ Bio F-36, conservante empleado en la curtición de pieles a base de TCMTB y un derivado carbámico.

El compuesto azólico fue enfrentado a cada uno de los microorganismos (levaduras y mohos) mencionados con anterioridad. En cambio, el TCMTB (compuesto corrosivo y nocivo para las personas y el medio ambiente) fue utilizado con algunos de los microorganismos ensayados, en la última fase de este *screening* microbiológico.

En general, el rango de concentraciones empleado en los ensayos de dilución en caldo fue de 0,03125 – 64 µg/ml como se mostró en las Tablas 4.1 y 4.2.

Sin embargo, en algunos casos, fue necesario modificar dicho rango a 0,25 – 512 µg/ml debido a la manifestación de una menor sensibilidad por parte de algunos microorganismos.

A continuación se presentan y analizan los resultados obtenidos.

## 4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la determinación de la actividad antifúngica de los compuestos tanto no iónicos como catiónicos sintetizados se utilizó la siguiente estrategia:

En una primera etapa se ensayaron las moléculas *gemini* no iónicas (**4a-c**) y catiónicas (**4d-h**) de naturaleza saturada con longitud de cadena hidrocarbonada variable así como también los análogos monoméricos con 12 átomos de carbono en su porción hidrofóbica (**7a-b**).

El objetivo de esta etapa consistió en evaluar la presencia o ausencia de actividad antifúngica de dichos compuestos, comparar los valores de CIM encontrados para cada uno de ellos, analizar su desempeño frente a una droga de referencia como Fluconazol y equiparar la actividad encontrada para los compuestos **4b** y **4e** con sus respectivos análogos **7a** y **7b**.

Los resultados obtenidos (valores de CIM) para cada compuesto y con cada una de las cepas estudiadas se presentan en la **Tabla 4.3**.

**Tabla 4.3.** Valores de CIM expresados en µg/ml para los compuestos (**4a-h**) y (**7a-b**) ensayados.

Compuesto	R	(CIM) (µg / ml)			
		<i>C.parapsilosis</i> <sup>a1</sup>	<i>C.albicans</i> <sup>b1</sup>	<i>C.parapsilosis</i> <sup>b1</sup>	<i>S.cerevisiae</i> <sup>b2</sup>
		ATCC 22019	ATCC 64548	Regional	ATCC 9763
<b>4 a</b>	- C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	64	>64	64	16
<b>4 b</b>	-C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	8	8	16	4
<b>4 c</b>	-C <sub>18</sub> H <sub>35</sub>	64	>64	>64	8
<b>4 d</b>	-C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	>64	>64	>64	>64
<b>4 e</b>	-C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	16	8	16	8
<b>4 f</b>	-C <sub>18</sub> H <sub>35</sub>	0.25	32	16	2
<b>7 a</b>	-C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	64	64	64	16
<b>7 b</b>	-C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	64	64	>64	16
<b>Fluconazol</b>	-	16	<5	8	16

<sup>a</sup> Lectura realizada a las 72 horas. Se observó desarrollo en el Control Positivo a las 48 horas.

<sup>b</sup> Lectura realizada a las 48 horas. Se observó desarrollo en el Control Positivo a las 24 horas.

<sup>1</sup> Corresponde al género *Candida*.

<sup>2</sup> Corresponde al género *Saccharomyces*.

De manera general, a partir de los valores presentes en la Tabla 4.3, podemos afirmar que los compuestos ensayados (**4a-h**) y (**7a-b**) demostraron ser activos biológicamente frente a las cuatro levaduras evaluadas.

Analizando en detalle los resultados conseguidos, observamos una actividad relativamente baja, aunque similar, en aquellos compuestos con colas de 8 carbonos de longitud (**4a** y **4d**), siendo el segundo menos activo. Esto podría deberse a que el largo de las colas hidrocarbonadas no es lo suficientemente extenso como para interactuar de manera eficiente ya sea con los fosfolípidos o el ergosterol presente en la membrana biológica de las levaduras.

En el caso de los compuestos con una región apolar de 12 carbonos de longitud (**4b** y **4e**) podemos ver que ambos presentaron actividad similar entre sí y más elevada con respecto a los *gemini* antes mencionados. En estas dos moléculas, la longitud de las cadenas hidrofóbicas es intermedia y aparentemente lograrían alcanzar el efecto deseado. Al igual que con las propiedades fisicoquímicas, al comparar dichos compuestos con sus análogos monoméricos (**7a** y **7b**), podemos apreciar un desempeño biológico significativamente menor de estos últimos manifestado en los valores de CIM encontrados.

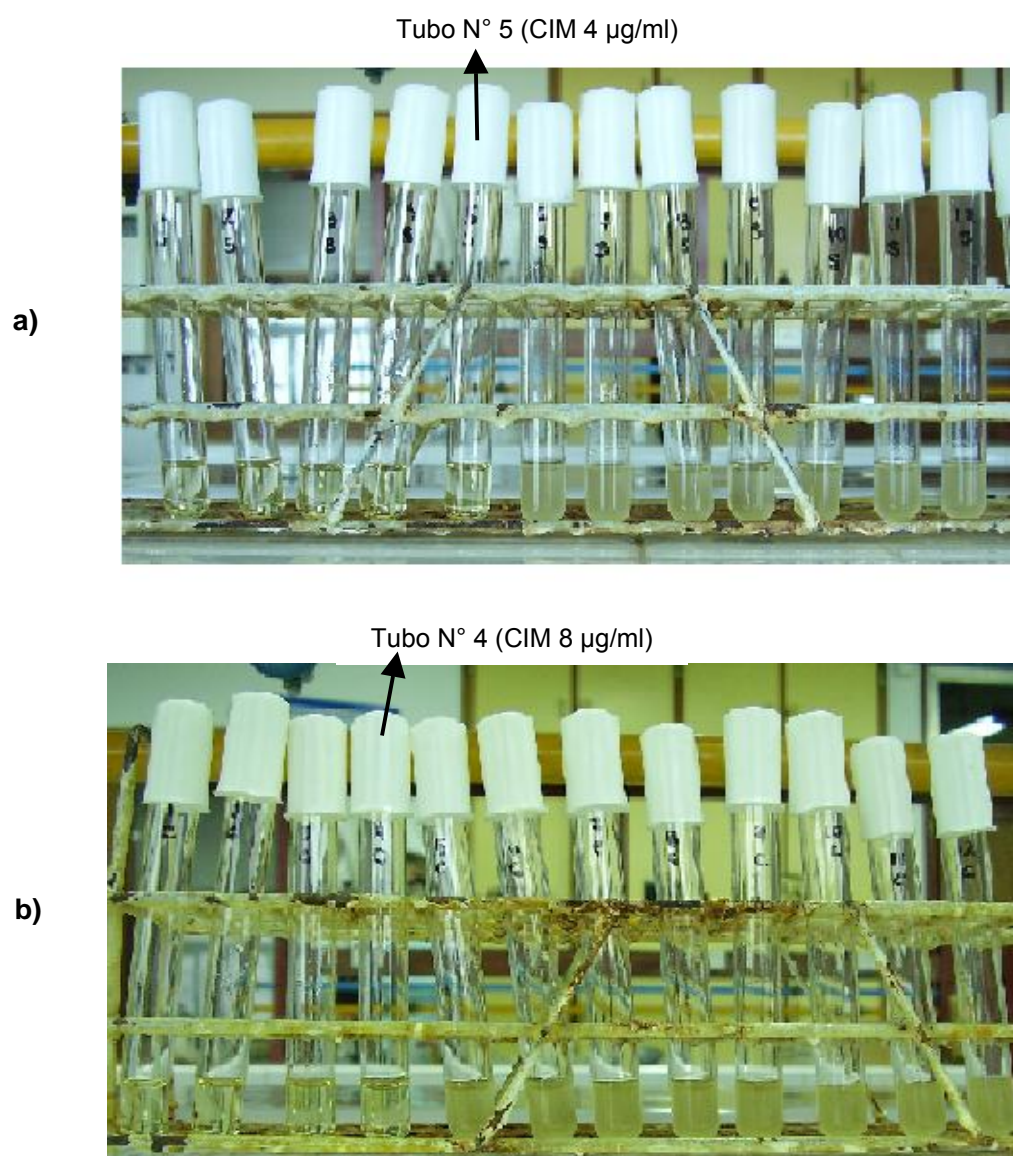
Por otro lado, las moléculas con colas de 18 carbonos no presentaron un comportamiento similar entre sí, ya que **4c** fue considerablemente menos activa que **4f**. Además, para este último los valores de CIM encontrados variaron considerablemente de un microorganismo a otro. En el caso de ambos compuestos consideramos que, debido al incremento en la hidrofobicidad como consecuencia del mayor número de átomos de carbono presentes en dichas moléculas, podría adquirir vital importancia el efecto de las cargas positivas presentes en el *gemini* de naturaleza catiónica (pero ausentes en el análogo dimérico no iónico). Dichas cargas contribuirían con la adsorción del compuesto sobre la superficie celular haciéndolo más efectivo.

Si comparamos el desempeño de estos compuestos con el encontrado para Fluconazol, podemos afirmar gratamente que los surfactantes *gemini* manifiestan una muy buena actividad antifúngica con valores de CIM comparables a los de este derivado azólico tan efectivo.

A raíz de las determinaciones realizadas concluimos que la longitud óptima de la porción hidrofóbica de los compuestos *gemini* es la intermedia, es decir, 12 átomos de carbono. Al parecer, los compuestos **4b** y **4e** lograrían controlar de manera eficiente el crecimiento

indeseado de hongos levaduriformes. Debido a su excelente desempeño como agentes antifúngicos se los selecciona como candidatos en esta primera etapa.

En la **Figura 4.6 a-b** se ilustran, a modo de ejemplo, dos valores de CIM obtenidos en nuestros ensayos con hongos levaduriformes.



**Figura 4.6.** Pruebas de susceptibilidad en caldo. Actividad antifúngica del compuesto **4b** frente a: **a)** *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, donde el valor de CIM observado fue de 4 µg/ml (tubo N° 5) y **b)** *Candida parapsilosis* ATCC 22019, donde dicho valor fue de 8 µg/ml (tubo N° 4).

Durante una segunda etapa, habiendo elegido un largo de cadena óptimo o más eficiente, se decidió obtener y ensayar dos compuestos diméricos cuya diferencia radique en la naturaleza de la porción hidrofóbica de la molécula (manteniendo relativamente constante la longitud de la misma).

De esta manera, los compuestos **4g** (porción no polar insaturada) y **4h** (porción no polar perfluorada) fueron sintetizados y sometidos a las pruebas de dilución en caldo con el fin de corroborar la presencia de actividad biológica y compararla con la encontrada para 4b y 4e.

Para la determinación de la concentración inhibitoria mínima se emplearon solo dos levaduras: *C.parapsilosis* ATCC 22019 (por ser un microorganismo de referencia según la CLSI) y *C.albicans* ATCC 64548 (por ser un microorganismo vinculado al deterioro de materiales). Además, se decidió evaluar el comportamiento de los cuatro compuestos (4b, e, g y h) frente a dos hongos filamentosos, *A. niger* ATCC 16404 y *Alternaria sp.*

Finalmente, se determinaron los valores de CIM del compuesto de referencia antes utilizado (Fluconazol) para los dos mohos mencionados anteriormente, así como también, los valores correspondientes a un potente antifúngico comercial Bio F-36 (Pellital S.A.), utilizado actualmente en la industria del cuero. Este último fue ensayado frente a *C.parapsilosis* ATCC 22019, *C.albicans* ATCC 64548, *A.niger* ATCC 16404 y *Alternaria sp.* con el fin de poder cotejar resultados.

Los resultados obtenidos (valores de CIM) para cada compuesto y con cada una de las cepas estudiadas se presentan en la **Tabla 4.4**.

**Tabla 4.4.** Valores de CIM expresados en µg/ml para los compuestos **4b**, **4e**, **4g** y **4h** ensayados.

Compuesto	R	(CIM) (µg / ml)			
		<i>C.parapsilosis</i> <sup>a1</sup> ATCC 22019	<i>C.albicans</i> <sup>b1</sup> ATCC 64548	<i>A.niger</i> <sup>b2</sup> ATCC 16404	<i>Alternaria sp.</i> <sup>a</sup>
<b>4 b</b>	-C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	8	8	32	32
<b>4 e</b>	-C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	16	8	32	8
<b>4 g</b>	-C <sub>15</sub> H <sub>25</sub>	32	16	64	64
<b>4 h</b>	-C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> F <sub>17</sub>	256	256	>512	64
<b>Fluconazol</b>	-	16	<5	>512	32
<b>Bio F-36</b>	-	64	16	32	16

<sup>a</sup> Lectura realizada a las 72 horas. Se observó desarrollo en el Control Positivo a las 48 horas.

<sup>b</sup> Lectura realizada a las 48 horas. Se observó desarrollo en el Control Positivo a las 24 horas.

<sup>1</sup> Corresponde al género *Candida*, <sup>2</sup> Corresponde al género *Aspergillus*.

