



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 343 773**

② Número de solicitud: 200803184

⑤ Int. Cl.:
C12P 7/62 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **07.11.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **09.08.2010**

Fecha de la concesión: **13.06.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **24.06.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
24.06.2011

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Torres Salas, Pamela;
Ballesteros Olmo, Antonio y
Plou Gasca, Francisco José**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

㉑ Título: **Procedimiento enzimático para la acilación en posición 3- del resveratrol.**

㉒ Resumen:

Procedimiento enzimático para la acilación en posición 3- del resveratrol.

Procedimiento enzimático para la acilación regioselectiva del resveratrol en su posición 3-, utilizando un éster vinílico y lipasas fúngicas y bacterianas específicas, inmovilizadas, como biocatalizador. Las lipasas utilizadas en dicho procedimiento, proceden de bacterias u hongos que se seleccionan de entre *Alcaligenes*, *Pseudomonas* o *Thermomyces*.

ES 2 343 773 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento enzimático para la acilación en posición 3- del resveratrol.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento enzimático de acilación regioselectiva en posición 3 del resveratrol y en un solo paso utilizando un éster vinílico y una lipasa inmovilizada como biocatalizador. Dadas las variadas aplicaciones de los antioxidantes, la invención puede englobarse dentro del campo de la industria biotecnológica y, en particular, en el sector farmacéutico, industrias de alimentos funcionales, nutracéuticos o cosméticos.

10 **Estado de la técnica**

En los últimos años, diferentes estudios han evidenciado el efecto beneficioso para la salud que se deriva de la ingesta de alimentos de origen vegetal (frutas, hortalizas, aceite de oliva virgen, vino tinto, té, etc). Las propiedades saludables que ejercen estos alimentos van más allá de las que cabría esperar por sus nutrientes, vitaminas y sales minerales, por lo que se ha postulado que se deben a los metabolitos secundarios que contienen, ocupando un lugar destacado entre éstos los polifenoles. De las diferentes actividades biológicas de los polifenoles, la antioxidante es la que ha suscitado mayor interés puesto que los antioxidantes se usan para contrarrestar los efectos de los procesos oxidativos *in vivo*, que se han relacionado entre otros con algunas enfermedades inflamatorias, cardiovasculares, cáncer o incluso del envejecimiento (Y.Z. Fang *et al.*, “Free radicals, antioxidants, and nutrition”, Nutrition 2002, vol. 18, pp. 872-879).

Entre los compuestos polifenólicos es muy destacable el caso del resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno), producto natural presente en la uva. Se ha descrito que el resveratrol puede interferir de manera crítica en multitud de eventos asociados al desarrollo de enfermedades degenerativas, incluyendo las cardiovasculares y el cáncer (A.R. Martin *et al.*, “Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats”, Biochem. Pharmacol. 2004, vol. 67, pp. 1399-1410; J.M. Wu *et al.*, “Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review)”, Int. J. Mol. Med. 2001, vol. 8, pp. 3-17).

En general, las propiedades deseables en los compuestos antioxidantes para ser empleados como aditivos promotores de la salud son: capacidad captadora de radicales libres, estabilidad y biodisponibilidad. El principal problema del uso de los compuestos fenólicos es su baja estabilidad y/o la modificación que sufren *in vivo* en procesos de detoxificación, donde las agrupaciones más antioxidantes, como por ejemplo la orto-dihidroxílica, son bloqueadas. Por tanto, es necesario encontrar compuestos que sean suficientemente estables tanto a temperatura ambiente como a la temperatura del organismo, y que sean funcionales el tiempo suficiente antes de ser degradados y/o metabolizados. Una de las aproximaciones que se ha utilizado para aumentar la estabilidad del resveratrol, sin disminuir su actividad biológica, es la preparación de derivados modificados con un resto glucosilo o con una cadena lipofílica (V. Cardile *et al.*, “Chemoenzymatic synthesis and cell-growth inhibition activity of resveratrol analogues”, Bioorg. Chem. 2005, vol. 33, pp. 22-33; F. Orsini *et al.*, “Isolation, synthesis, and antiplatelet aggregation activity of resveratrol 3-O- β -D-glucopyranoside and related compounds”, J. Nat. Prod. 1997, vol. 60, pp. 1082-1087; y G. Regev-Shoshani *et al.*, “Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation”, Biochem. J. 2003, vol. 374, pp. 157-163).

Por otro lado, resulta muy interesante intentar modular la biodisponibilidad de los antioxidantes por la adición de una cadena lipofílica, estrategia que permite de manera sencilla modificar su balance hidrófilo-lipófilo. Estos derivados acilados mantienen la estabilidad del antioxidante, son solubles en medios grasos y además suelen ser muy permeables en modelos de células de piel humana (A. Tai *et al.*, “Permeation and metabolism of a series of novel lipophilic ascorbic acid derivatives, 6-O-acyl-2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acids with a branched-acyl chain, in a human living skin equivalent model” Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004, vol. 14, pp. 623-27). Dichas modificaciones pueden ejercer un papel crítico en cuanto a tiempo de residencia en el organismo, grado de metabolismo, eficacia en la absorción, y en definitiva, efectividad como nuevos posibles antioxidantes.

Además, modificaciones químicas mínimas en el núcleo estilbeno del resveratrol pueden causar grandes cambios en su actividad biológica y, más concretamente, en sus propiedades antitumorales (R. Chillemi *et al.*, “Anti-tumor properties of stilbene-based resveratrol analogues: Recent results”, Nat. Prod. Commun. 2007, vol. 2, pp. 499-513). Así, algunos derivados de resveratrol con cadenas acilo han mostrado mayor inhibición sobre el crecimiento celular de células de cáncer de próstata DU-145 que el propio resveratrol (V. Cardile *et al.*, “Chemo-enzymatic synthesis and cell-growth inhibition activity of resveratrol analogues”, Bioorg. Chem. 2005, vol. 33, pp.22-33).

