



RAN 6520/4

344293

P A T E N T E
D E
I N V E N C I O N

por «PROCEDIMIENTO PARA COMBATIR EL DETERIORO DE UNA COMPO-
SICION ACUOSA METABOLIZABLE», a favor de la firma suiza
L. GIVAUDAN & CIE. SOCIETE ANONYME, residente en
VERNIER-GENEVE (Suiza).

MEMORIA DESCRIPTIVA

Este invento se refiere a procedimiento y
composiciones para preservar los sistemas acuosos contra
la acción deletérea de las bacterias, los hongos y las
algas.

5. Es bien sabido que diversos sistemas acuosos
que contienen componentes metabolizables, ya sea en vesti-
gios o en cantidades importantes, son normalmente pasibles
de ataque y degradación por microorganismos. Ejemplos de
tales composiciones son los aceites para cortar metales,
10. las composiciones cosméticas, como lociones y cremas, la-
bones líquidos y detergentes, fuel oil, emulsiones textiles,



344293

emulsiones de latex y pinturas, aguas de refrigeración industrial, ceras de emulsión, agua utilizada en la fabricación de pulpa y de papel (la llamada "agua de elaboración", por ejemplo "agua blanca") y el agua de inundación utilizada en

5. los métodos de recuperación de aceites secundarios.

Se han propuesto muchos preservadores útiles para las composiciones expuestas al ataque indicado, pero los preservadores conocidos han dejado con frecuencia de suministrar protección satisfactoria o adolecen de otras desventajas, tales como inestabilidad, toxicidad, etc. Por ejemplo, muchos preservadores, tales como fenoles y compuestos amónicos cuaternarios, se inactivan por la presencia de surfactantes no iónicos en las formulaciones específicas.

10. Otros quedan prendidos en la fase oleosa de las formulaciones de aceite y agua y dejan de inhibir el desarrollo microbiano. Una deficiencia capital de muchos compuestos antimicrobianos es su escasa actividad contra los organismos principales de putrefacción, particularmente el *Pseudomonas aeruginosa* y el *Escherichia coli*.

20. Ahora hemos descubierto, sorprendentemente, que un grupo de compuestos, muchos de los cuales se conocen desde hace algún tiempo, satisfacen requerimientos inusuales para los preservadores. Aún más sorprendentemente, se ha comprobado que la eficacia del grupo de compuestos en cuestión es muchas veces la de los preservadores conocidos. En

25.



344293

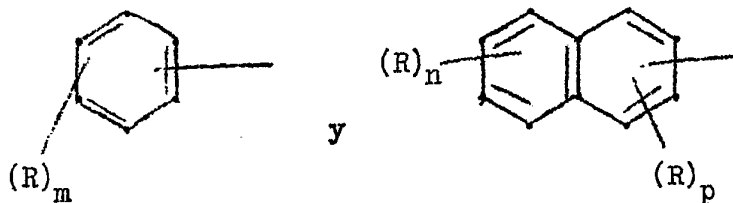
otras palabras, cantidades mucho menores de los compuestos de este invento, en comparación con las de los preservadores conocidos, sirven para obtener efectos de preservación equivalentes.

5. Los compuestos activos cuya utilidad se ha comprobado de acuerdo con este invento pueden representarse por la fórmula;

A - Z

10. en la que A es un miembro elegido en el grupo constituido por

15.

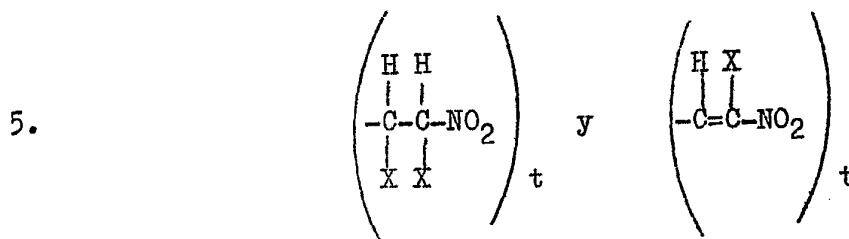


20. donde R es un miembro elegido en el grupo constituido por hidrógeno, halógeno, nitro, un radical alquílico con cinco átomos de carbono a lo sumo y un radical alcoílico con cinco átomos de carbono a lo sumo; m, n y p son números enteros por valor de 1 a 3, mientras la suma de n y p no



344293

excede de 3; y Z es un miembro elegido en el grupo constituido por



donde X es un halógeno, mientras que t es un número entero que no excede de 2.