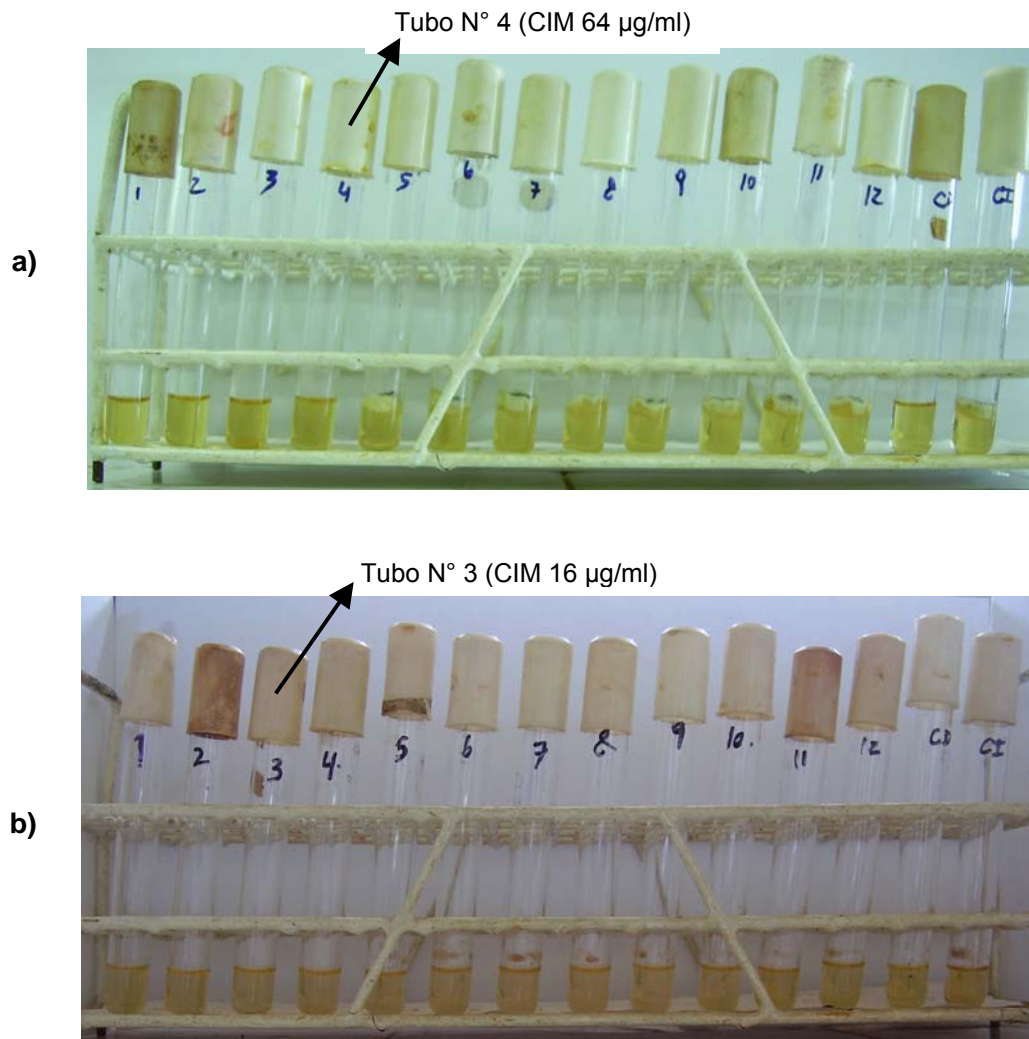
Analizando los resultados de la Tabla 4.4, podemos apreciar un aumento en los valores de concentración inhibitoria mínima encontrado para los compuestos **4g** y **4h**, siendo esos valores considerablemente mayores para **4h**. El incremento de concentración observado se traduce en una disminución de la actividad biológica de dichos compuestos en comparación con la encontrada para **4b** y **4e**.

En el caso del compuesto con insaturaciones en su región no polar (**4g**), la actividad encontrada es menor pero similar a la manifestada por las moléculas *gemini* estudiadas durante esta tesis. Sin embargo, el compuesto perfluorado (**4h**) no presenta buen desempeño como antifúngico. Este comportamiento podría deberse a la elevada electronegatividad de los átomos de flúor, los cuales harían que las dos colas presentes en la molécula se repelan entre sí. De este modo, estos compuestos ofrecerían cierta dificultad para penetrar en la membrana de hongos.

Por otro lado, Fluconazol mostró ser activo frente a *C.parapsilosis* ATCC 22019, *C.albicans* ATCC 64548 y *Alternaria sp.* con valores de CIM cercanos a los encontrados para los surfactantes *gemini* estudiados. En cambio, manifestó ser poco eficiente frente a *A.niger* ATCC 16404.

Finalmente, si se compara el desempeño de **4b** y **4e** con el encontrado para Bio F-36 (Pellital S.A.), podemos afirmar con certeza que nuestros surfactantes *gemini* manifiestan una excelente actividad antifúngica con valores de CIM comparables (y en la mayoría de los casos menores) a los de este potente antifúngico de uso comercial.

En la **Figura 4.7 a-b** se ilustran, a modo de ejemplo, dos valores de CIM obtenidos en nuestros ensayos con hongos filamentosos.



**Figura 4.7.** Pruebas de susceptibilidad en caldo: **a)** actividad antifúngica del compuesto **4g** frente a *Aspergillus niger* ATCC 16404. El valor de CIM observado fue de 64 µg/ml (tubo N° 4). **b)** actividad antifúngica del producto comercial Bio F-36 (Pellital S.A.) frente a *Alternaria* sp. El valor de CIM observado fue de 16 µg/ml (tubo N° 3).

Por último, observando el comportamiento de todos los compuestos ensayados podemos concluir que, frente al grupo de levaduras y mohos ensayados, **4b**, **4e** y **4f** resultaron ser las estructuras más potentes. La actividad inhibitoria máxima (valor de CIM más pequeño) fue encontrada para **4f** frente a *C.parapsilosis* ATCC 22019 con 0.25 µg/ml. Los compuestos **4b** y **4e** mostraron actividad antifúngica efectiva y similar para todas las cepas estudiadas. En general, las moléculas menos activas fueron **4a**, **4d** y **4h**. Los análogos monoméricos **7a** y **7b** demostraron ser considerablemente menos activos en comparación con los surfactantes diméricos de igual longitud de átomos de carbono en la porción hidrofóbica de la molécula (**4b** y **4e**).

Los resultados muestran que, en general, *S.cerevisiae* ATCC 9763 fue el microorganismo más sensible. En contraste, el aislamiento regional de *C.parapsilosis* fue la levadura más resistente. En el caso de los hongos filamentosos *A.niger* ATCC 16404 resulto ser más resistente que *Alternaria* sp.

Los valores de CIM obtenidos para los compuestos *gemi* fueron comparables (y en muchos casos superiores) a los valores conseguidos para los antifúngicos de referencia: Fluconazol y Bio F-36.

Debido a lo resaltado anteriormente y a raíz de haber desarrollado en nuestro laboratorio, con éxito, una nueva familia de compuestos antifúngicos denominados *gemi*, emprendimos el escalado del proceso de síntesis de las moléculas (**4b** y **4e**). Ambas fueron seleccionadas ya que resultaron ser las moléculas de mejor desempeño en general, demostrada acción antifúngica y bajo costo de producción. Dicho escalado tiene como objetivo transferir los resultados como un aporte novedoso para el sector productivo.

A continuación, en el capítulo 5, se describirá la metodología empleada para la síntesis a mayor escala de las dos moléculas antes mencionadas, así como también su formulación y posterior desempeño sobre cueros.



## 4.5 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 4

- ✓ Botana López L, Landoni MF, Martín Jiménez T. *Farmacología Terapéutica Veterinaria*. Mc Graw-Hill. Int. Madrid (2002).
- ✓ Caillier L, Taffin de Givenchy E, Levy R, Vandenberghe Y, Geribaldi S, Guittard F. *Polymerizable semi-fluorinated gemini surfactants designed for antimicrobial materials*. Journal of Colloid and Interface Science. 332, 201-207 (2009).
- ✓ Kobuke Y, Ueda K, Sokabe M. *Artificial Non-Peptide Single Ion Channels*. Journal of American Chemical Society. 114, 7618-7622 (1992).
- ✓ Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock. *Biología de los Microorganismos*. Pearson Prentice Hall. España (2004).
- ✓ Massi L, Guittard F, Levy R, Gèribaldi S. *Enhanced Activity of Fluorinated Quaternary Ammonium Surfactants against Pseudomonas aeruginosa*. European Journal of Medicinal Chemistry XXX, 1-8 (2008).
- ✓ Milhaud J, Ponsinet V, Takashi M, Michels B. *Interactions of the drug amphotericin B with phospholipid membranes containing or not ergosterol: new insight into the role of ergosterol*. Biochimica et Biophysica Acta. 1558, 95-108 (2002).
- ✓ National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard*. NCCLS Document M27-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. (2002).
- ✓ National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard*. NCCLS Document M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. (2002).
- ✓ Neetu Tewari VK, Tiwari RP, Tripathi V, Chaturvedi A, Srivastava R, Srivastava PK, Shukla AK, Chaturvedi A, Gaikward, Sinha S, Srivastava BS. *Synthesis of Galactopyranosyl Amino Alcohols as a New Class of Antitubercular and Antifungal Agents*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. 14, 329-332 (2004).
- ✓ Paquet MJ, Fournier I, Barwicz J, Tancrede P, Auger M. *The effects of amphotericin B on pure and ergosterol- or cholesterol- containing dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers as viewed by <sup>2</sup>H NMR*. Chemistry and Physics of Lipids. 119, 1-11 (2002).

## **CAPÍTULO 5**

**“PRODUCCIÓN A MAYOR ESCALA DE LOS  
COMPUESTOS *GEMINI* DE MEJOR DESEMPEÑO  
COMO AGENTES ANTIFÚNGICOS. EVALUCIÓN DE  
SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA SOBRE CUEROS”**

## 5.1 PRINCIPIOS GENERALES

Un *proceso químico* puede entenderse como el conjunto de operaciones químicas y/o físicas ordenadas a la transformación de materias iniciales en productos finales diferentes (Costa López J y col, 1991).

Los procesos químicos se originan usualmente a pequeña escala en el laboratorio, y su desarrollo es normalmente llevado a cabo al conducir las reacciones en una escala sucesivamente más alta antes de llegar a la planta de producción industrial. En consecuencia, el escalado puede definirse como "el proceso necesario para alcanzar la producción industrial a partir de un logro científico a nivel del laboratorio".

Para llevar a cabo el cambio de escala de un proceso es de vital importancia la presencia de un reactor (en nuestro caso de un reactor químico), el cual puede considerarse como el recipiente o conjunto de recipientes en los que tiene lugar una reacción química a mayor escala o a escala industrial. La clasificación de los reactores químicos se puede efectuar desde distintos puntos de vista. Según su forma de operación se clasifican en:

- ❖ Reactor Discontinuo
- ❖ Reactor Continuo
- ❖ Reactor Semicontinuo

En el primer caso, el funcionamiento Discontinuo consiste en adicionar los reactivos de una vez en el interior del reactor, esperar el tiempo necesario para que se dé la reacción y vaciar el contenido. Por lo tanto durante el tiempo de operación, propiamente dicho, no entra ni sale ningún flujo de materia del reactor, y por lo tanto la masa total de la mezcla de reacción se mantiene constante. También es conocido como reactor tipo Batch.

En el funcionamiento Continuo, por el contrario, entra y sale un flujo de materia de forma continua durante todo el período de operación.

Un sistema a medio camino entre los dos anteriores es el funcionamiento Semicontinuo, el cual consiste en introducir un reactivo de forma discontinua (todo de una vez), y añadir el segundo reactivo de forma continua durante el período de reacción. En este caso la masa total de la mezcla de reacción no se mantiene constante. Debido a que en este tipo de reactores solamente se encuentra una pequeña cantidad de reactivo no reaccionado en cada instante, las posibles consecuencias de una reacción fuera de control provocado

por la pérdida de agitación o del control de la temperatura, son menos severas que las de un proceso discontinuo. Así, un reactor semicontinuo puede elegirse cuando se desea hacer reaccionar un gas con un líquido, para controlar una reacción altamente exotérmica (reacción demasiado violenta si ambos reaccionantes se mezclan de repente) o para aumentar el rendimiento de un producto en circunstancias determinadas.

Por otro lado, según la forma de efectuar la mezcla entre reactivos y productos, la clasificación distingue:

- ❖ Reactor Tanque Agitado
- ❖ Reactor Tubular

El reactor Tanque Agitado es, por su naturaleza, muy adecuado para reacciones en fase líquida. En él, la mezcla se puede considerar perfecta en el caso ideal. En cambio, el reactor Tubular, aunque a veces se utiliza para reacciones en fase líquida, normalmente se emplea para reacciones en fase gaseosa, incluso en pequeña escala. En este último, la mezcla es nula (flujo de pistón) en el caso ideal (Coulson JM, 1984).