Es, por tanto, deseable disponer de procedimientos sencillos para la lipofilización de antioxidantes naturales para otorgarles mayor estabilidad y/o biodisponibilidad. La lipofilización por métodos enzimáticos (generalmente empleando el catalizador enzimático en forma inmovilizada sobre soportes que incrementan su resistencia mecánica y térmica) ofrece rendimientos y selectividades muy notables, lleva implícitas mejoras medioambientales, y ofrece la posibilidad de trabajar en condiciones suaves de operación (temperaturas bajas y presión atmosférica) lo que disminuye el consumo energético, dando lugar a una importante reducción de los costes. Debido al enorme interés de los derivados de antioxidantes naturales como sustancias terapéuticas, ingredientes funcionales, nutracéuticos o agentes cosméticos, se han postulado los métodos enzimáticos como una alternativa “sostenible” para la producción de los mismos.

Cuando se hace reaccionar un compuesto polifenólico con un donador de acilo en presencia de una enzima, la posición o posiciones de acilación pueden variar sustancialmente en función del biocatalizador ensayado, pudiendo, en principio, tener lugar sobre cualquiera de los grupos OH fenólicos. Así, en el caso del resveratrol, que presenta tres grupos fenólicos (en las posiciones 3-, 4'- y 5- del núcleo estilbeno) con una reactividad química similar, se ha descrito que la reacción con acetato de vinilo en presencia de la lipasa B de *Candida antarctica* da lugar selectivamente a 4'-O-acetil-resveratrol con un rendimiento del 50% (R.W. Teng *et al.*, "Regioselective acylation of several polyhydroxylated natural compounds by *Candida antarctica* lipase", Biocatal. Biotransform. 2005, vol. 23, pp. 109-116). No obstante, al aumentar la longitud de cadena del ácido graso la velocidad de reacción disminuye notablemente. Sin embargo, es difícil obtener una esterificación enzimática selectiva en el grupo fenólico en posición 3- (equivalente a la posición 5- al tratarse de una molécula simétrica) debido probablemente a las dificultades de acilar selectivamente el grupo fenólico más impedido estéricamente en la molécula. La obtención de este producto acetilado en posición 3- está descrita mediante una esterificación quimioenzimática. En ese caso se realiza inicialmente una peracetilación química, seguida de una alcoholisis regioselectiva catalizada por la lipasa B de *Candida antarctica*. Con este mismo procedimiento también se obtiene el diacetato de resveratrol en los grupos fenólicos de las posiciones 3,5- a tiempos más cortos de reacción (G. Nicolosi *et al.*, "Chemo-enzymatic preparation of resveratrol derivatives", J. Mol. Catal. B Enzym. 2002, vol. 16, pp. 223-229).

Explicación de la invención

La presente invención se refiere a la modificación enzimática del antioxidante, natural o sintético, resveratrol mediante acilación regioselectiva en la posición 3-, utilizando un éster vinílico, preferiblemente de ácidos grasos de distinta longitud de cadena. Concretamente las enzimas utilizadas, como biocatalizadores, son lipasas inmovilizadas. La acilación con ácidos grasos puede minimizar la oxidación y fotodestrucción del resveratrol, aumentar su tiempo de vida y mejorar su biodisponibilidad., además de aumentar sus propiedades biológicas (por ejemplo, como antitumoral).

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de acilación del resveratrol, caracterizado porque comprende la incubación de resveratrol con un éster vinílico (C₂-C₂₆) en presencia de una lipasa inmovilizada, donde dicha lipasa procede de bacterias o de hongos que se seleccionan de la lista que comprende bacterias u hongos del genero *Alcaligenes*, *Pseudomonas* o *Thermomyces*.

Como agente acilante, en el procedimiento de la invención, se utiliza un éster vinílico, donde el número de átomos de carbono del éster puede ser de entre 2 y 26. Preferiblemente el éster vinílico es un acetato de vinilo o un éster vinílico de un ácido graso de distinta longitud de cadena, donde el número de carbonos puede ser de entre 4 a 26, más preferiblemente el número de átomos de carbono del éster del ácido graso es de entre 16 y 22, aún más preferiblemente es estearato de vinilo.

En otra realización preferida del procedimiento de la invención la lipasa inmovilizada procede la especie *Alcaligenes sp.*, *Pseudomonas cepacia* o *Thermomyces lanuginosus*.

La lipasa es inmovilizada en cualquier medio conveniente y conocido por un experto en la materia, como por ejemplo pero sin limitarse a sílice, alúmina, vidrio de poro controlado o tierra de diatomeas, preferiblemente la lipasa es inmovilizada en tierra de diatomeas.

Normalmente la solución de resveratrol (procedente de, por ejemplo pero sin limitarse a la planta *Polygonum cuspidatum*) se prepara en ausencia del disolvente, empleando el éster vinílico que actúa como disolvente (o medio de reacción) y que es donador de acilo al mismo tiempo.

Sin embargo, en una realización particular de la invención, se puede preparar, previamente a la incubación del resveratrol, una solución de resveratrol en un disolvente de polaridad intermedia, que constituye el medio de reacción.

Por "disolvente de polaridad intermedia" se entiende en la presente invención a un disolvente con una polaridad media de $2 < \log P' < 4$, donde P' es el índice desarrollado por L.R. Synder. Como ejemplos, pero sin limitarse, estos disolventes se pueden seleccionar de la lista que comprende 2-metil-2-butanol, tert-butanol, éter isopropílico o 2-pentanona.