Entre los compuestos activos de este invento

10. se incluyen los siguientes:

	<u>Compuesto</u>	<u>Nº de referencia</u>
	(1,2-dibromo-2-nitroetil)-benceno	I
	beta-bromo-beta-nitroestireno	II
	1-(1,2-dibromo-2-nitroetil)-4-clorobenceno	III
15.	beta-bromo-4-cloro-beta-nitroestireno	IV
	beta-bromo-2-cloro-beta-nitroestireno	V
	beta-bromo-3,4-dicloro-beta-nitroestireno	VI
	beta-bromo-beta,m-dinitroestireno	VII
	beta-bromo-beta,p-dinitroestireno	VIII
20.	1-(1,2-dibromo-2-nitroetil)-4-metilbenceno	IX
	beta-bromo-4-metil-beta-nitroestireno	X
	1-(1,2-dibromo-2-nitroetil)-4-metoxibenceno	XI



344293

	<u>Compuesto</u>	<u>Nº de referencia</u>
	beta-bromo-4-metoxi-beta-nitroestireno	XII
	beta-cloro-4-metil-beta-nitroestireno	XIII
	beta-cloro-4-metoxi-beta-nitroestireno	XIV
5.	2-bromo-1-(1-naftil)-2-nitroetileno	XV
	beta-bromo-5-tercibutil-4-metoxi-2-metil-betaonitroestireno	XVI
	1,4-bis(2-bromo-2-nitrovinil)-benceno	XVII

10. Aunque muchos de los compuestos activos de este invento no son compuestos nuevos, su potente acción preservadora no había sido revelada ni puesta de manifiesto en la literatura.

15. Los compuestos activos de este invento se preparan halogenando, y luego deshidrohalogenando, los respectivos beta-nitroestirenos y beta-nitrovinil-naftalenos. La halogenación se lleva a cabo por adición de cantidades equimolares de halógeno al beta-nitroestireno disuelto en un disolvente idóneo, tal como el cloroformo, a temperaturas desde 0° hasta la temperatura de reflujo, con agitación y por períodos de 15 minutos a 4 horas. Para formar los

20. compuestos activos insaturados, los dihalo-nitroetil-bencenos y -naftalenos resultantes se deshidrohalogenan en disolventes apropiados, tales como el cloroformo o el etanol, por adición de un agente deshidrohalogenante, como la piri-dina o el carbonato potásico, a temperatura desde la ambien-



344293

te hasta la de reflujo.

El método general de preparación se ilustra con el ejemplo siguiente:

- Se trató con 6,4 g (0,04 moles) de bromo una solución de 8,7 g (0,04 moles) de 3,4-dicloro-beta-nitroestireno en 50 cc de cloroformo. Se sometió la solución a reflujo durante una hora, se le añadieron 2,2 cc de piridina, se la volvió a someter a reflujo durante $\frac{1}{2}$ hora más, se la enfrió, se la extrajo con ácido clorhídrico diluido y luego con agua y se la secó sobre sulfato sódico. A continuación se evaporó el cloroformo y se recristalizó el residuo sólido en hexano, lo que dio beta-bromo-3,4-dicloro-beta-nitroestireno, de punto de fusión 75°-76°. (Calculado: C-32,4, H-1,4; hallado: C-32,6, H-1,6).
10. Utilizando el procedimiento anterior con 0,04 moles de 1-(1-naftil)-2-nitroetileno, se obtuvo 2-bromo-1-(1-naftil)-2-nitroetileno, de punto de fusión 94°-95°. (Calculado: C-51,8, H-2,9; hallado: C-52,0, H-3,1).
15. Utilizando el procedimiento anterior con 0,04 moles de 5-tercibutil-4-metoxi-2-metil-beta-nitroestireno, se obtuvo beta-bromo-5-tercibutil-4-metoxi-2-metil-beta-nitroestireno, de punto de fusión 118-119°. (Calculado: C-51,4, H-5,6; hallado: C-51,8, H-5,7).
20. Se ha comprobado que los compuestos activos de este invento son en general eficaces contra un amplio
- 25.