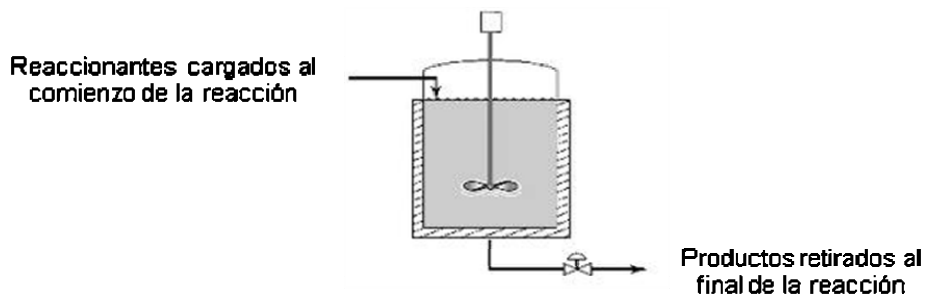
En nuestro caso, se realizará el estudio de distintas reacciones utilizando como forma de operación un *Reactor Discontinuo de Tanque Agitado* con el fin de escalar el proceso sintético de los compuestos *gemi* de mejor desempeño, **4b** y **4e**. Este tipo de reactores es ampliamente utilizado en industrias con producciones pequeñas, en las que el costo de operación y el tiempo muerto representan solamente una pequeña fracción del costo unitario del producto. Por este motivo encuentran su aplicación en la obtención de productos de alto valor agregado como los correspondientes a la Industria de la Química Fina. También se utilizan en biotecnología y en la obtención de polímeros. Otros campos de aplicación se hallan en el tratamiento de aguas, síntesis orgánica y otras aplicaciones específicas (procesos electroquímicos y fotoquímicos).

A continuación, brindaremos más información acerca de esta clase de reactores.

## ❖ REACTOR DISCONTINUO

Como se dijo anteriormente, este tipo de reactor es característico de reacciones en fase líquida. Se trata de un reactor tanque agitado de forma que se puede suponer que la mezcla es perfecta, y por lo tanto, la concentración y temperatura son uniformes en todo el contenido del tanque. El mismo se encuentra envuelto por una camisa exterior que permite el calentamiento o enfriamiento de la masa reaccionante según conveniencia.

Un esquema sencillo de un reactor discontinuo de tanque agitado se muestra en la **Figura 5.1**.



**Figura 5.1.** Esquema básico de un reactor discontinuo de tipo tanque agitado.

En la mayoría de casos, la operación consiste en introducir los reactivos en el recipiente y aumentar la temperatura (mediante la camisa exterior) hasta el nivel deseado para que la reacción ocurra. Si se trata de una reacción exotérmica, cuando ésta empieza, se debe enfriar el recipiente haciendo circular por la camisa un fluido de enfriamiento.

Naturalmente, todo cambio químico se encuentra acompañado de un calor de reacción que solamente en algunos casos es tan pequeño que puede despreciarse. El valor del calor de reacción tiene con frecuencia una influencia muy importante sobre el diseño del reactor. En una reacción fuertemente exotérmica, por ejemplo, se producirá un aumento considerable de la temperatura de la mezcla de reacción, a menos que se realicen las previsiones necesarias para que el calor se transfiera a medida que tiene lugar la reacción. Si la temperatura de la mezcla de reacción permanece constante (operación isotérmica), el calor equivalente al calor de reacción ha de ser transferido desde o hacia el reactor. Si el calor no se transfiere (operación adiabática), la temperatura de la mezcla de reacción aumentará o disminuirá a medida que tiene lugar la reacción. En algunos casos

puede ser conveniente adoptar una alternativa intermedia entre estos dos extremos (Coulson JM, 1984).

En consecuencia, es de gran importancia poder establecer el intervalo aceptable en el que puede permitirse que varíe la temperatura.

A continuación, se detallarán los procedimientos empleados en la producción sintética a mayor escala de los compuestos gemini más eficientes antes mencionados.

## **5.2 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS PARA EL ESCALADO DE LOS COMPUESTOS *GEMINI* MÁS EFICIENTES 4b Y 4e.**

Los procedimientos experimentales (o metodologías) utilizados para la síntesis a mayor escala de los surfactantes *gemini* 4b y 4e se explicarán en detalle a continuación.

### **❖ Síntesis de la molécula espaciadora: *N*-acetildietanolamina (2)**

Para la obtención de 150 g de *N*-acetildietanolamina se utilizó un reactor de vidrio (con tres bocas) de 1 litro de capacidad, equipado con un refrigerante, un agitador mecánico y una ampolla con brazo compensador para el agregado de reactivos. En el mismo se colocó dietanolamina (97.65 ml) y, utilizando un baño de hielo, se adicionó anhídrido acético gota a gota (240.6 ml). Luego, la mezcla se calentó gradualmente a reflujo y se mantuvo la reacción a 100 °C durante 15 horas. Transcurrido este tiempo, se dejó enfriar la mezcla y se la llevó a pH 7 con 250 ml de una solución de NaOH 2 M. Luego se realizó una extracción con Acetato de Etilo (5x150 ml), se secó la fase orgánica con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se filtró. Seguidamente, se evaporó el disolvente a baja temperatura y se eliminó de manera parcial el ácido acético mediante destilación a presión reducida. La presencia del producto deseado fue controlada a través de CG, donde se pudo apreciar su existencia en forma mayoritaria. Así, el crudo obtenido se empleó en la siguiente etapa, la síntesis del éter diglicidílico.

### ❖ Síntesis del intermediario “llave” o éter diglicídico (3)

En la síntesis del intermediario “llave” (150 g) se empleó un reactor de vidrio (con tres bocas) de 2 litros de capacidad provisto de un encamisado necesario para la regulación de la temperatura, la cual se mantuvo estable con la ayuda de un baño recirculador. También se utilizaron un refrigerante y una ampolla con brazo compensador. Además, la reacción fue llevada a cabo bajo agitación mecánica.

A una mezcla de hidróxido de sodio (117g), agua (2 ml), bisulfato de tetrabutilamonio (TBAB) (10 g) y ( $\pm$ ) Epiclorhidrina (500 ml) se le adicionó, gota a gota, la *N*-acetildietanolamina (86 g). En este caso, por tratarse de una reacción exotérmica, se tomó la precaución de enfriar el recipiente durante el agregado de los reactivos haciendo circular por la camisa agua fría (5 °C).

Una vez finalizado el agregado de los reactivos, la mezcla de reacción se mantuvo a una temperatura de 30 °C durante 15 horas (siempre bajo agitación mecánica). Concluida la reacción se realizó una filtración y lavado del crudo con 150 ml de diclorometano (DCM). Luego, se llevó a cabo una destilación a presión reducida (bajo campana debido a la elevada toxicidad de la epiclorhidrina) con el fin de eliminar, en primera instancia, al diclorometano y en segundo lugar, el exceso de epiclorhidrina.

Finalmente, la presencia del producto deseado fue controlada a través de CCD y CG. El crudo obtenido se empleó en la siguiente etapa, la síntesis de los compuestos *gemin*i no iónico (**4b**) y catiónico (**4e**).

Es importante aclarar que, para la obtención de **4e**, fue necesario sintetizar mayor cantidad *N,N*-dimetildodecilamina. En consecuencia, describiremos en primer lugar su correspondiente proceso sintético y luego, continuaremos con la síntesis de las dos moléculas *gemin*i antes mencionadas.

### ❖ Síntesis de la *N,N*-dimetildodecilamina

Para la obtención de 150 g de la amina grasa *N,N*-dimetilada se colocó dodecilamina (131.44 g) y metanol (560 ml) en un reactor de vidrio (con tres bocas) de 2 litros de

capacidad provisto de un encamisado para el control de la temperatura, un sistema de condensación de reflujo y un agitador mecánico.

Luego, utilizando una ampolla con brazo compensador, fueron agregados lentamente ácido fórmico (189.2 ml) y formaldehído (264.45 ml). Durante el agregado de estos reactivos, el sistema se mantuvo bajo agitación constante y a 5°C (baño recirculador). Posteriormente, la mezcla fue calentada a la temperatura de reflujo del disolvente (aproximadamente 65°C) durante 35 horas. Luego, los compuestos de bajo punto de ebullición fueron evaporados a 50 °C y las mezclas fueron llevadas a pH 9 con la ayuda de 250 ml de una solución de NaOH 2M. El crudo de reacción se calentó a reflujo durante 7 horas más. Terminada la reacción, la mezcla se extrajo con cloroformo (5 x 150 ml), se secó con sulfato de magnesio anhidro y se filtró. Finalmente, se evaporó el disolvente utilizando un evaporador rotatorio y la obtención de la amina terciaria fue verificada mediante CG.

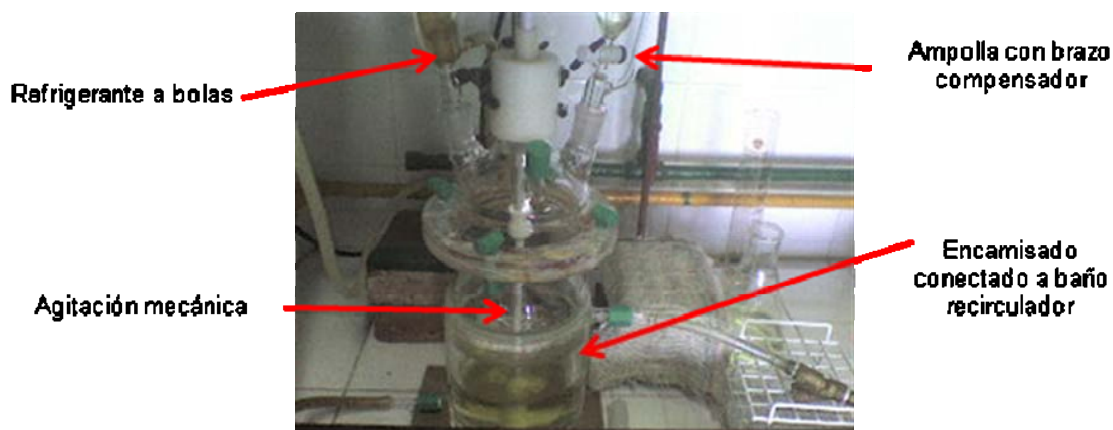
#### ❖ Síntesis de las moléculas *gemini* no iónica (4b) y catiónica (4e)

Para la síntesis de 150 g de cada uno de los compuestos *gemini* (4b y 4e) se utilizó un reactor de vidrio (con tres bocas) de 2 litros de capacidad provisto de un encamisado, un refrigerante a bolas y un sistema de agitación mecánica.

Un procedimiento típico para la síntesis de cualquiera de ellos consistió en lo siguiente. A una mezcla de etanol (900 ml), diglicidil éter (62 g) y bromuro de tetrabutilamonio (TBABr) (15.5 g) se adicionó la amina correspondiente: dodecilamina (111g) ó *N,N*-dimetildodecilamina (385.35 g). Seguidamente, la mezcla de reacción se mantuvo a una temperatura de 30 °C durante 24 horas, bajo agitación mecánica. Finalizada la reacción (desaparición del éter diglicídílico visualizada por CCD), se evaporó el etanol con la ayuda de un evaporador rotatorio y a continuación se les aplicó vacío para garantizar la eliminación total del disolvente. Por último, se verificó la presencia del producto deseado a través de CCD y CG.

En la **Figura 5.2** se presenta una fotografía del reactor de vidrio de 2 litros de capacidad empleado en la mayoría de los procesos sintéticos descritos anteriormente.





**Figura 5.2.** Reactor de vidrio de 2 litros de capacidad empleado para la síntesis de los *gemi* tanto no iónico (**4b**) como catiónico (**4e**), así como también de sus intermediarios sintéticos. El mismo se encuentra equipado con un refrigerante a bolas, una ampolla con brazo compensador, agitación mecánica y un encamisado conectado a un baño recirculador para el control de la temperatura del proceso.

### 5.3 FORMULACIÓN DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS

Habiendo realizado la síntesis a mayor escala de los compuestos *gemi* de mejor desempeño, es decir, los compuestos obtenidos con mayor actividad antifúngica (**4b** y **4e**), nos encontramos con la difícil tarea de acondicionarlos de manera tal que puedan ser aplicados o incluidos en el proceso productivo del cuero como agentes sustitutos o sinergisantes del fungicida comercial empleado en la actualidad: Bio F-36, Pellital S.A. De este modo, surgió la necesidad de investigar cómo *formular*, de manera estable, nuestros compuestos.

Así, la estabilidad de un compuesto puede entenderse como la capacidad para mantener intactas sus características físicas, químicas y biológicas durante el tiempo de uso y almacenamiento. Por otro lado, la inestabilidad de una molécula puede deberse a efectos químicos (solvolisis, oxidación, deshidratación, racemización, etc.), físicos (polimorfismo, vaporización, adsorción, etc.) y biológicos (fermentación, generación de toxinas, etc.).

A continuación, mencionamos algunas consideraciones generales y necesarias para llevar a cabo dicha tarea.

Durante la formulación de una droga, es habitual utilizar una sustancia terapéuticamente inerte capaz de proporcionar forma, volumen o el peso necesario a una preparación líquida o semisólida con el fin de poder aprovechar en forma conveniente, segura y eficaz un principio activo. Esta sustancia, que se conoce como *vehículo* de una droga, se denomina *excipiente* cuando se trata de un preparado en estado sólido (Oliveira Batistuzzo JA y col, 2010).

Los vehículos pueden dividirse en dos grandes grupos:

- ❖ Monofásicos: como ser líquidos, geles, grasas y polvos.
- ❖ Polifásicos: como lo son las lociones, las cremas, los ungüentos y las pastas.