Al medio de reacción que contiene el disolvente de polaridad intermedia se puede añadir agua en una proporción inferior al 0.2% (w/v) del disolvente.

Cualquiera de las mezclas anteriores se calienta a una temperatura comprendida en el intervalo entre 25 y 65°C, más preferiblemente entre 30°C y 50°C, y se añade como catalizador una lipasa bacteriana (preferentemente lipasas de *Alcaligenes sp.* o de *Pseudomonas cepacia*) o fúngica (preferentemente lipasa de *Thermomyces lanuginosus*) inmovilizada (preferentemente en tierra de diatomeas). De manera preferible la adición de la enzima se realiza en una proporción de 50-150 mg por ml de disolución, que corresponde a 30-600 unidades (U) de actividad de hidrólisis de tripropionina por ml de disolución, definiendo una unidad de actividad como la que cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato por minuto. El sistema se mantiene entre 8 y 72 horas, dependiendo de la longitud de cadena del ácido graso, o del éster en general, y del grado de sustitución deseado, preferentemente la incubación se lleva a cabo con agitación orbital y más preferiblemente a una agitación de entre 100 rpm y 250 rpm. En estas condiciones el producto mayoritario es el éster de resveratrol en la posición 3-.

5 Cuando se emplean como donadores de acilo otros compuestos como triglicéridos, ésteres etílicos o ácidos grasos libres, manteniéndose todas las condiciones anteriormente descritas, la reacción de acilación no tiene lugar. Asimismo, cuando se emplean otras enzimas como la lipasa B de *Candida antarctica* y la lipasa de *Rhizomucor miehei*, manteniéndose todas las condiciones anteriormente descritas, se obtiene mayoritariamente el producto acetilado en el grupo fenólico de la posición 4'-, en una proporción molar respecto al 3-O-acetil-resveratrol 2.5:1 y 2:1, respectivamente.

10 El seguimiento de la reacción de la presente invención se puede llevar a cabo por cromatografía en capa fina o por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa (utilizando un detector de fotodiodos y un detector evaporativo de dispersión de luz).

15 Otro aspecto de la invención se refiere a los productos de la reacción enzimática. Así, una vez completada la reacción, se elimina la fase orgánica por evaporación a presión reducida, y el residuo obtenido se purifica. Por ejemplo, mediante HPLC semipreparativa o bien por cromatografía preparativa de gel de sílice eluyendo con heptano:acetato de etilo (en una proporción dependiente de la longitud del ácido graso). Los inventores han caracterizado los productos sintetizados estructuralmente mediante resonancia magnética-nuclear y espectrometría de masas.

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

25 Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra un cromatograma en HPLC de la reacción de acetilación de resveratrol en 2-metil-2-butanol catalizada por la lipasa de: (I) *Alcaligenes sp.* inmovilizada en tierra de diatomeas, (II) *Pseudomonas cepacia* inmovilizada en tierra de diatomeas, y (III) *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada por granulación con sílice. (1) Resveratrol; (2) 3-O-acetil-resveratrol; (3) 4'-O-acetil-resveratrol; (4) 3,5-di-O-acetil-resveratrol; (5) 3,4'-di-O-acetil-resveratrol.

30 Fig. 2. Muestra un cromatograma en HPLC semipreparativa de la reacción de acetilación de resveratrol en 2-metil-2-butanol anhidro catalizada por la lipasa de *Alcaligenes sp.* inmovilizada en tierra de diatomeas. Se utilizó un detector de fotodiodos y cuantificación a 308 nm. (1) Resveratrol; (2) 3-O-acetil-resveratrol; (3) 4'-O-acetil-resveratrol; (4) 3,5-di-O-acetil-resveratrol (5) 3,4'-di-O-acetil-resveratrol; (6) 3,4',5-tri-O-acetil-resveratrol.

35 Fig. 3. Muestra la cinética de la reacción de acetilación de resveratrol en 2-metil-2-butanol catalizada por la lipasa de *Alcaligenes sp.* inmovilizada en tierra de diatomeas. Se representan las distintas concentraciones (mM) de 3-O-acetil-resveratrol (●); 3,4'-di-O-acetil-resveratrol (○); y 3,4,5-tri-O-acetil-resveratrol (◇).

40 Fig. 4. Muestra un cromatograma en HPLC de la reacción de acilación de resveratrol con estearato de vinilo en 2-metil-2-butanol, catalizada por la lipasa de: (I) *Alcaligenes sp.* inmovilizada en tierra de diatomeas, (II) *Pseudomonas cepacia* inmovilizada en tierra de diatomeas, y (III) la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada por granulación. Se utilizó un detector de fotodiodos y cuantificación a 308 nm. Se indican los máximos correspondientes al 3-O-acetil-resveratrol (7) y al 4'-O-acetil-resveratrol (8).

45 Fig. 5. Muestra la cinética de la reacción de acilación de resveratrol con estearato de vinilo en 2-metil-2-butanol catalizada por la lipasa de *Alcaligenes sp.* inmovilizada en tierra de diatomeas. Se representa la concentración (mM) de 3-O-estearil-resveratrol producida en distintos intervalos a lo largo de una reacción de 167 horas.

50 Ejemplos de realización

A continuación se detallan los materiales y métodos que fueron empleados para el desarrollo de la presente invención, así como ejemplos de realización de la misma. Dichos ejemplos no limitan la invención, sino que su finalidad es ilustrarla, poniendo de manifiesto la capacidad de síntesis en un solo paso de 3-O-acil-resveratrol siguiendo el procedimiento descrito en esta memoria.