344293

espectro de microorganismos que atacan a los sistemas que contienen agua. Ejemplos de algunos de estos microorganismos son:

5. Bacterias gram-positivas:
Staphylococcus aureus
Staphylococcus epidermidis
Streptococcus faecalis
Streptococcus agalactiae
10. Bacterias gram-negativas:
Escherichia coli
Pseudomonas aeruginosa
Protens vulgaris
Aerobacter aerogenes
Salmonella typhosa
15. Levaduras:
Candida albicans
Saccharomyces cerevisiae
20. Mohos:
Penicillium piscarium
Penicillium funicolosum
Aspergillus niger
Aspergillus flavus
Trichophyton mentagrophytes



344293

Algas:

Chlorella vulgaris

Chlamydomonas pseudagloe

Scenedesmus naegeli

5. Cantidades pequeñas de los preservadores de este invento bastan para evitar la putrefacción de diversas composiciones por obra de bacterias, algas y hongos superiores. Cantidades tan bajas como 0,0001% a 0,05% en peso de la composición total han dado resultados satisfactorios. El uso de cantidades mayores, cuando es factible, se recomienda únicamente en composiciones de propiedades muy insólitas. Estos preservadores son activos tanto en medios ácidos como básicos y en presencia de cantidades importantes de sulfactantes no iónicos.
- 10.
15. Este invento puede llevarse a la práctica por adición de los preservadores a las composiciones de cualquier manera apropiada. Por ejemplo, la incorporación puede efectuarse, ya sea durante la preparación de la composición, ya sea después de preparada ésta. En el caso de los sistemas de aceite-en-agua, los preservadores pueden disolverse al principio en la fase oleosa, antes de la preparación del producto final, o añadirse directamente a la composición emulsionada definitiva. Los preservadores pueden añadirse a los productos ya sea directamente, ya sea en forma de
20. una solución en un disolvente apropiado, tal como acetona,
- 25.



344293

alcohol, benceno, tetracloruro de carbono etc.

EJEMPLO 1

Para ilustrar la eficacia de los compuestos activos de este invento en calidad de preservadores para las emulsiones de aceite para cortar metales, se efectuó el estudio bacteriológico siguiente: se prepararon, para ser evaluadas, series de cada compuesto en dilución seriada en disolvente. Una alícuota de 0,1 cc de la dilución seriada se añadió a 12 cc de aceite diluido al 1-100. Las diluciones de aceite se hicieron en agua destilada que contenía 0,1% de peptona para asegurar el buen desarrollo del organismo de ensayo. El aceite utilizado fue Kutwell 30 (marca registrada), fabricado por la Humble Oil & Refining Co. Este aceite es una solución refrigerante de lubricante sulfonado emulsionable, utilizado en el torneado, el corte y el amolado de metales. Se inocularon muestra con una gota (0,05 cc) de un caldo de cultivo de 24 horas de Ps. aeruginosa, diluido al 1-10 en agua destilada estéril e incubado a 28°C en un sacudidor mecánico. La supervivencia del inóculo se determinó en intervalos semanales por un tiempo total de cuatro semanas. Las muestras se reinocularon al ser examinadas, de modo que cada preparación había experimentado cuatro inoculaciones al final de la cuarta semana. La superviven-

=10 =



344293

- cia del inóculo se determinó extendiendo una asa de 4 mm (0,01cc) de emulsión sobre la superficie de tripticasa-extracto de glucosa-agar que contenía 0,005% de cloruro de trifeniltetrazolio. Las placas estériles se consideran como
5. protección del sistema, y se registró la concentración inhibidora correspondiente del compuesto de ensayo.

- La tabla I presenta los resultados de la prueba anterior con los compuestos I a XV antes citados. Los compuestos XVI y XVII antes citados manifiestan en
10. esencia la misma actividad que el compuesto IV.



344293

TABLA I

Concentración de los compuestos de ensayo necesaria
para la inhibición completa del Ps. aeruginosa en
emulsión de aceite para cortar metales (mcg/cs)

	<u>Compuesto N°</u>	<u>Semana 1</u>	<u>Semana 2</u>	<u>Semana 3</u>	<u>Semana 4</u>
5.	I	1,9	7,8	31,25	31,25
	II	1,9	1,9	7,8	7,8
	III	0,95	0,95	1,9	1,9
	IV	1,9	1,9	3,9	15,6
10.	V	1,9	3,9	3,9	3,9
	VI	7,8	15,6	3,9	7,8
	VII	0,95	0,95	0,95	0,95
	VIII	0,95	0,95	0,95	1,9
	IX	1,9	3,9	3,9	15,6
15.	X	0,95	1,9	1,9	1,9
	XI	0,95	0,95	1,9	1,9
	XII	0,95	1,9	1,9	1,9
	XIII	250	125	125	125
	XIV	250	250	250	250
20.	XV	15,6	17,8	3,9	3,9