A continuación, se exponen las características más importantes de algunos de los vehículos comúnmente utilizados para la formulación de compuestos orgánicos.

Uno de los líquidos mayormente empleado como vehículo es el **agua**. Este, tiene una amplia capacidad disolvente debido al pequeño tamaño de su molécula, polaridad, alta constante dieléctrica y a su habilidad para formar puentes de hidrógeno. El agua presenta el inconveniente de ser un buen sustrato para la proliferación de los microorganismos, por lo que es necesaria la inclusión de preservativos en caso de que una preparación acuosa deba guardarse por largo tiempo.

Después del agua, el **alcohol** es el vehículo más utilizado. Este solvente presenta una constante dieléctrica menor que el agua, aunque también forma puentes de hidrógeno con muchas sustancias. Disuelve con facilidad resinas, esencias, alcaloides, glucósidos y bases orgánicas. La presencia de alcohol disminuye los procesos hidrolíticos y favorece la conservación del producto frente al desarrollo de microorganismos.

La **glicerina** y el **propilenglicol** mejoran la solubilidad de algunas sustancias. Son miscibles tanto con el agua como con el alcohol y por ello aparecen con mucha frecuencia en la formulación de lociones.

El **éter** y la **acetona** se utilizan como excelentes solventes de sustancias orgánicas. Son miscibles en diferentes proporciones tanto con agua como con alcohol. Estos solventes poseen la desventaja de ser demasiado volátiles.

Otro agente de formulación es la **metilpirrolidona**, o *N*-metil-2-pirrolidona. Este consiste en un líquido incoloro claro, miscible en agua y en solventes orgánico. Pertenece a una clase de solventes dipolares apróticos los cuales incluyen también a la dimetilformamida, dimetilacetamida y **dimetilsulfóxido**. Este último es un líquido orgánico sin color que disuelve rápidamente muchos productos químicos y penetra los tejidos tanto animales como vegetales. Se usa en medicina humana, medicina veterinaria y preparaciones farmacéuticas.

El **lauril sulfato de sodio** es un tensoactivo iónico, empleado en diversos productos de higiene personal, como pasta de dientes, champú y jabones de baño. La molécula posee una cola de 12 átomos de carbono, adosada a un grupo sulfato, dotando a la molécula de las propiedades anfífilas requeridas para todo detergente. Si de detergentes se trata, el **tween 80** es otra molécula tensoactiva, no iónica, utilizada como emulsificante. Consiste en un líquido viscoso amarillo y soluble en agua de amplio uso en la actualidad.

Hasta el momento hemos citado algunos ejemplos de posibles vehículos disponibles para la formulación de las moléculas diméricas sintetizadas a mayor escala.

Es importante destacar que esta disciplina (o “arte” como muchos la llaman) requiere de una formación especial y profunda que escapan a los tiempos establecidos para este trabajo de tesis. En consecuencia, empleando conocimientos básicos de la misma hemos intentado formular de manera conveniente a de los compuestos *gemini* escalados.

Luego de varias pruebas o ensayos realizados en el laboratorio, llegamos a la elaboración de una fórmula que nos permitiría evaluar el desempeño (actividad biológica o capacidad de preservación sobre materiales) de dichos compuestos durante el proceso de manufactura del cuero.

Así, la formulación de los compuestos *gemini* sintetizados fue elaborada como se muestra en la **Tabla 5.1**.

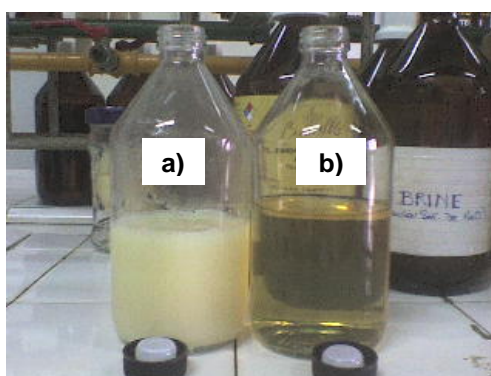
**Tabla 5.1.** Formulación de los compuestos *gemin*i sintetizados a mayor escala (**4b** y **4e**) para pruebas de desempeño sobre cueros.

Compuesto ( <i>gemin</i> i)	Fórmula	Cantidad	Resultado
<b>4b</b> (12.5 %)*	<b>4b</b>	25 g	emulsión blanca o de aspecto lechoso
	tensoactivo iónico	25 g	
	agua destilada	Volumen final 200 ml	
<b>4e</b> (50 %)*	<b>4e</b>	100 g	Solución límpida amarilla
	Agua destilada	Volumen final 200 ml	

\*Concentración del principio activo en la formulación.

Como puede observarse en la Tabla 5.1, la formulación de **4b** (compuesto dimérico no iónico) resultó en una emulsión blanca o de aspecto lechoso (dispersión heterogénea) formadas por la mezcla íntima de una grasa o cera (compuesto *gemin*i) y agua mediante la inclusión de un agente emulsificante (tensoactivo iónico). Por otro lado, la formulación de **4e** (compuesto dimérico catiónico) resultó en una solución límpida amarillenta debido a la buena solubilidad en agua de dicho principio activo.

Una fotografía de ambos formulados puede apreciarse, a continuación, en la **Figura 5.3**.



**Figura 5.3.** Aspecto físico de los formulados preparados a partir de los compuestos *gemin*i escalados: **a)** compuesto dimérico no iónico o **4b** (emulsión blanca), **b)** compuesto dimérico catiónico o **4e** (solución amarilla).

De esta manera, ambas muestras fueron enviadas al Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI – Cueros) para su evaluación como agente antifúngico (o preservante) en el proceso de fabricación de cueros.

## 5.4 PRUEBAS DE DESEMPEÑO EN CUEROS

Con el propósito de evaluar la eficacia antifúngica sobre cueros “Wet-blue” mediante ensayos de laboratorio de los productos de desarrollo, los mismos fueron remitidos al Instituto Nacional de Tecnología Industrial, más precisamente al Centro de Investigación y Desarrollo del Cuero (INTI-Cueros) ubicado en Manuel B. Gonnet (Buenos Aires, Argentina) bajo la denominación de “Muestra A” y “Muestra B” para los compuestos **4b** y **4e** respectivamente.

Para ello, se llevó a cabo un complejo procedimiento que puede ser dividido en tres etapas:

1. Aplicación de los productos de desarrollo (Muestras A y B) y de un producto comercial (Bio F-36, Pellital S.A.) en Planta de Curtiduría: Obtención de cuero “Wet-blue” (cuero húmedo tratado con sales básicas de cromo trivalente).
2. Ensayo realizado tomando como base la Norma ASTM D 3273-00 “*Standard Test Method for Resistance to Growth of Mold on the Surface of Interior Coatings in an Environmental Chamber*” (reapproved 2005) tanto para cada una de las muestras enviadas como para el producto comercial.
3. Ensayo realizado tomando como base la Norma ASTM D 4576-08 “*Standard Test Method for Mold Resistance of Wet Blue*” para los tres compuestos mencionados con anterioridad.

A continuación se describirán en detalle cada una de las etapas antes citadas.

#### 5.4.1 Obtención de cueros “wet-blue”

Durante esta etapa se ensayaron los productos de desarrollo (Muestras A y B) y un producto comercial (P) en dos concentraciones diferentes denominadas **A1, B1, P1** y **A2, B2, P2** respectivamente así como también se realizó un control sin biocida.

Se trabajó con dos pieles vacunas depiladas sin dividir (espesor integral). Se descartaron las cabezas, y el resto se dividió en ocho trozos cada piel. Todos los trozos fueron descalcados durante 24 horas en un baño 300 % de agua y 1.5 % de ácido oxálico [ambos porcentajes con respecto al peso de la piel depilada (peso tripa)] logrando un pH final cercano a 8.

Antes de comenzar con la aplicación de cada una de las muestras, se observó que la Muestra A presentaba dos fases. A pesar de ello, las tres muestras fueron agitadas (previo a su pesada) y diluidas en agua tibia (al igual que en las otras variantes) para formar la emulsión antes de su incorporación al fulón del proceso.

En la **Figura 5.4** podemos apreciar el aspecto físico de cada uno de los compuestos ensayados previo a su incorporación al proceso.



**Figura 5.4.** Aspecto físico de los productos antes de su incorporación al fulón del proceso: **a)** producto comercial (Bio F-36, Pellital S.A.), **b)** Muestra A (*gemini 4b*) y **c)** Muestra B (*gemini 4e*).

Se puede apreciar claramente la presencia de dos fases para el caso de la Muestra A.

De este modo, las muestras (A, B y P) en sus dos concentraciones diferentes fueron incorporadas al procesamiento del cuero, atravesando las etapas de lavado, picklado y curtido (descriptas en el Capítulo 1) hasta llegar a la obtención del cuero en su estado “wet-blue”.

## **5.4.2 Evaluación de la resistencia al crecimiento fúngico sobre cueros “wet-blue”:**

### **5.4.2.1 ASTM D 3273-00 (2005): Cámara Tropical**

Este método de ensayo ha sido diseñado para evaluar la resistencia al crecimiento fúngico sobre revestimientos de interiores (pinturas). Sin embargo, ha resultado de gran utilidad para poder apreciar el desempeño como preservantes de diferentes agentes antifúngicos en cueros “wet-blue”. El mismo describe una pequeña cámara y las condiciones de operación para evaluar de forma reproducible en un período de 4 semanas el desarrollo fúngico sobre un material. Por lo tanto, la temperatura y humedad deben controlarse de manera efectiva dentro de los límites relativamente estrechos especificados para que la cámara funcione de forma reproducible durante el período de prueba (ASTM 3273-00, 2005).

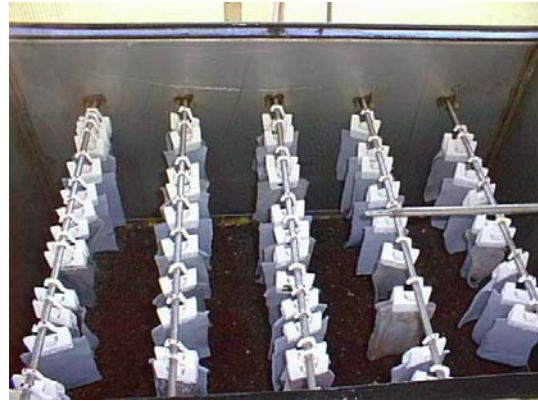
Básicamente, el procedimiento consistió en suspender rectángulos de cueros “wet-blue” tratados con las muestras A, B y P en sus dos concentraciones (es decir, A1, B1, P1 y A2, B2, P2) y sin tratar (control sin biocida) sobre el suelo en una cámara de prueba previamente inoculada con hongos filamentosos, en condiciones de calor y humedad controladas ( $28 \pm 2$  °C y humedad en saturación). Luego, se evaluó el desarrollo de los mismos sobre el material expuesto durante un período de cuatro semanas. Las cepas de hongos utilizadas para realizar el inóculo fueron *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*

Es importante aclarar que, cada ejemplar fue colocado en el interior de la cámara por duplicado.

En la **Figura 5.5 (a-b)** se muestran dos fotografías (exterior e interior) de una cámara tropical.



a)



b)

**Figura 5.5.** Cámara Tropical comúnmente empleada durante la evaluación de la resistencia al crecimiento fúngico sobre cueros “wet-blue”: **a)** aspecto característico externo de una cámara ambiental, **b)** Disposición interna de los cueros en la cámara.

Finalmente, los resultados se expresaron como porcentaje de superficie cubierta. Los mismos serán presentados a continuación en la **Tabla 5.2.**

**Tabla 5.2.** Evaluación de la resistencia fúngica en Cámara Tropical sobre cueros “wet-blue”. Condiciones de ensayo:  $28 \pm 2$  °C y humedad en saturación, durante 4 semanas. Cepas de hongos empleadas *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* Norma ASTM D 3273-00.

Semana de Ensayo	Wet-blue Control	Wet-blue P1	Wet-blue P2	Wet-blue A1	Wet-blue A2	Wet-blue B1	Wet-blue B2
1	40 %	s/c	s/c	40 %	s/c	s/c	s/c
2	80 %	s/c	s/c	40 %	s/c	s/c	s/c
3	100 %	s/c	s/c	80 %	50 %	40 %	10 %
4	---	s/c	s/c	80 %	80 %	60 %	10 %

s/c (sin crecimiento fúngico), % (porcentaje de la superficie cubierta).



Observando los resultados proporcionados por la Tabla 5.2, podemos concluir que:

Tanto el “wet-blue” Control (sin biocida) como el Producto Comercial en sus dos concentraciones “P1 y P2”, se comportaron satisfactoriamente durante el ensayo. Los mismos fueron utilizados como control positivo y negativo respectivamente.

Comparando el **Producto A** respecto a los controles antes mencionados se observó que, A1 y A2 (concentración 1 y 2 del producto A) no alcanzaron a contener el crecimiento fúngico de manera eficiente. A pesar de manifestar un mejor desempeño, la protección por parte de A2 tampoco fue satisfactoria en la tercera y cuarta semana, donde los hongos continuaron su crecimiento hasta cubrir un 80 % la superficie de cuero ensayado. Es importante destacar que, se recomienda que las muestras (cueros tratados con compuestos antifúngicos) alcancen la cuarta semana sin crecimiento.