Ejemplo 1

60 Síntesis de 3-O-acetil-resveratrol con diferentes lipasas

Se pesaron 5.8 mg de resveratrol y se disolvieron en 0.5 ml de 2-metil-2-butanol anhidro (contenido en agua inferior al 0.2%). La solución se calentó a 40°C, y se añadieron 35 µl de acetato de vinilo (relación molar acetato de vinilo: resveratrol 15:1). A la mezcla se añadieron 100 mg de lipasa de diferentes organismos: 1) *Alcaligenes sp.* inmovilizada (QLG, Meito Sangyo Co., Ltd.); 2) *Pseudomonas cepacia* inmovilizada (PS "Amano" IM, Amano Enzyme Europe Ltd.); 3) *Thermomyces lanuginosus* inmovilizada (Lipozyme TL IM, Novozymes A/S). La mezcla se incubó a 40°C con agitación orbital a 150 rpm durante aproximadamente 9 días, tras lo cual se enfrió. La reacción se siguió por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, utilizando un detector de fotodiodos

y cuantificación a 308 nm. En estas condiciones se obtuvieron las siguientes composiciones de reacción, (calculadas por HPLC), según la lipasa utilizada (Figura 1): I) 24.4% de 3-O-acetil-resveratrol, 1.3% de 4'-O-acetil-resveratrol, 70.3% de 3,4'-di-O-acetil-resveratrol, 3.7% de 3,5-di-O-acetil-resveratrol (la relación molar 3-O-acetil-resveratrol: 4'-O-acetil-resveratrol es de 18:1); II) 24.9% de 3-O-acetil-resveratrol, 10.2% de 4'-O-acetil-resveratrol, 54.8% de 3,4'-di-O-acetil-resveratrol y 7.5% de 3,5-di-O-acetil-resveratrol (la relación molar 3-O-acetil-resveratrol: 4'-O-acetil-resveratrol es de 2.5:1); y III) *Thermomyces lanuginosus*: 35.5% de 3-O-acetil-resveratrol, 21.3% de 4'-O-acetil-resveratrol, 28.7% de 3,4'-di-O-acetil-resveratrol y 0.3% de 3,5-di-O-acetil-resveratrol (la relación molar de síntesis 3-O-acetil-resveratrol: 4'-O-acetil-resveratrol es de 1.5:1).

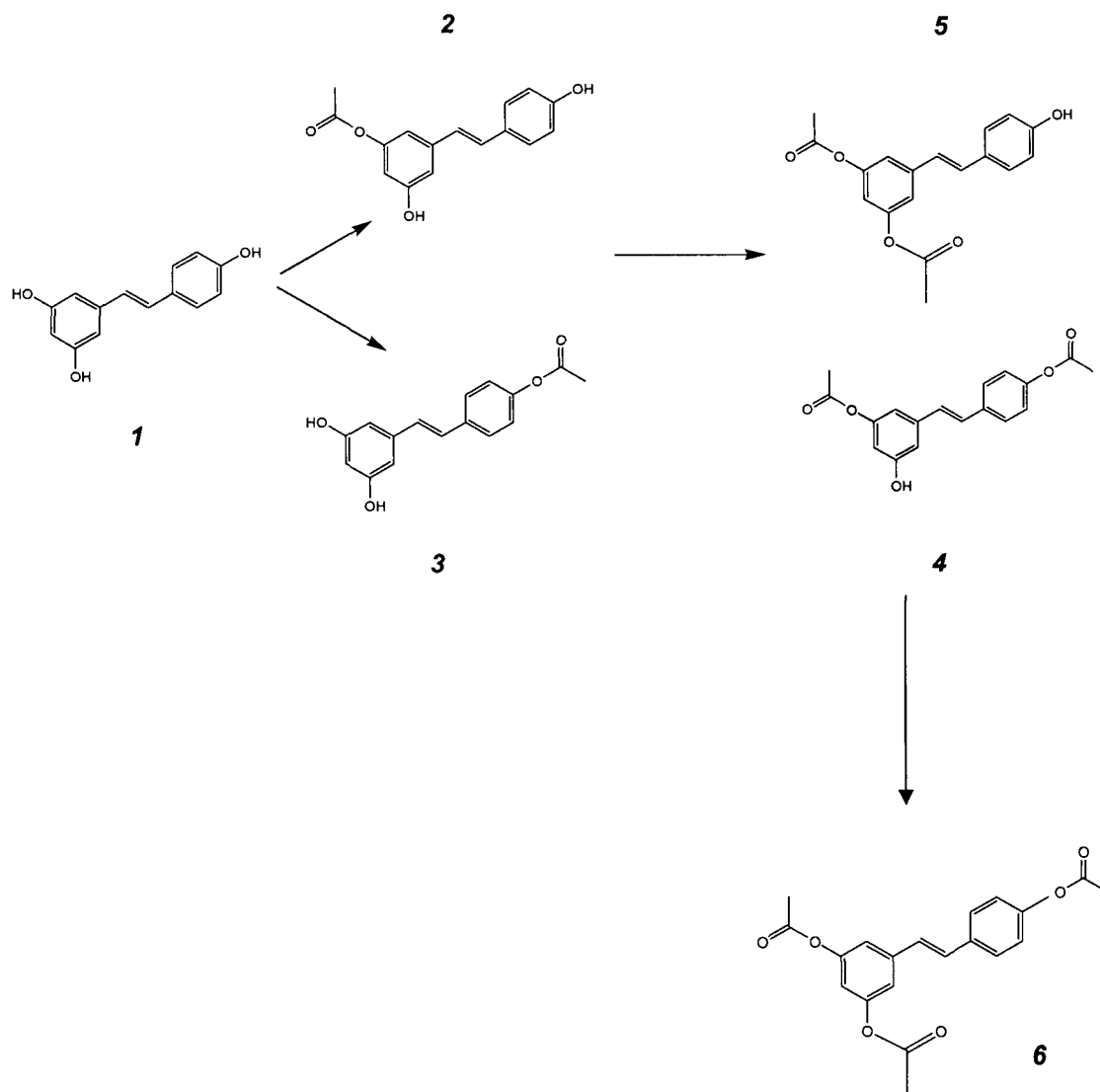
En esta figura 1 se indican los máximos correspondientes a cada uno de los compuestos según la numeración usada en el Esquema 1.