344293

EJEMPLO 2

- El deterioro de los adhesivos (particularmente de los adhesivos a base de almidón) que no contienen preservadores es corriente en la práctica. La eficacia como adhesivo a base de almidón se demostró por inoculación de una solución al 6% de almidón de maíz, parcialmente hidrolizado por mantenimiento a 100° C durante cinco minutos. Con el fin de asegurar el buen desarrollo de los organismos de ensayo, se reforzó la base de almidón con nutrientes, para que contuviera 0,1% de extracto de malta y 0,1 de peptona. Se añadieron también oligoelementos (véase "Theory and Practice in Experimental Bacteriology", de G.C. Meynell y colaboradores, Cambridge University Press, 1965, página 33) para reforzar la producción de conidios en el caso de los hongos superiores. Los compuestos se añadieron al substrato pesándolos directamente en un recipiente estéril seco, seguido por adición de 0,5 cc de dimetilformamida para disolver el compuesto. Se agregaron luego 50g de adhesivo nutriente, a 60°C, se mezcló para distribuir el compuesto y se vertieron cuatro alícuotas iguales en cuatro recipientes estériles. Cada preparación de muestra se inoculó luego con Ps.aeruginosa, Bacillus subtilis (esporas), Aspergillus niger y Penicillium piscarium. La gama de concentración del compuesto examinada fue la de 0,2 a 0,05% en peso.
- 5.
 - 10.
 - 15.
 - 20.
 - 25.



= 13 =

344293

- Las observaciones para determinar la protección del substrato en examen contra el desarrollo de los organismos, salvo el Ps. aeruginosa, se realizaron macroscópicamente al final de cuatro semanas de incubación. El deterioro por otra del B. subtilis se reconoció por hidrólisis del substrato y producción de pigmento amarillo. El P. piscarium producto abundante desarrollo de micelio; el A. niger produjo abundante desarrollo de micelio así como hidrólisis del substrato. La presencia del Ps. aeruginosa se determinó extendiendo substrato sobre la superficie de placas de triplicasa-extracto de glucosa-agar que contenía 0,005% de cloruro de trifeniltetrazolio. Las respuestas se registraron al final del período de incubación y se halló que todos los compuestos activos de este invento (Iaa XVII) eran eficaces a la concentración de 0,05%, la más baja que se ensayó.

EJEMPLO 3.

- Los productos cosméticos, en particular los que contienen agentes emulgentes no iónicos, son muy sensibles al desarrollo de microorganismos. El Ps. aeruginosa se halla con frecuencia como contaminante de lociones cosméticas, lo mismo que otros hongos superiores; sin embargo, el primero puede considerarse como un peligro en potencia para la salud del usuario de los productos contaminados. Los com-

= 14 =

344293



- puestos en examen ofrecen un recurso para impedir el desarrollo del Ps. aeruginosa, así como el de los hongos superiores, en los productos cosméticos. Para demostrar este punto, se posaron los compuestos directamente en recipientes estériles. Se añadieron para disolver el compuesto 6 g de base oleosa de la composición que se expone más abajo, sin el agua, se calentó a 50°C y se añadieron a la base 94 cc de agua destilada, a 50°C. Para asegurar el buen desarrollo de todos los organismos de ensayo, se fortificó con nutriente la emulsión definitiva de manera que contuviera 0,1% de peptona y 0,1% de extracto de malta. Se agregaron también oligoelementos, como en el ejemplo 2, para reforzar la producción de conidios. La composición de la emulsión definitiva fue la siguiente:
5. 15. 1,4 g de ácido esteárico
 2,3 g de aceite mineral

 0,7 g de monoestearato de sorbitán
 1,6 g de monoestearato de polioxietilen-sorbitán
 94,0 g de agua destilada.
20. La loción a 50°C se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente y se vertieron alícuotas iguales en cuatro recipientes estériles. Cada recipiente se inoculó con su respectivo organismo de ensayo. Unas preparaciones de muestra se inocularon con Ps. aeruginosa, A. niger, A. flavus y P. piscarium.