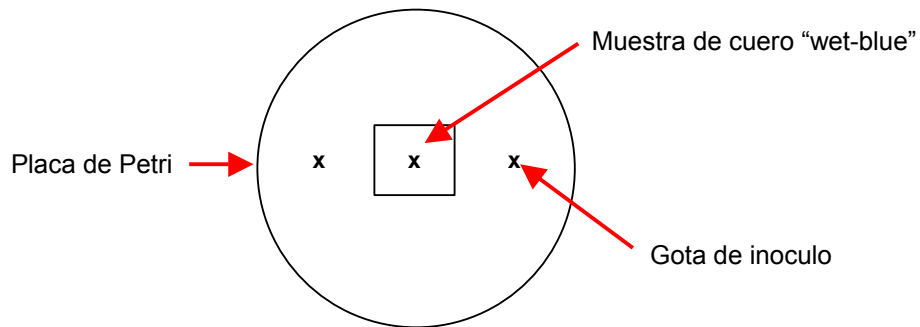
Ahora bien, si comparamos el desempeño del **Producto B** respecto al control y al producto comercial, se observó que B1 y B2 (concentración 1 y 2 del producto B) funcionaron de manera diferente ya que, en la tercera semana, B1 manifiesta un 40 % de superficie cubierta mientras que B2 lo hace solo en un 10 %. Es destacable entonces afirmar que, en la cuarta semana, B2 logra mantener la inhibición con un buen resultado: 10% de superficie cubierta. Probablemente, aumentando ligeramente su concentración podríamos conseguir un resultado óptimo, es decir, una muestra sin desarrollo fúngico en la cuarta semana del ensayo.

#### **5.4.2.2 ASTM 4576-08: Porciones de Cueros “Wet-blue” en placa**

Este método ha sido específicamente diseñado para evaluar la resistencia al crecimiento fúngico sobre cueros “wet-blue” (ASTM 4576, 2008).

Básicamente el procedimiento consistió en disponer en el centro de una placa de Petri estéril y vacía una muestra de cuero “wet-blue” previamente tratada con los productos de interés [productos A, B y P en sus dos concentraciones (A1, B1, P1 y A2, B2, P2) y un control sin biocida]. Luego, en dicha placa, se colocó lentamente Agar Papa Dextrosa hasta alcanzar el nivel (altura o espesor) de la muestra de cuero sin llegar a cubrirla. Una vez solidificado el agar, se inoculó la muestra con tres gotas de un inóculo preparado a

base de *Aspergillus sp.* La disposición de la siembra se realizó colocando una gota de este sobre el trozo de cuero y dos gotas más, una a cada lado del mismo (**Figura 5.6**).



**Figura 5.6.** Localización del inóculo en la muestra de cuero "wet-blue". La disposición de las tres gotas de inóculo se muestran con la letra (**x**).

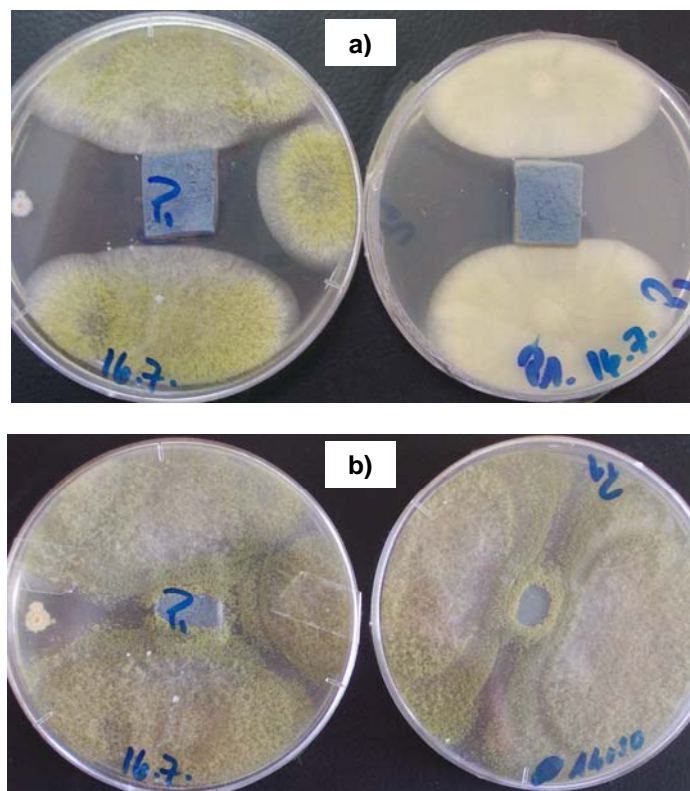
Luego, la placa (también su duplicado) se incubó a  $28 \pm 2$  °C por un período de tres semanas. Las lecturas de los resultados se realizaron a los 3, 7, 14 y 21 días.

Para una buena comprensión de los resultados es necesario establecer una escala de 0 a 4, en la cual cada número representa el grado de crecimiento fúngico observado sobre la muestra de cuero "wet-blue" (no sobre el agar) en un período de tiempo dado. Donde, cada número significa lo siguiente:

- ❖ **Grado 0:** sin crecimiento fúngico en la muestra de cuero o probeta.
- ❖ **Grado 0.5:** menos del 12 % de la superficie de la probeta cubierta por hongos.
- ❖ **Grado 1:** 25 % de la superficie de la probeta cubierta por hongos.
- ❖ **Grado 2:** 50 % de la superficie de la probeta cubierta por hongos.
- ❖ **Grado 3:** 75 % de la superficie de la probeta cubierta por hongos.
- ❖ **Grado 4:** 100 % de la superficie de la probeta cubierta por hongos.

Es importante aclarar que, el desarrollo fúngico presente en la periferia de la probeta (sin tocar la misma) puede ser considerado como Grado 0.

En la **Figura 5.7 (a-b)** podemos apreciar dos fotografías del ensayo realizado para el Producto Comercial en su concentración 1 (P1) a medida que transcurría el tiempo.



**Figura 5.7.** Evaluación de la resistencia fúngica en placa sobre cueros “wet-blue” (probeta) tratados con un producto comercial (Bio F-36, Pellital S.A.) en su concentración 1 (P1): **a)** fotografía tomada a los 7 días de ensayo sin desarrollo sobre la probeta (Grado 0), **b)** fotografía tomada a los 14 días de ensayo con desarrollo sobre la probeta (Grado 3).

Los resultados conseguidos mediante este último ensayo serán presentados a continuación en la **Tabla 5.3**.

**Tabla 5.3.** Evaluación de la resistencia fúngica en placa sobre cueros “wet-blue”. Condiciones de ensayo:  $28 \pm 2$  °C durante un período de tres semanas (lectura de los resultados a los 3, 7, 14 y 21 días). Cepa de hongo empleada *Aspergillus sp.* Norma ASTM D 4576-08.

Días de Ensayo	Wet-blue Control	Wet-blue P1	Wet-blue P2	Wet-blue A1	Wet-blue A2	Wet-blue B1	Wet-blue B2
3	Crec. en periferia	Grado 0	Grado 0	Crec. similar al control	Crec. similar al control	Crec. similar al control	Crec. similar al control
7	Grado 4	Grado 0	Grado 0	Grado 4	Grado 2	Grado 3	Grado 1
14	---	Grado 3	Grado 1	---	Grado 4	Grado 4	Grado 2
21	---	Grado 4	Grado 3	---	---	---	Grado 4

Grado 0 (sin crecimiento fúngico en la muestra de cuero o probeta), Grado 0.5 (menos del 12 %), Grado 1 (25 % de desarrollo), Grado 2 (50 % de desarrollo), Grado 3 (75 % de desarrollo) y Grado 4 (100 % de desarrollo).

A raíz de los resultados conseguidos podemos afirmar que:

Los controles, tanto positivo (“wet-blue” sin biocida) como negativo (Producto Comercial en sus dos concentraciones “P1 y P2”), se comportaron satisfactoriamente durante el desarrollo del ensayo en placa.

Si comparamos el desempeño **Producto A** con respecto al del **Producto B**, la concentración más baja de éste último (B1) se comportó de manera similar a la concentración más alta del primero (A2). Por otro lado, el producto B en su concentración más alta (B2) obtuvo un buen resultado respecto al producto A, pero sin alcanzar al producto comercial a la misma concentración (P2).

Asimismo, es destacable el comportamiento de B2 a los 14 días de lectura con un 50 % de la superficie de la probeta cubierta por hongos (Grado 2) mientras que se observa un 25 % de crecimiento fúngico (Grado 1) para P2 durante el mismo período de lectura. Este

resultado fue considerado de gran valor por el personal del Laboratorio de Microbiología del INTI-Cueros.

Finalmente, los detalles de los procedimientos empleados durante las pruebas de desempeño en cueros (punto 5.4 de esta tesis) pueden apreciarse en el ANEXO, más precisamente en el informe realizado por el INTI-Cueros.

## 5.5 BIBLIOGRAFÍA CAPÍTULO 5

- ✓ ASTM D 4576-08. *Standard Test Method for Mold Resistance of Wet Blue*. (2008).
- ✓ ASTM D3273-00. *Standard Test Method for Resistance to Growth of Mold on the Surface of Interior Coatings in an Environmental Chamber*. (Reapproved 2005).
- ✓ Costa López J, Cervera March S, Cunill García F, Esplugas Vidal S, Mans Teixidó C, Mata Álvarez J. *Curso de Ingeniería Química: Introducción a los procesos, las operaciones unitarias y los fenómenos de transporte*. Editorial Reverté SA. Barcelona, España (1991).
- ✓ Coulson JM, Richardson JF, Peacock DG. *Ingeniería Química: diseño de reactores químicos, ingeniería de la reacción bioquímica, control y métodos de cálculo con ordenadores*. Tomo III. Editorial Reverté SA. Barcelona, España (1984).
- ✓ Oliveira Batistuzzo JA, Itaya M, Eto Y. *Formulario Médico Farmacéutico*. Pharmabooks Editora. Sao Paulo, Brasil (2010).

## **CAPÍTULO 6**

### **“CONCLUSIONES”**

## 6 CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo están fundamentadas en la base de los objetivos alcanzados y los resultados experimentales obtenidos.

Durante el desarrollo de esta Tesis se abarcaron estudios en diferentes campos como ser el de la *Química Orgánica*, en sus aspectos teóricos y prácticos; la *Fisicoquímica*, en lo que respecta a estudios de tensión superficial y concentraciones micelares críticas; la *Tecnología Química*, en cuanto al escalado del proceso reactivo, pruebas de eficacia controlada en planta piloto y recomendación del producto; y la *Microbiología*, herramienta sin la cual las propiedades biológicas (tanto “*in vitro*” como sobre cueros) de los compuestos sintetizados no podrían haberse evaluado.

En general, desarrollando una estrategia de síntesis intencionalmente dirigida fue posible obtener con éxito ocho nuevos surfactantes del tipo gemini de naturaleza no iónica y catiónica de longitud de cadena hidrocarbonada variable ( $C_8$ - $C_{12}$ - $C_{18}$ ) y de diferente naturaleza (insaturada y perfluorada). Además, se logró sintetizar satisfactoriamente dos tensoactivos monoméricos no iónico y catiónico con 12 átomos de carbono en la región hidrofóbica de la molécula (ver Capítulo 2).

El primer paso para la obtención de los compuestos antes mencionados fue la síntesis de la molécula espaciadora *N*-acetildietanolamina (**2**), la cual fue conseguida con un rendimiento del 91% (porcentaje de recuperación de producto puro).

Una segunda etapa consistió en la síntesis del intermediario “llave” (**3**) a partir de la *N*-acetildietanolamina empleando Catálisis por Transferencia de Fases. Este paso resultó clave para la posterior preparación de los nuevos surfactantes *gemini*. La obtención fue llevada a cabo con un buen rendimiento (obteniéndose un 80% de producto aislado) y una excelente regioselectividad (pues no se observó el producto monosustituído). La conducción de la reacción de eterificación en sistemas heterogéneos (CTF) sólido-líquido empleando bisulfato de tetrabutilamonio (TBAB) como catalizador de transferencia de fases resultó exitosa y conveniente, ya que no requiere de la utilización de disolventes polares apróticos.

Antes de continuar con la obtención de los compuestos *gemini*, fue necesario llevar a cabo la síntesis de tres aminas grasas terciarias de longitud de cadena variable ( $C_8$ - $C_{12}$ -



C<sub>18</sub>) así como también la síntesis de la *N,N*-dimetilfarnesilamina y la *N,N*-dimetilperfluorooctil-propilamina. Así, los productos sintetizados se obtuvieron en muy buenos rendimientos y fueron seguidamente empleados en la siguiente etapa, la obtención de las moléculas tensoactivas diméricas.

En cuanto a la síntesis de los surfactantes del tipo *gemini* (**4 a-h**), la misma se realizó mediante la aminoalquilación del intermediario llave con aminas grasas primarias y terciarias de longitud de cadena variable C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> y diferente naturaleza (insaturada y perfluorada). Estos procedimientos y la posterior purificación de dichas moléculas permitieron obtener a los surfactantes no iónicos (**4 a-c**) como compuestos puros aislados en un 40, 33 y 30 % respectivamente. De igual modo, los surfactantes catiónicos (**4 d-h**) fueron obtenidos como compuestos puros aislados en un 92, 61, 39, 30 y 45 % respectivamente. Es importante dejar en claro que, a pesar de haber conseguido conversiones altas en cada una de las reacciones de obtención de los *gemini* antes mencionados, los rendimientos de los productos puros fueron bajos debido a la dificultad encontrada (fuerte interacción hidrofóbica entre el producto y una impureza) a la hora de llevar adelante las purificaciones.