Esquema 1

Reacción de acetilación de resveratrol

Se indican los distintos compuestos que pueden obtenerse en la misma a partir de (1) resveratrol. (2) 3-O-acetil-resveratrol; (3) 4'-O-acetil-resveratrol; (4) 3,5-di-O-acetil-resveratrol (5) 3,4'-di-O-acetil-resveratrol

20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



ES 2 343 773 B1

Ejemplo 2

Producción de 3-O-acetil-resveratrol

5 Se pesaron 570 mg de resveratrol y se disolvieron en 6.5 ml de 2-metil-2-butanol anhidro (contenido en agua inferior al 0.2%). La solución se calentó a 40°C, y se añadieron 3.5 ml de acetato de vinilo (relación molar acetato de vinilo: resveratrol 15:1). A la mezcla se adicionó 1.5 g de lipasa de *Alcaligenes sp.* inmovilizada en tierra de diatomeas. La mezcla se incubó a 40°C con agitación orbital a 150 rpm durante aproximadamente 30 horas, tras lo cual se enfrió. La reacción se siguió por cromatografía en capa fina, utilizando heptano:acetato de etilo 1:1 (v/v) como eluyente, siendo la detección por luz UV. Asimismo la mezcla se analizó posteriormente por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, con una columna (125 x 4.6 mm) rellena de Lichospher 100 RP8 (5 µm). Se utilizó metanol: agua 30:70 (v/v) como fase móvil inicial (la fase acuosa contiene 0.1% v/v de ácido acético glacial) a un flujo de 1 ml/min; a continuación se realizó un gradiente de 5 minutos hasta una composición metanol: agua 50:50 (v/v), manteniéndose así durante 15 minutos y finalmente se volvió a la composición inicial metanol: agua 30:70 (v/v) en 2 min. Se utilizó un detector de fotodiodos y cuantificación a 308 nm. En estas condiciones se obtiene un rendimiento de 3-O-acetil-resveratrol del 39% (calculado por HPLC). La síntesis de este producto se produjo preferentemente hasta las 55 horas de reacción, aunque el máximo de producción se encuentra a las 12 horas (rendimiento aproximado del 75%). La mezcla de reacción se filtró, y la fase líquida se sometió a evaporación a presión reducida, obteniéndose un residuo sólido blanco.

20 El residuo obtenido en el paso anterior se sometió a cromatografía de columna en gel de sílice, utilizando heptano: acetato de etilo 3:1 (v/v) como eluyente. En estas condiciones se obtiene 3-O-acetilresveratrol con un alto grado de pureza. La determinación de la estructura química del compuesto obtenido se llevó a cabo mediante espectrometría de masas con electrospray (HPLC-ESI) y experimentos de resonancia magnética nuclear de correlación múltiple 2D-¹H-¹³C.

30 Con este mismo procedimiento se obtiene también el compuesto 3,4'-di-O-acetil-resveratrol con un rendimiento del 40% (calculado por HPLC) a las 30 horas de reacción. No obstante, la síntesis de este producto se produce preferentemente a partir de las 55 horas de reacción. Para obtener un rendimiento superior de este compuesto (aproximadamente del 60%) es necesario mantener la reacción hasta las 160 horas. La determinación de la estructura química del compuesto obtenido se llevó a cabo mediante espectrometría de masas con electrospray (HPLC-ESI) y experimentos de resonancia magnética nuclear de correlación múltiple 2D-¹H-¹³C.

35 Los resultados de este ejemplo de realización están representados en las Figuras 2 y 3. Donde las condiciones de reacción en la fig. 2 fueron las ya descritas: 50 mM resveratrol, 750 mM acetato de vinilo, 150 mg/ml lipasa, incubación a 40°C con agitación orbital. Se utilizó un detector de fotodiodos y cuantificación a 308 nm. Los resultados de la figura 3 fueron producidas en distintos intervalos a lo largo de una reacción de 167 horas en las mismas condiciones descritas para la figura 2.

40 Ejemplo 3

Producción de 3-O-estearil-resveratrol

45 Se pesaron 342 mg de resveratrol y se disolvieron en 10 ml de 2-metil-2-butanol anhidro (contenido en agua inferior al 0.2%). La solución se calentó a 40°C, y se añadieron 6.98 g de estearato de vinilo (relación molar estearato de vinilo: resveratrol 15:1). A la mezcla se añadieron 750 mg de lipasa de *Alcaligenes sp.* inmovilizada en tierra de diatomeas. La mezcla se incubó a 40°C con agitación orbital a 150 rpm durante aproximadamente 72 horas, tras lo cual se enfrió. La reacción se siguió por cromatografía en capa fina, utilizando heptano: acetato de etilo 4:1 (v/v) como eluyente, siendo la detección por luz UV. La mezcla se analizó posteriormente por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, con una columna Mediterranea-C18 (5 µm) (150 x4.6 mm). Se utilizó metanol: agua 90:10 (v/v) como fase móvil (la fase acuosa contiene 0.1% v/v de ácido acético) a un flujo de 1.5 ml/min. Se utilizó un detector de fotodiodos y cuantificación a 308 nm. En estas condiciones se obtuvo un rendimiento del 84% (calculada por HPLC).