344293



- Las observaciones para determinar la protección del substrato en examen se efectuaron en intervalos de una semana. Salvo para el Ps. auruginosa, todas las observaciones fueron macroscópicas y el fallo en la protección del substrato se comprobó por el abundante desarrollo de micelios y de conidios. La presencia o ausencia de Ps. aeruginosa se determinó extendiendo una asa de 4 mm sobre la superficie de placas de tripticasa-extracto de glucosa-agar que contenía 0,005% de cloruro de trifenil-tetrazoilo.
- 5.
10. Las respuestas se registraron a la concentración más baja del compuesto de ensayo (0,2, 0,1 y 0,05% (que impartió protección al substrato al terminarse la prueba al final de cuatro semanas de incubación. Todos los compuestos (I a XVII) resultaron eficaces a la concentración más baja ensayada, o sea la de 0,05%.
- 15.

EJEMPLO 4

- El desarrollo microbiano en los sistemas de fuel-oil que da por resultado la formación de cieno en la fase acuosa en el fondo de los depósitos ha sido una preocupación para la industria del petróleo. Se ha atribuido la responsabilidad en particular a las bacterias gram-negativas y además se conocen bacterias oxidantes de los hidrocarburos que conducen a la degradación de éstos.
- 20.



344293

- La inhibición del desarrollo del Ps. aeruginosa en un sistema bifásico de aceite-agua se demostró incorporando el compuesto nº II al aceite. Se realizaron diluciones en serie del aceite para establecer concentraciones descendentes dobles del compuesto en el aceite. Luego se añadieron alícuotas de 5 cc de aceite que contenía el compuesto a 20 cc de terreno de Bushnell-Haas (J. Bact. 41 (5), 653-673, 1941). Se inocularon muestras con una gota (0,05 cc) de una dilución al 1/1000 en agua destilada de un
5. caldo de cultivo de 24 horas de Ps. aeruginosa. Las observaciones respecto a la supervivencia se realizaron al final de 20 días de incubación a 28°C; por extensión de la fase acuosa sobre la superficie de placas de tripticasa-extracto de glucosa-agar que contenían 0,005% de cloruro de trifenil-tetrazolio. Todos los controles
10. demostraron el aislamiento del organismo de ensayo. Ninguna muestra provista del compuesto nº II permitió la supervivencia del organismo. La gama de concentración ensayada fue de 312 mcg/ml a 1,25 mcg/ml en el aceite.
- 15.

EJEMPLO 5.

20. El grado de actividad de estos compuestos contra las algas unicelulares es tal, que resultan de utilidad en los sistemas de agua industriales en los que las algas plantean problemas. La actividad contra la Chlorella vulgaris se determinó por inoculación de caldo de peptona-glucosa-



sa que contenía el compuesto en concentraciones de 10 a menos de 5 mcg/ml. Las muestras de caldo inoculadas se incubaron durante 30 días a 25°C sobre iluminación de 150 pies-bujías. El criterio de respuesta se registró como

5. desarrollo o inhibición completa al final del período de incubación. Los compuestos se añadieron al caldo a partir de una solución alcohólica (metanol) del compuesto de ensayo. Todos los compuestos ensayados (I a XVII) dieron la inhibición completa a las bajas concentraciones de ensayo

10. EJEMPLO 6.

Las bacterias reductoras de los sulfonatos han constituido una preocupación en las operaciones de agua de inundación empleadas en la recuperación de aceites secundarios. Estos organismos producen cantidades de sulfuro de

15. hidrógeno a base del metabolismo del sulfato, lo que da por resultado la formación del sulfuro férrico, en los estratos de arena, suficiente para reducir el caudal de paso del agua. Todos los compuestos ensayados (Ia a XVII) inhiben la formación de sulfuro férrico por obra del Desulfovibrio

20. desulfuricans a concentración de 50 mcg/ml o menos.



344293

EJEMPLO 7.

Las emulsiones acrílicas son generalmente muy sensibles al desarrollo de bacterias gram-negativa. Los compuestos I a XVII sirven eficazmente para

5. reducir o eliminar la contaminación bacteriana gram-negativa en los sistemas de emulsiones acrílicas. Por ejemplo, se depositó el compuesto nº II, en concentraciones diversas, en emulsión acrílica "Rhoplex B-15" (Rohm & Haas Co.) y se inoculó con Ps. aeruginosa y Escherichia coli.
10. Se depositaron las muestras en un sacudidor mecánico y se las incubó a 28°C. Las bacterias sobrevivientes se determinaron al cabo de 5 días de incubación, extendiendo una asa de 4 mm sobre la superficie de placas de tripticasa-extracto de glucosa-agar. No se recuperaron bacterias
15. de las muestras de emulsión, que contenían 37,5 mcg/ml en el caso de la Ps. aeruginosa, ni de las muestras que contenían 75 mcg/ml en el caso del E. coli.