Empleando las mismas rutas sintéticas y procedimientos experimentales, se prepararon dos moléculas monoméricas no iónica y catiónica (**7 a-b**) de longitud de cadena hidrocarbonada intermedia o C<sub>12</sub> con el objetivo de comparar el desempeño o comportamiento de dichos análogos monoméricos frente a los compuestos *gemini* de igual longitud de cadena, no iónico y catiónico (**4b** y **4e**). Así, los compuestos **7a** y **7b** fueron obtenidos con un rendimiento del 86 y 80 % respectivamente.

Con respecto al estudio de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos sintetizados y según los resultados presentados en el Capítulo 3 podemos afirmar que, realizando medidas de tensión superficial y por medio de la construcción de las gráficas correspondientes para cada compuesto [Tensión Superficial (mN/m) vs. Log Concentración (Log M)], fue posible estudiar el comportamiento de las moléculas catiónicas sintetizadas **4d-h** y **7b**. Los compuestos catiónicos fueron ensayados debido su buena solubilidad en medio acuoso. Las propiedades tensoactivas y de agregación de los compuestos no iónicos **4a-c** y **7a** no pudieron ser determinadas debido a su baja solubilidad en agua y a que fueron incapaces de mantener una emulsión estable. A partir de estos estudios y dados los valores de CMC, C<sub>20</sub>,  $\gamma_{CMC}$ , pC<sub>20</sub>, CMC/C<sub>20</sub>,  $\Gamma$  y A,

concluimos que la serie de compuestos catiónicos sintetizados presentó buenas propiedades activas de superficie y de agregación. De la serie, se destacan principalmente los *gemi*ni **4f** y **4h** que muestran valores de  $pC_{20}$  de 4.31 y 4.61 y valores de CMC de  $2.19 \times 10^{-4}$  M y  $6.21 \times 10^{-4}$  M respectivamente.

Utilizando un procedimiento simple y eficaz para medir la actividad antimicrobiana, como lo es la técnica de dilución en caldo, se evaluó el desempeño de las moléculas sintéticas obtenidas frente a diferentes especies de hongos tales como: *Candida albicans* ATCC 64548, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida parapsilosis* (aislamiento regional), *Aspergillus niger* ATCC 16404 y *Alternaria sp.*

Además, para cotejar los valores de CIM obtenidos se ensayaron dos compuestos de referencia: Fluconazol (derivado azólico de uso clínico y de elevada actividad antifúngica) y Bio F-36 (conservante empleado en la curtición de pieles a base de TCMTB y un derivado carbámico).

De manera general, a partir de los valores presentes en las Tablas 4.3 y 4.4 (Capítulo 4), podemos afirmar que los compuestos ensayados (**4a-h**) y (**7a-b**) demostraron ser activos biológicamente frente a los microorganismos evaluados.

Observando el comportamiento de todos los compuestos podemos concluir que: frente al grupo de levaduras y mohos, **4b**, **4e** y **4f** resultaron ser las estructuras más potentes. La actividad inhibitoria máxima (valor de CIM más pequeño) fue encontrada para **4f** frente a *C.parapsilosis* ATCC 22019 con 0.25 µg/ml. Los compuestos **4b** y **4e** mostraron actividad antifúngica efectiva y similar para todas las cepas estudiadas. En general, las moléculas menos activas fueron **4a**, **4d** y **4h**. Los análogos monoméricos **7a** y **7b** demostraron ser considerablemente menos activos en comparación con los surfactantes diméricos de igual longitud de átomos de carbono en la porción hidrofóbica de la molécula (**4b** y **4e**). Por otro lado, los resultados muestran que, en general, *S.cerevisiae* ATCC 9763 fue el microorganismo más sensible. En contraste, el aislamiento regional de *C.parapsilosis* fue la levadura más resistente. En el caso de los hongos filamentosos *A.niger* ATCC 16404 resulto ser más resistente que *Alternaria sp.*

Por otro lado, los valores de CIM obtenidos para los compuestos *gemi*ni fueron comparables (y en muchos casos superiores) a los valores conseguidos para los antifúngicos de referencia: Fluconazol y Bio F-36.

Debido a lo resaltado anteriormente, las moléculas **4b** y **4e** fueron seleccionadas para ser escaladas (con el fin de transferir los resultados como un aporte novedoso para el sector productivo) por su destacado desempeño en general, demostrada acción antifúngica y bajo costo de producción. Para llevar a cabo dicho proceso se utilizó un Reactor Discontinuo de Tanque Agitado. Ambos compuestos fueron preparados a mayor escala y formulados de manera adecuada para luego ser enviados al Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI – Cueros) para su evaluación como agente antifúngico (o preservante) en el proceso de fabricación de cueros.

Finalmente, el desempeño del compuesto **4e** (Muestra B en la concentración 2, “B2”) fue satisfactorio y considerado de gran valor por el INTI-Cueros (ver Capítulo 5). A raíz de esto, podemos afirmar que dicha molécula presenta las mayores ventajas a nivel tecnológico.

En vista de estos resultados se recomienda continuar con los estudios necesarios para poder proponer a este último compuesto como una alternativa eficiente y menos nociva para el hombre y el medio ambiente con el fin de controlar el desarrollo fúngico sobre cueros, favoreciendo el rendimiento económico de la industria curtidora argentina. Algunos de los posibles estudios a realizar podrían ser:

- ❖ Pruebas toxicológicas o de impacto ambiental del compuesto sintetizado (**4e**)
- ❖ Aplicación del mismo en una concentración ligeramente mayor a “B2” durante la obtención del cuero “wet-blue”
- ❖ Ensayos de sinergismo con Bio F-36 (Pellital S.A.) de manera de poder disminuir la cantidad de TCMTB empleada en la actualidad durante la manufactura del cuero debido a su elevada toxicidad.

En conclusión, además de poder funcionar como nuevos antifúngicos, los *gemi* poseen otras ventajas. Pueden ser preparados en el laboratorio por síntesis química, evitando fermentaciones bacterianas como en el caso de los muchos antifúngicos. La variedad de moléculas que pueden ser preparadas por síntesis es versátil y grande, los métodos de

preparación no están agotados y ofrecen un amplio campo para la investigación. Los productos tienen propiedades tensoactivas definidas que les confieren una mejor solubilidad en medios acuosos y no acuosos y una mayor capacidad de penetración sobre superficies tales como cueros, pieles, maderas, etc.

Finalmente, no queríamos dejar de mencionar que, parte de los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis han sido divulgados por intermedio de la siguiente publicación científica:

- ✓ Murguía M, Machuca L, Lurá MC, Cabrera MI, Grau R. *Synthesis and Properties of Novel Antifungal Gemini Compound Derived from N-Acetyldiethanolamines*. Journal of Surfactants and Detergents. 11, 223-230 (2008). DOI 10.1007/s11743-008-1076-4 - ISSN 1097-3958.

Asimismo, es nuestro interés destacar que, muchos de los resultados conseguidos en este trabajo formarán parte de una patente de invención. La misma se encuentra en redacción para ser presentada ante las oficinas del CETRI-UNL.

## **ANEXO**

## **SABOURAUD CALDO.**

Este medio, conocido también como medio de antibióticos N° 13, se usa para el aislamiento y cultivo de hongos y levaduras.

### **Fundamento**

Las peptonas de carne y caseína suministran las fuentes de nitrógeno y carbono necesarios para el crecimiento de bacterias y hongos. La glucosa es la fuente de energía para aquellos organismos capaces de fermentarla.

<b>Fórmula (en gramos por litro)</b>		<b>Instrucciones</b>
Tripteína	5.0	Suspender 30 g del polvo en un litro de agua destilada. Mezclar vigorosamente. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
Peptona de carne	5.0	
Glucosa	20.0	
pH final: 5.7 ± 0.2		

### **Siembra**

Consultar referencias de métodos recomendados.

### **Incubación**

En aerobiosis, a 22-25 °C y/o a 35-37 °C, preferiblemente con las tapas a rosca flojas. El tiempo de incubación será de hasta 28 días o dependerá del hongo que se esté buscando.

### **Resultados**

El crecimiento se evidencia por la aparición de turbidez. Los subcultivos deben realizarse para obtener cultivos puros.

<b>Microorganismos</b>	<b>Crecimiento</b>
Candida albicans	Bueno
Trichophyton mentagrophytes	Bueno

**Características del medio**

Medio preparado: ámbar claro

**Almacenamiento:**

Medio deshidratado: a 10-35 °C.

Medio preparado: a 2-8 °C.

Presentación	
x 100g :Código: B02-178-05	x 500g :Código: B02-178-06

## **ESTÁNDAR DE TURBIDÉZ 0.5 McFarland.**

### **APPENDIX B (M27-A2, NCCLS).**

#### **McFarland 0.5 Barium Sulfate Turbidity Standard.**

To standardize de inoculums density, a BaSO<sub>4</sub> turbidity standard is used (0.5 McFarland standard).

The procedure consists of the following steps:

- (1) Prepare this turbidity standard by adding 0.5 ml of 0.048 mol/L BaCl<sub>2</sub> (1.175% w/v BaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O) to 99.5 ml of 0.18 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1% v/v).
- (2) Verify the correct density of the turbidity standard by using a spectrophotometer with a 1-cm light path and matched cuvette to determine the absorbance. The absorbance at 625 nm should be 0.08 to 0.10 for the McFarland standard.
- (3) Distribute 4 to 6 ml into screw-cap tubes of the same size as those used in growing or diluting the broth culture inoculum.
- (4) Tightly seal these tubes and store them in the dark at room temperature.
- (5) Vigorously agitate this turbidity standard on a mechanical vortex mixer just before use.
- (6) Replace standards or recheck their densities three months after preparation.



# Bio F - 36

**Descripción del producto:** Conservante técnico para ser usado en la curtición de pieles a base de **TCMBT [2-Thio-cyanomethylthio-benzothiazole] y derivado carbámico.**  
Previene y evita la formación de mohos durante la curtición y el almacenamiento de pieles húmedas, en estado wet-blue. Funguicida apropiado para la curtición al cromo, vegetal y curtidos libres de cromo.  
Acción sinérgica de sus principios activos que confiere una protección adicional a la superficie de las pieles curtidas.  
**Este producto ha sido especialmente formulado para moderar su toxicidad y reducir la irritación de la piel y membranas mucosas de los usuarios.**

**Características del producto:**

<u>Aspecto:</u>	Líquido transparente, color ámbar
<u>Solubilidad:</u>	Emulsionable en agua.
<u>Olor:</u>	Característico.
<u>pH:</u> (sol. 1% en agua P/P)	2.0 – 4.0

**Dosis:** Dependen de la duración del almacenamiento previsto para las pieles en estado húmedo, del contenido de grasa y espesor. Si se usan enmascarantes en el curtido o si se trata de pieles de alto contenido de grasa natural debe aumentarse la dosis, por esta razón facilitamos sólo datos orientativos: 1,2 – 2,0 Kg de **BIO F-36** por tonelada de piel en tripa a curtir (0,12 % - 0,20 % sobre el peso de la piel en tripa).  
Para la preservación de descarnes wet blue procedentes de el dividido de cuero integral se lo puede rociar con una dilución de **BIO-F-36** de 1 a 3 litros en 200 de agua al salir de la máquina de dividir.

**Medidas de precaución:**

Almacenamiento: Manipular con guantes de goma, gafas protectoras y vestimenta de protección adecuada.  
Evitar contacto con la piel e inhalación de la nube de pulverización. Las salpicaduras en piel y ojos deben lavarse con abundante agua y durante largo tiempo las zonas afectadas. Quitar las ropas humedecidas.  
**Ver nuestra hoja de seguridad vigente y observar bien las instrucciones de las etiquetas de nuestros envases.**  
Mantener los envases bien cerrados y procurar buena ventilación del recinto de trabajo.

# Bio F – 36

**Modo de empleo:** Para conseguir una buena distribución, 1 parte de **BIO F – 36** debe ser emulsionado en 1 parte de agua y agregado al fulón en movimiento, después de los ácidos de piquelado o como tarde con la última porción de cromo. La emulsión preparada no debe guardarse, debe usarse rápidamente.

Puede agregarse también la primera mitad de la dosis al principio de la curtición y la segunda mitad de la dosis al final de la misma. Si después de la curtición los cueros son lavados o divididos deberá aplicarse una nueva dosis de protección en la superficie.