55 La mezcla de reacción se filtró, y la fase líquida se sometió a evaporación a presión reducida, obteniéndose un residuo sólido blanco. El residuo obtenido en el paso anterior se sometió a cromatografía de columna en gel de sílice, utilizando heptano: acetato de etilo 2:1 (v/v) como eluyente. En estas condiciones se obtuvieron 3-O-estearil-resveratrol con un alto grado de pureza. La determinación de la estructura química del compuesto obtenido se llevó a cabo mediante espectrometría de masas (HPLC-ESI) y experimentos de resonancia magnética nuclear de correlación múltiple 2D-¹H-¹³C.

60 Los resultados del ejemplo 3 están representados en las Figuras 4 y 5.

65

ES 2 343 773 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de acilación del resveratrol, **caracterizado** porque comprende la incubación de resveratrol con un éster vinílico en presencia de una lipasa inmovilizada, donde dicha lipasa procede de bacterias o de hongos que se seleccionan de la lista que comprende *Alcaligenes*, *Pseudomonas* o *Thermomyces*.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el éster vinílico es acetato de vinilo.
- 10 3. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el éster vinílico es un éster vinílico de un ácido graso (C₄-C₂₆).
4. Procedimiento según la reivindicación 3, donde el éster vinílico es un éster vinílico de un ácido graso (C₁₆-C₂₂).
- 15 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la lipasa procede de una bacteria de la especie *Alcaligenes sp.*
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la lipasa procede de una bacteria de la especie *Pseudomonas cepacia*.
- 20 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la lipasa procede de un hongo de la especie *Thermomyces lanuginosus*.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la lipasa se encuentra inmovilizada en tierra de diatomeas.
- 25 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el resveratrol se disuelve previamente a la incubación en un disolvente de polaridad media.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, donde el disolvente de polaridad media se selecciona de la lista que comprende 2-metil-2-butanol, tert-butanol, éter isopropílico o 2-pentanona.
- 30 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde la incubación se realiza a una temperatura de entre 25°C y 65°C.
- 35 12. Procedimiento según la reivindicación 11, donde la incubación se realiza a una temperatura de entre 30°C y 50°C.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la incubación se realiza con agitación.
- 40 14. Procedimiento según la reivindicación 13, donde la agitación es orbital y de entre 100 rpm y 250 rpm.