- Se entiende que la calificación de "acuosas" que aquí se emplea para denotar composiciones que pueden
20. preservarse conforme a este invento, se utiliza en sentido amplio y no se limita a las soluciones, sino que incluye también suspensiones, emulsiones y todas las composiciones que contienen agua en cantidad suficiente para que las composiciones resulten sensibles al ataque degradante de los
 25. microorganismos.



= 19 =

344293

Lo que antecede ilustra la práctica de este invento, el cual sin embargo, no está limitado por ello sino que debe entenderse en toda la amplitud permisible en vista de la práctica anterior y limitando únicamente por

5. las reivindicaciones adjuntas.

= . =

= 20 =

344293



NOTA

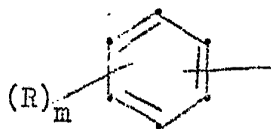
Descrito el objeto del presente invento se declaran nuevas y de propia invención las siguientes reivindicaciones, con prioridad de la solicitud de patentes estadounidense serial nº 573.845 del 22.8.66

5. 1. Procedimiento para combatir el deterioro de una composición acuosa metabolizable, normalmente expuesta a deterioro por obra de las bacterias, los hongos y las algas, caracterizado por incorporarse a dicha composición una cantidad pequeña de un compuesto representado por la fórmula:
10. fórmula:

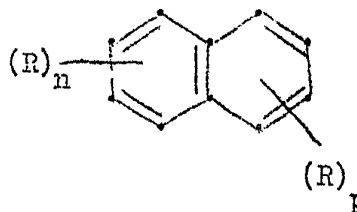
A - Z

en la que A es un miembro elegido en el miembro constituido por

15.



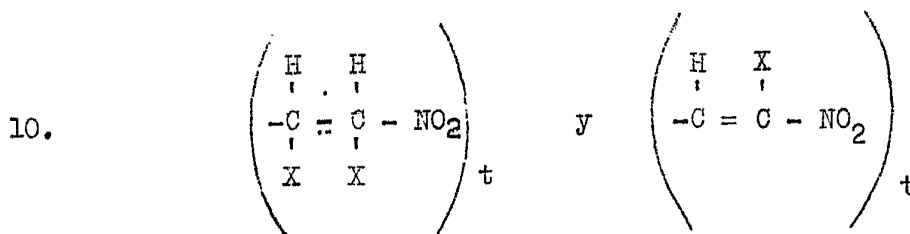
y





344293

- donde R es un miembro elegido en el grupo constituido por hidrógeno, halógeno, nitro, un radical alquílico con cinco átomos de carbono a lo sumo y un radical alcoxílico con cinco átomos de carbono a lo sumo; m, n y p son números enteros por valor de 1 a 3 y la suma de n + p no excede de 3; y Z es un miembro elegido en el miembro constituido por
- 5.



donde X es un halógeno y t es un número entero que no excede de 2.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado en que el compuesto en cuestión es el beta-bromo-beta-nitroestireno.
- 15.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado en que el compuesto en cuestión es el beta-bromo-4-cloro-beta-estireno.

- 20.
4. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado en que el compuesto en cuestión es el beta-bromo-2-cloro-beta-nitroestireno.

= 22 =

344293



5. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado en que el compuesto en cuestión es el beta-bromo-beta,m-dinitroestireno.
6. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado en que el compuesto en cuestión es el beta-bromo-beta ,p-dinitroestireno.
7. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado en que el compuesto en cuestión es el beta-bromo-4-metil-beta-nitroestireno.
10. 8. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado en que el compuesto en cuestión es el beta-bromo-4-metoxi-beta-nitroestireno.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado en que el sistema metabolizable es un sistema de aceite/agua.
15. 10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado en que la composición metabolizable es un aceite para cortar metales.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado en que la composición metabolizable es agua de elaboración utilizada en la fabricación de papel.
- 20.



344293

12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado en que la composición metabolizable es agua de inundación utilizada en la recuperación de aceite secundario.
5. 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado en que la composición metabolizable es una composición cosmética.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado en que la composición metabolizable es una pintura de emulsión.
10. 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado en que la composición metabolizable es agua de refrigeración industrial.
16. Procedimiento para combatir el deterioro de una composición acuosa metabolizable.
- 15.

Según se describe y reivindica en la presente memoria descriptiva que consta de 23 hojas foliadas y escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, a 21 de Agosto de 1967
p.a.

JAI ME IBERIA
13 11

Firmado: JUAN ROBLES