Ejemplo de aplicación:

<b>Piquelado</b>	100,00 %	Pieles en tripa desenchaladas, purgadas y divididas.	
	60,00 %	Agua a 20 °C	
	7,00 %	Sal	
	100 %	<b>ALKAPELL W</b>	20 min.
		Control: °Be: 7,5	
	0,80 %	Ácido Fórmico 85 %	30 min.
	1,20 %	Acido Sulfúrico 98 %	
	<b>0.10 %</b>	<b>BIO F-36</b> (1:1 agua a 30°C)	120 min.
		Control baño pH : 2,6 – 2.8	
		Control cuero: VBC Amarillo.	
<b>Curtido</b>	3,00 %	Cromosal B	60 min.
	3,00 %	Cromosal B	
	<b>0,08 %</b>	<b>F-36</b> (1:1 agua a 30°C)	
	0,70 %	<b>OPALOIL QS</b>	
	0,80 %	<b>FISOCROM AG</b>	120 min.
<b>Basificar</b>			

**Garantías:** Esta información se ofrece según el estado actual de nuestros conocimientos y pretenden aclarar sobre nuestros productos y sus posibles aplicaciones. No podemos garantizar propiedades específicas de preparados finales, ni su aptitud para usos concretos.

**No existe ningún biocida que brinde una conservación absolutamente segura, ya que ocasionalmente surgen microorganismos que han desarrollado resistencia o bien no han sido investigados aún.**

Recomendamos realizar pruebas de efectividad constantemente, a fin de reforzar la protección si fuera necesario.

**Envases:** Bidones de 60 Lts. - Tambores de 200 Lts.

# Hoja de Seguridad

## Pellital S.A.

Fecha : 11.10.00

Ultima revisión: 21.03.07

1/3

### **1 Identificación del producto y de la sociedad o empresa**

#### **Datos del producto**

Nombre comercial: **BIO F - 36**

Productor / Proveedor: **PELLITAL S.A.**

Tucumán 3275 (1644) Victoria, Buenos Aires, República Argentina.

Tel.: (5411) 4745-7557/7610, 4746-3981, 4512-4352/4353 y 4549-1466.

Fax: (5411) 4746-3994. E-mail: [hferral@pellital.com.ar](mailto:hferral@pellital.com.ar)

### **2 Composición / información sobre los componentes**

#### **Características químicas**

**Descripción:** Combinación de TCMTB (2-tiocianometil-tiobenzotiazol) con alquil 2-bencimidazol carbamato y alcoholes grasos etoxilados como emulsionantes.

#### **Sustancias peligrosas contenidas:**

CAS N°	Designación	Índice	Frases - R	% Porcentaje
21564-17-0	TCMTB	C y Xn		aprox. 30%.

### **3 Identificación de los peligros**

**Denominación del peligro:** Suprimido.

**Aviso especial sobre peligros para personas y medio ambiente:** Corrosivo y Nocivo.

**Sistema de clasificación:** La clasificación corresponde a las listas de: la Secretaría de Obras Públicas y Transporte de la República Argentina (S.O.P.T.R.A.), de las Naciones Unidas y de la Comunidad Económica Europea (CEE), añadiéndose datos procedentes de la literatura especializada y relativos a empresas.

### **4 Primeros auxilios**

**Contacto con la piel:** Eliminar toda prenda contaminada con el producto. Lavar con abundante agua fría y jabón la zona afectada. Si persiste irritación consultar con un médico.

**Contacto con los ojos:** Lavar con abundante agua corriente, manteniendo los párpados bien abiertos durante 15 minutos aproximadamente. Si persiste irritación consulte a un médico.

**Inhalación:** Alejar a la persona del ambiente polucionado. Llevarla al aire libre. Si no respira darle respiración artificial.

**Ingestión:** Enjuagar con mucha agua. No inducir al vómito. No dar a beber leche ni aceite. Llamar al médico.

### **5 Medidas de lucha contra incendios**

**Sustancias extintoras adecuadas:** Polvo extintor, espuma arena seca, dióxido de carbono y/o agua para refrigerar. Combatir incendios grandes con chorro de agua o espuma.

**Equipo especial de protección:** Requiere medidas especiales: máscara con filtro para vapores y ropa adecuada de protección.

**Otras indicaciones:** En caso de incendio puede(n) desprenderse: gases nitrosos y/o dióxido de azufre.

### **6 Medidas que deben tomarse en caso de vertido accidental**

**Medidas de protección relativas a personas:** Mantener alejadas a distancia a todas aquellas personas ajenas al sector.

**Medidas de protección para el medio ambiente:** Evitar su canalización a desagües, alcantarillados o cuerpos de agua superficiales.

**Procedimiento de limpieza / recolección:** Peligro de resbalamiento. Recoger con material absorbente (arena, tierra, etc.) en envases plásticos y disponer según normas internas. Cualquier descarga en el área pública debe notificarse a las autoridades.

# Hoja de Seguridad

## Pellital S.A.

Fecha : 11.10.00

2/3

Nombre comercial: **BIO F - 36**

### **7 Manipulación y almacenamiento**

**Manejo - Instrucciones sobre la manipulación segura:** Evitar inhalar los vapores. No ingerirlo. Trabajar con la ventilación adecuada. Utilizar guantes de PVC.

**Instrucciones sobre la protección contra incendios y explosiones:** Manténgalo alejado del calor. Cuando se utilice el producto en ambientes cerrados o se calienta por encima de la temperatura ambiente se recomienda ventilación mecánica a prueba de explosión.

**Almacenaje-Cualidades requeridas de almacenes y recipientes:** Mantener en recipientes cerrados. No manipular cerca de llamas.

**Instrucciones sobre el almacenaje combinado:** No almacenar junto a agentes oxidantes fuertes y/o ácidos.

**Instrucciones adicionales sobre las condiciones de almacenaje:** Proteger de altas temperaturas y las heladas. El tiempo de almacenamiento no debería exceder un año.

### **8 Control de exposición / protección individual**

**Componentes de valores límites a vigilar con repercusiones al lugar de trabajo:** Suprimido.

**Medidas generales de protección e higiene:** Deben respetarse las medidas regulares de seguridad para el manejo de productos químicos.

**Protección respiratoria:** Máscara con filtro para gases y vapores orgánicos.

**Protección a las manos:** Guantes de PVC.

**Protección a los ojos:** Gafas protectoras o pantalla facial contra salpicaduras químicas.

**Protección al cuerpo:** Ropa protectora de trabajo (delantales impermeables).

### **9 Propiedades físicas y químicas**

**Estado físico:** Líquido transparente.

**Color:** Rojizo ambar.

**Olor:** Característico.

**pH (sc. 1 % P/P a 20°C):** 2.0 – 4.0

**Peso específico:** Aprox. 1.07 -1.20 g/ml 20°C

**Solubilidad y emulsión:** Emulsion 1% en agua: color blanco, estable.

### **10 Estabilidad y reactividad**

**Plazo de vida útil:** 1 año en condiciones normales de almacenaje.

**Condiciones a evitar:** No se descompone con uso adecuado. No almacenar en recipientes metálicos.

Corrosivo para metales. Los recipientes vacíos sin limpiar pueden contener gases del producto que pueden ocasionar mezclas explosivas.

**Sustancias a evitar:** Agentes oxidantes fuertes y/o ácidos.

**Productos peligrosos de descomposición:** Puede generar gases por combustión: dióxido de azufre y/o gases nitrosos.

### **11 Informaciones toxicológicas**

**Toxicidad aguda:** Suprimido.

**En la piel:** Irritante al aparato respiratorio.

**En los ojos:** Efecto irritante a los ojos.

**Sensibilización:** Puede causar sensibilización en contacto con la piel.

**Datos adicionales (sobre la toxicología experimental):** Los datos toxicológicos de este producto no han sido determinados mediante experimentos. Los datos derivan de la evaluación o de los resultados de análisis de productos similares (analogismo). No hay evidencia de potencial mutagénico.

**Instrucciones adicionales toxicológicas:** El producto resulta irritante a los ojos, al aparato respiratorio, a la mucosa nasal y la cavidad oral.

# Hoja de Seguridad

## Pellital S.A.

Fecha : 11.10.00

3/3

Nombre comercial: **BIO F - 36**

### **12 Informaciones ecológicas**

**Instrucciones ecológicas adicionales:** No introducir en plantas depuradoras adaptadas biológicamente, por su propiedad bactericida. Peligroso para los organismos acuáticos.

**Aviso AOX:** Por las sustancias contenidas, que no contienen halógenos orgánicamente ligados, este producto no puede contribuir a la carga AOX de las aguas residuales.

**Según la receta, contiene los siguientes metales pesados y combinaciones:** Según nuestros conocimientos actuales el producto no contiene metales pesados o sus compuestos.

**Instrucciones generales:** De momento no disponemos de valorizaciones ecotoxicológicas. No debe filtrarse grandes cantidades no diluidas en las aguas subterráneas, ni públicas, ni en el alcantarillado.

### **13 Consideraciones relativas a la eliminación**

**Producto - Recomendación:** No debe ser eliminado junto con la basura doméstica. No debe llegar al alcantarillado. Eliminación conforme a las disposiciones legales.

**Envases sucios - Recomendaciones:** Eliminación conforme a las disposiciones legales.

**Medio recomendado de limpieza:** Agua, eventualmente con aditivos de limpieza.

### **14 Informaciones relativas al transporte (terrestre, marítimo y aéreo)**

#### **Transporte terrestre (S.O.P.T.R.A. d/N° 195/97):**

Clase GGVS/E: Clase= 8 y Clase=6

Naciones Unidas N° : 3265

Código de riesgo: 86

N° de guía: 154

Grupo de embalaje: III

Denominación del flete: Líquido corrosivo ácido orgánico n.e.o.m.\*

#### **Transporte marítimo:**

Clase IMDG: Clase=8 y Clase=6

Naciones Unidas N°: 3265

Denominación del flete: Líquido corrosivo ácido orgánico n.e.o.m.\*

#### **Transporte aéreo:**

Clase ICAO/IATA: Clase=8 y Clase=6

Naciones Unidas N°: 3265

Denominación del flete: Líquido corrosivo ácido orgánico n.e.o.m.\*

*"Según guía de emergencias químicas, secretaría de política ambiental de la provincia de Buenos Aires Año 1998".*

\* n.e.o.m.= no especificado otro material.

### **15 Informaciones reglamentarias**

**Distinción según las directivas de la CEE:** Clase = 8 y Clase=6

Naciones Unidas N°: 3265, Código de riesgo: 86, N° de guía: 154, Grupo de embalaje: III.

**Letra distintiva y denominación de peligro del producto:** C= Corrosivo y Xn = Nocivo.

**Componentes determinantes del peligro para fines del etiquetado:** El producto no está sometido a etiquetaje obligatorio en virtud del método de cálculo de la S.O.P.T.R.A. disposición N° 195/97 y de la Directiva General de Clasificación sobre Elaboraciones de la CEE.

### **16 Otras informaciones**

Los datos se basan sobre el estado actual de nuestros conocimientos, pero no constituyen garantía alguna de cualidades del producto y no generan ninguna relación jurídica contractual.

**Sector que expide la hoja de datos:** Oficina técnica: Sr. Hernán Ferral.

05-08--729

**Solicitante: UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**Domicilio: Av. Pellegrini 2750 – 3000 Santa Fé**

Fecha de Informe: 15 de Septiembre de 2009  
Tipo de Informe: Informe Único

Nº de Informe: 2206  
Nº de O.T.: 5526

### INFORME DE ENSAYO

#### **I. OBJETIVO.**

Evaluar la eficacia antifúngica en cueros "Wet-blue" (1) por ensayos de Laboratorio, de dos productos de desarrollo, A y B remitidos por el solicitante, luego de la aplicación en Planta de Curtiduría de INTI Cueros.

#### **II. MUESTRA.**

Fecha de recepción:

**Descripción: Muestras.**

Identificadas como:	Nº CITEC 2009
Muestra A	C-638
Muestra B	C-639

#### **III. PROCEDIMIENTO.**

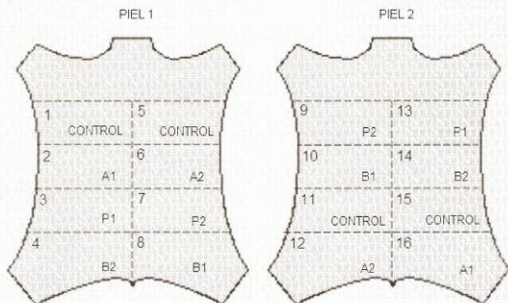
- 1- Aplicación de Productos en Planta de Curtiduría. Obtención de Wet-blue : Cuero humedo con sales basicas de cromo trivalente. Ver en resultados: Procedimiento interno utilizado.
- 2- Ensayo realizado tomando como base a la Norma ASTM D 3273-00, (Reapproved 2005).  
*Standard Test Method for resistance to growth of mold on the surface of interior coatings in an environmental chamber.*
- 3- Norma ASTM D 4576-08. *Standard Test method for Mold Growth resistance of wet blue.*

#### **IV. RESULTADOS.**

##### **IV.1 OBTENCIÓN DE CUEROS WET BLUE: APLICACIÓN DE PRODUCTOS REMITIDOS A Y B.**

Se trabajó con dos pieles vacunas depiladas sin dividir (espesor integral). Se descartaron las cabezas, y el resto se divide en ocho trozos cada piel. Todos los trozos se desencalan durante 24 horas en un baño 300 % de agua y 1, 5 % de ácido oxálico (ambos porcentajes con respecto al peso de la piel depilada: peso tripa) logrando un pH final cercano a 8.

La distribución de los trozos es la siguiente:



CONTROL: Sin aplicación de biocida.