45

50

55

60

65

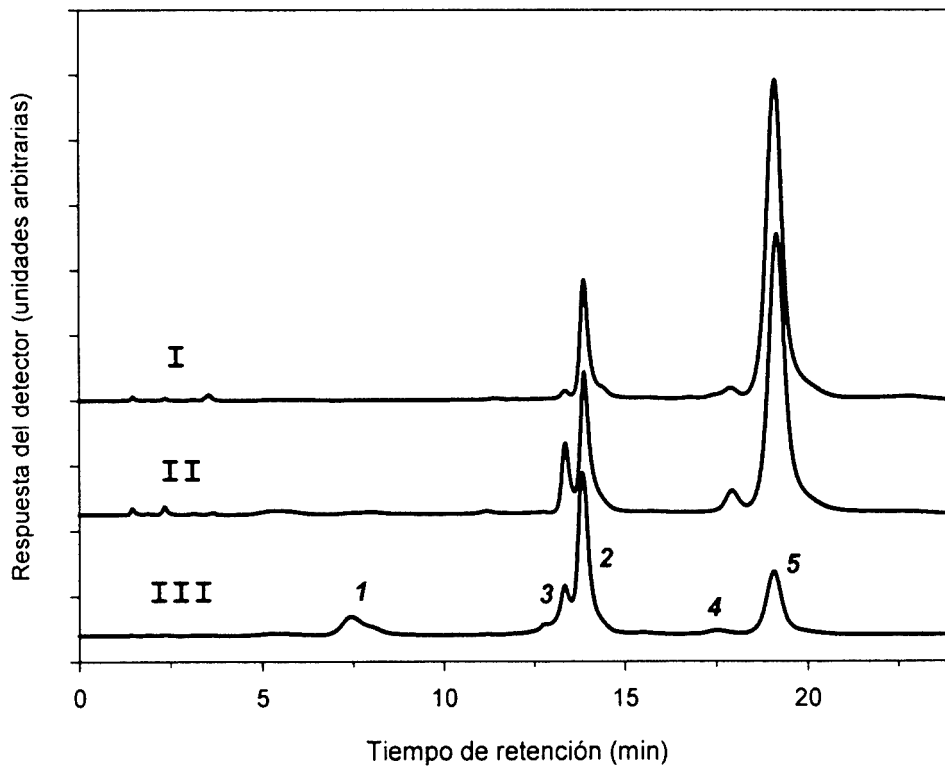


FIG. 1

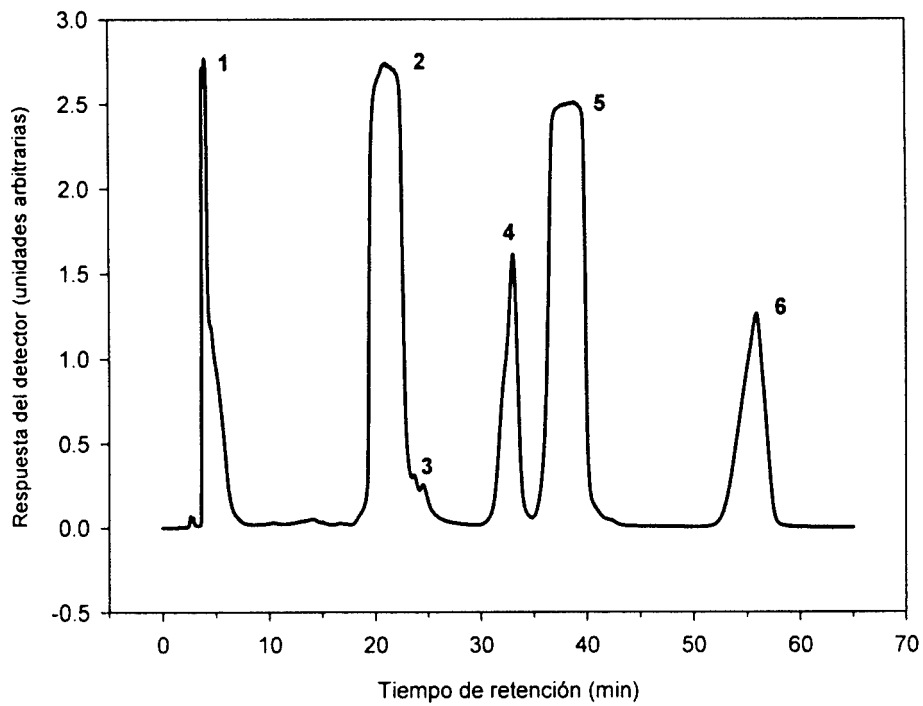
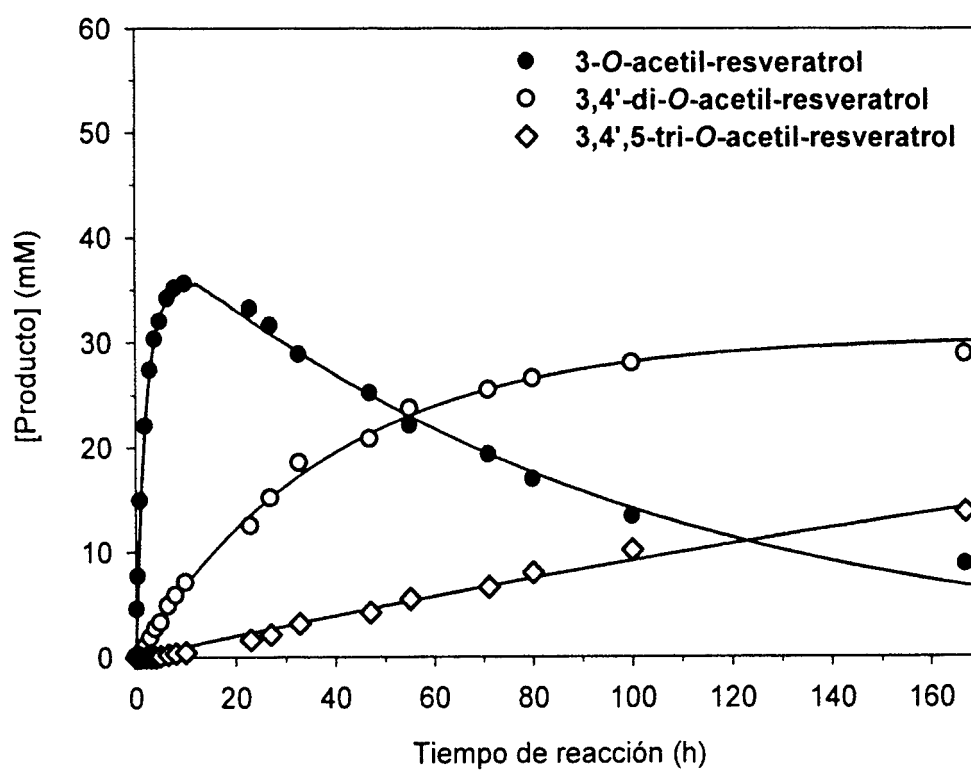


FIG. 2

**FIG. 3**

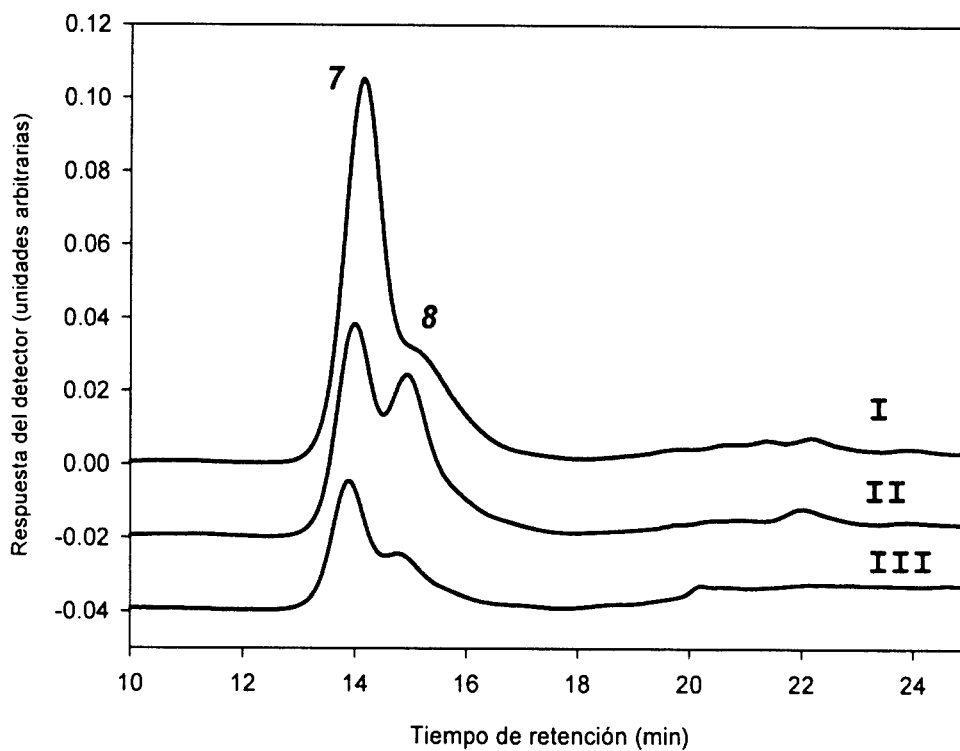


FIG. 4

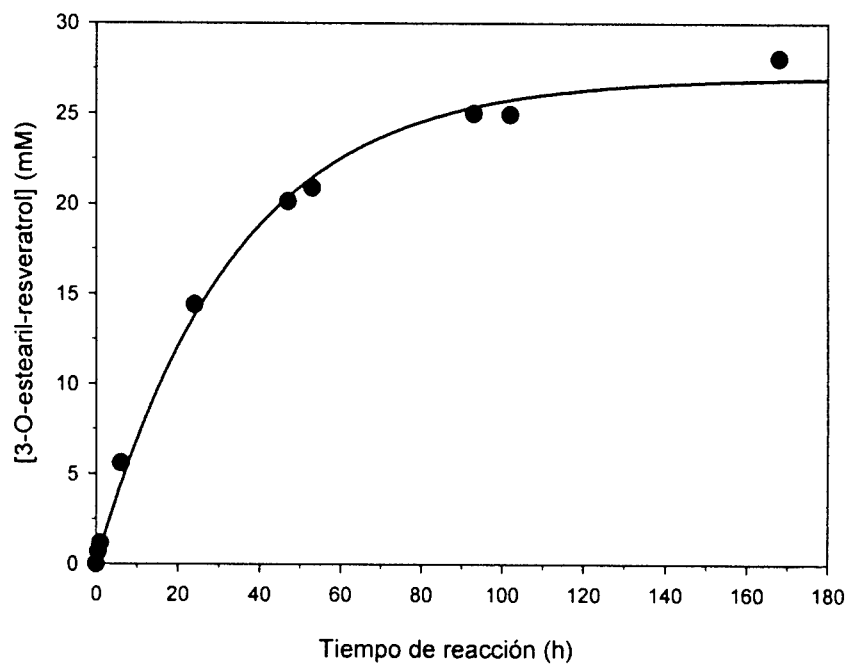


FIG. 5



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 343 773

② Nº de solicitud: 200803184

③ Fecha de presentación de la solicitud: 07.11.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12P 7/62 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	TENG, R.W. et al., "Regioselective acylation of several polyhydroxylated natural compounds by Candida antarctica lipase B", BIOCATALYSIS AND BIOTRANSFORMATION, 2005, Vol. 23, No. 2, paginas 109-116, ISSN: 1024-2422, todo el documento.	1-14
A	CARDILE, V. et al., "Chemo-enzymatic synthesis and cell-growth inhibition activity of resveratrol analogues.", BIOORGANIC CHEMISTRY, 2005, Vol. 33, No. 1, páginas 22-33, ISSN 0045-2068, todo el documento.	1-14
A	NICOLOSI, G. et al., "Chemo-enzymatic preparation of resveratrol derivatives.", JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B ENZYMATICA, 2002, Vol. 16, No. 5-6, páginas 223-229, IRN - ISSN 1381-1177, todo el documento.	1-14
A	SANTANIELLO, E. et al., "Lipase-catalyzed deacylation by alcoholysis: A selective, useful transesterification reaction", CURRENT ORGANIC CHEMISTRY, 2006, Vol. 10, No. 10, páginas 1095-1123, ISSN: 1385-2728, todo el documento.	1-14
A	US 5387514 A (SCHUDOK et al.) 07.02.1995, todo el documento.	1-14
A	SANTANIELLO, E. et al., "Selective lipase-catalyzed preparation of diol monobenzoates by transesterification and alcoholysis reactions in organic solvents.", JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B ENZYMATICA, 2006, Vol. 40, No. 3-4, páginas 81-85, ISSN: 1381-1177, todo el documento.	1-14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

27.07.2010

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/4

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

C12P

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.07.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SÍ
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Teng, R.W. et al., Biocatal. Biotransform., (2005), 23(2): 109-16.	2005
D02	Cardile, V. et al., Bioorg. Chem., (2005), 33(1): 22-33.	2005
D03	Nicolosi, G. et al., Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, (2002), 16(5-6): 223-9.	2002
D04	Santaniello, E. et al., Current Organic Chemistry, (2006), 10(10): 1095-123.	2006
D05	US 5387514 A	07-02-1995
D06	Santaniello, E. et al., Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, (2006), 40(3-4): 81-5.	2006

Observaciones sobre documentos:

En D1-D3 se analizan diferentes procedimientos de obtención de derivados acilados de resveratrol.

En D4-D5 se analiza la utilización de lipasas de diferentes orígenes en la acilación de alcoholes.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención está relacionada con un método de acilación de resveratrol basado en la incubación de resveratrol con un éster vinílico en presencia de una lipasa inmovilizada.

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes).

1.1. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-14, es nuevo de acuerdo con el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

2.1. La presente invención satisface el criterio establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes porque el objeto de la invención, definido en las reivindicaciones 1-14, implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.