A1: aplicación de Biocida Formulado A en la concentración 1 (0,10 % sobre peso tripa)

A2: aplicación de Biocida Formulado A en la concentración 2 (0,25 % sobre peso tripa)

B1: aplicación de Biocida Formulado B en la concentración 1 (0,10 % sobre peso tripa)

B2: aplicación de Biocida Formulado B en la concentración 2 (0,25 % sobre peso tripa)

P1: aplicación de Biocida Comercial en la concentración 1 (0,10 % sobre peso tripa)

P2: aplicación de Biocida Comercial en la concentración 2 (0,25 % sobre peso tripa)

Observaciones: dos horas antes de comenzar la aplicación del Biocida A. Se observó que este producto presentaba dos fases. El producto fue agitado antes de su pesada y diluido en agua tibia (igual que en las otras variantes) para formar la emulsión, antes de su incorporación al fulón de proceso.

*[Handwritten signature]*

Las formulaciones de aplicación se detallan a continuación:

Experiencia: 1- Biocida formulado A / concentración 1

Trozos número: 2 / 16

Peso: 4,100 kg

Lavado

agua 25 °C 150 %  
tiempo 15 min., escurrir

Piquelado

agua 20°C 80 %  
sal común 9 %  
marcha 10 min., controlar densidad **0,66,5 - 7,0**

formiato de sodio 0,7 %  
marcha 20 min.

ácido sulfúrico concentrado 1,2 % (diluido 1: 20)  
marcha 60 min.

**Biocida A** 0,06 %  
60 min. pH 3,0 - 3,2 . corte al verde bromo cresol = amarillo

ácido fórmico 1,5 %  
marcha 90 min.

Curtido

Chromosal B (curtiente) 3,5 %  
marcha 60 minutos, subir la temperatura a **30 °C**

Chromosal B 3,5 %  
**Biocida A** 0,04 %  
marcha 60 min.

Blancorol MR (basificante) 5 %  
marcha 60 minutos, temperatura **30 °C**

marcha 60 minutos, pH 3,8 - 4,0 subir la temperatura **45 °C**

marcha 10 minutos/hora nocturno

escurrir el baño y colocar sobre caballete cubierto.

*Handwritten signature*



Experiencia: 2- Biocida formulado B / concentración 1

Trozos número: 8 / 10

Peso: 5,100 kg

Lavado

agua 25 °C  
tiempo 15 min., escurrir 150 %

Piquelado

agua 20°C 80 %  
sal común 9 %  
marcha 10 min., controlar densidad **Bé 6,5 - 7,0**

formiato de sodio 0,7 %  
marcha 20 min.

ácido sulfúrico concentrado 1,2 % (diluido 1: 20)  
marcha 60 min.

**Biocida B** 0,06 %  
60 min. pH 3,0 - 3,2 , corte al verde bromo cresol = amarillo

ácido fórmico 1,5 %  
marcha 90 min.

Curtido

Chromosal B (curtiente) 3,5 %  
marcha 60 minutos, subir la temperatura a **30°C**

Chromosal B 3,5 %  
**Biocida B** 0,04 %  
marcha 60 min.

Blancorol MR (basificante) 5 %  
marcha 60 minutos, temperatura **30 °C**

marcha 60 minutos, pH 3,8 – 4,0 subir la temperatura **45 °C**

marcha 10 minutos/hora nocturno

escurrir el baño y colocar sobre caballete cubierto.

Experiencia: 3- Biocida Pellital / concentración 1

Trozos número: 3 / 13

Peso: 3,700 kg

Lavado

agua 25 °C 150 %  
tiempo 15 min., escurrir

Piquelado

agua 20°C 80 %  
sal común 9 %  
marcha 10 min., controlar densidad **°Bé 6.5 - 7,0**

formiato de sodio 0,7 %  
marcha 20 min.

ácido sulfúrico concentrado 1,2 % (diluido 1: 20)  
marcha 60 min.

**Biocida** 0,06 %  
60 min. pH 3,0 - 3,2 , corte al verde bromo cresol = amarillo

ácido fórmico 1,5 %  
marcha 90 min.

Curtido

Chromosal B (curtiente) 3,5 %  
marcha 60 minutos, subir la temperatura a **30°C**

Chromosal B 3,5 %  
**Biocida** 0,04 %  
marcha 60 min.

Blancorol MR (basificante) 5 %  
marcha 60 minutos, temperatura **30 °C**

marcha 60 minutos, pH 3,8 - 4,0 subir la temperatura **45 °C**

marcha 10 minutos/hora nocturno

escurrir el baño y colocar sobre caballete cubierto.

Experiencia: 4- Control sin biocida

Trozos número: 1 / 5 / 11 / 15

Peso: 7,500 kg

Lavado

agua 25 °C 150 %  
tiempo 15 min., escurrir

Piquelado

agua 20°C 80 %  
sal común 9 %  
marcha 10 min., controlar densidad ~~Bé 6,5 - 7,0~~

formiato de sodio 0,7 %  
marcha 20 min.

ácido sulfúrico concentrado 1,2 % (diluido 1: 20)  
120 min. pH 3,0 - 3,2 , corte al verde bromo cresol = amarillo

ácido fórmico 1,5 %  
marcha 90 min.

Curtido

Chromosal B (curtiente) 3,5 %  
marcha 60 minutos, subir la temperatura a 30 °C

Chromosal B 3,5 %  
marcha 60 min.

Blancorol MR (basificante) 5 %  
marcha 60 minutos, temperatura 30 °C

marcha 60 minutos, pH 3,8 - 4,0 subir la temperatura 45 °C

marcha 10 minutos/hora nocturno

escurrir el baño y colocar sobre caballete cubierto.

Experiencia: 5- Biocida formulado A / concentración 2

Trozos número: 6 / 12

Peso: 4,500 kg

Lavado

agua 25 °C 150 %  
tiempo 15 min., escurrir

Piquelado

agua 20°C 80 %  
sal común 9 %  
marcha 10 min., controlar densidad °Bé 6,5 - 7,0

formiato de sodio 0,7 %  
marcha 20 min.

ácido sulfúrico concentrado 1,2 % (diluido 1: 20)  
marcha 60 min.

**Biocida A** 0,15 %  
60 min. pH 3,0 - 3,2 , corte al verde bromo cresol = amarillo

ácido fórmico 1,5 %  
marcha 90 min.

Curtido

Chromosal B (curtiente) 3,5 %  
marcha 60 minutos, subir la temperatura a 30°C

Chromosal B 3,5 %  
**Biocida A** 0,10 %  
marcha 60 min.

Blancorol MR (basificante) 5 %  
marcha 60 minutos, temperatura 30 °C

marcha 60 minutos, pH 3,8 – 4,0 subir la temperatura 45 °C

marcha 10 minutos/hora nocturno

escurrir el baño y colocar sobre caballete cubierto.

Experiencia: 6- Biocida formulado B / concentración 2

Trozos número: 4 / 14

Peso: 4,200 kg

Lavado

agua 25 °C  
tiempo 15 min., escurrir 150 %

Piquelado

agua 20°C 80 %  
sal común 9 %  
marcha 10 min., controlar densidad **Be 6,5 - 7,0**

formiato de sodio 0,7 %  
marcha 20 min.

ácido sulfúrico concentrado 1,2 % (diluido 1: 20)  
marcha 60 min.

**Biocida B** 0,15 %  
60 min. pH 3,0 - 3,2 , corte al verde bromo cresol = amarillo

ácido fórmico 1,5 %  
marcha 90 min.

Curtido

Chromosal B (curtiente) 3,5 %  
marcha 60 minutos, subir la temperatura a **30°C**

Chromosal B 3,5 %  
**Biocida B** 0,10 %  
marcha 60 min.

Blancorol MR (basificante) 5 %  
marcha 60 minutos, temperatura **30 °C**

marcha 60 minutos, pH 3,8 – 4,0 subir la temperatura **45 °C**

marcha 10 minutos/hora nocturno

escurrir el baño y colocar sobre caballete cubierto.

Experiencia: 7- Biocida Pellital / concentración 2

Trozos número: 7 / 9

Peso: 3,400 kg

Lavado

agua 25 °C 150 %  
tiempo 15 min., escurrir

Piquelado

agua 20°C 80 %  
sal común 9 %  
marcha 10 min., controlar densidad **9Bé 6,5 - 7,0**

formiato de sodio 0,7 %  
marcha 20 min.

ácido sulfúrico concentrado 1,2 % (diluido 1: 20)  
marcha 60 min.

*Biocida* 0,15 %  
60 min. pH 3,0 - 3,2 , corte al verde bromo cresol = amarillo

ácido fórmico 1,5 %  
marcha 90 min.

Curtido

Chromosal B (curtiente) 3,5 %  
marcha 60 minutos, subir la temperatura a **30°C**

Chromosal B 3,5 %  
*Biocida* 0,10 %  
marcha 60 min.

Blancorol MR (basificante) 5 %  
marcha 60 minutos, temperatura **30 °C**

marcha 60 minutos, pH 3,8 - 4,0 subir la temperatura **45°C**

marcha 10 minutos/hora nocturno

escurrir el baño y colocar sobre caballete cubierto.

#### IV- 2. Resultados de la evaluación de la resistencia fúngica en cueros wet-blue.

Condiciones de ensayo: Temperatura:  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Humedad: En saturación.

Cepas fúngicas utilizadas: *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*

**Resultados Tabla 1.** Evaluación de resistencia fúngica en Cámara Tropical. Norma ASTM D 3273-00.

Semana de Ensayo	Wet blue CONTROL (sin biocida)	Wet blue P1	Wet blue P2	Wet blue A1	Wet blue A2	Wet blue B1	Wet blue B2
1º semana	40%	S/C	S/C	40%	S/C	S/C	S/C
2º semana	80%	S/C	S/C	40%	S/C	S/C	S/C
3º semana	100%	S/C	S/C	80%	50%	40%	10%
4º semana	-----	S/C	S/C	80%	80%	60%	10%

Nota: S/C: Sin crecimiento fúngico en la probeta. %: Porcentaje de la superficie cubierta

**Resultados Tabla 2.** Evaluación de Resistencia Fúngica en Placa. Norma ASTM D 4576-08. Incubación 28°C. Lectura a 3, 7, 14, y 21 días. *Aspergillus spp.*

Días de Ensayo	Wet blue CONTROL (sin biocida)	Wet blue	Wet blue	Wet blue	Wet blue	Wet blue	Wet blue
		P1	P2	A1	A2	B1	B2
3	Crec. En periferia de la probeta	S/C Grado 0	S/C Grado 0	Crecimiento similar al control	Crecimiento similar al control	Crecimiento similar al control	Crecimiento similar al control
7	100% de sup. Cubierta Grado 4	S/C sobre la probeta Llega a los bordes Grado 0	S/C Grado 0	100% Grado 4	60% Grado 2	70% Grado 3	20% Grado 1
14	-----	60% Grado 3	40% Grado 1	100% Grado 4	100% Grado 4	100% Grado 4	50% Grado 2
21	-----	100% Grado 4	80% Grado 3	-----	-----	-----	100% Grado 4

**Notas:**

- ✓ S/C: Sin crecimiento fúngico en la probeta.
- ✓ %: Porcentaje de la superficie cubierta.
- ✓ Se adjunta CD- ROM con fotos de los ensayos.



## V. Interpretación de los resultados.

**Tabla 1:**

- ✓ El wet blue Control sin biocida y el Producto Comercial utilizados tanto como control positivo y negativo se comportaron satisfactoriamente para este ensayo.
- ✓ Comparando el desempeño del producto A respecto al blanco y el producto comercial, se observa que la concentración 1 y 2 del Producto, no alcanza a contener el crecimiento en la tercera semana. Tampoco es satisfactoria la protección en la cuarta semana., Donde la muestra de la concentración 2 siguió creciendo hasta el 80 %. Si, se aprecia que, la inhibición fúngica, estuvo en relación a las concentraciones elegidas. Recordemos que se recomienda que las muestras alcancen la cuarta semana sin crecimiento.
- ✓ Comparando el desempeño del producto B respecto al blanco y el producto comercial, se observa que la concentración 1 y 2 del Producto, funcionan diferentes ya que en la tercera semana la concentración 1 se alcanza el 40% y en la 2 el 10 %. También aquí se aprecia que, la inhibición fúngica, depende de las concentraciones elegidas.
- ✓ En la cuarta semana la concentración 2 logra mantener la inhibición, con un buen resultado del 10%, no así la concentración 1.

**Tabla 2:**

- ✓ Para la interpretación tomaremos el límite de lectura en los 7 días que es donde podemos apreciar diferencias entre los productos A y B, respecto al producto comercial y el blanco.
- ✓ Dentro de la comparación respecto a las placas testigo se observa diferencia entre los productos A y B. La concentración del producto B más baja se comporta de forma similar a la del producto A más alta. El producto B en la concentración mas alta obtiene un buen resultado respecto al A, pero sin alcanzar el del producto comercial, a la misma concentración.
- ✓ Asimismo, si se observa la lectura de los catorce días del Producto B conc. 2, se mantiene en un 50%, valor cercano al Producto comercial de la misma concentración. Lo cual se considera un buen resultado.

  
Lic. GABRIELA NUÑEZ  
Laboratorio de Microbiología

  
Ing. Dco. CARLOS S. CANTERA  
SUBDIRECTOR  
INTI - CUEROS