

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
14 de mayo de 2010 (14.05.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/052356 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12P 7/62 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/070476

(22) Fecha de presentación internacional:
29 de octubre de 2009 (29.10.2009)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200803184
7 de noviembre de 2008 (07.11.2008) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES];
C/ Serrano 117, E-28006 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **TORRES SALAS, Pamela** [ES/ES]; Instituto De Catalisis Y Petroleoquímica (ICP), Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **PLOU GASCA, Francisco José** [ES/ES]; Instituto De Catalisis Y Petroleoquímica (ICP), Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES). **BALLESTEROS OLMO, Antonio** [ES/ES]; Instituto De Catalisis Y Petroleoquímica (ICP), Campus de Cantoblanco, E-28049 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Angel**; Glorieta Rubén Dario 4, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

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

(54) Title: ENZYMATIC PROCESS FOR ACYLATION OF RESVERATROL AT POSITION 3

(54) Título : PROCEDIMIENTO ENZIMÁTICO PARA LA ACILACIÓN EN POSICIÓN 3- DEL RESVERATROL

(57) Abstract: Enzymatic procedure for the regioselective acylation at position 3 of resveratrol utilising a vinyl ester and specific fungal and bacterial lipases, immobilised, as biocatalyst. The lipases utilised in said procedure come from bacteria or fungi selected from among *Alcaligenes*, *Pseudomonas* or *Thermomyces*.

(57) Resumen: 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*.



WO 2010/052356 A1

PROCEDIMIENTO ENZIMÁTICO PARA LA ACILACIÓN EN POSICIÓN 3- DEL RESVERATROL

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, nutraceuticos 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).

5

- 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
- 10 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.
- 15 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 glicosilo 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,
- 20 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).
- 25 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
- 30 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.

5

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., "Antitumor 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).

15

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.

25

30

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

5 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

10 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.

15 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

20 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 INVENCION

25

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

30 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
5 incubación de resveratrol con un éster vinílico (C_2 - C_{26}) 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*.

10 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
15 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
20 *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
25 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
30 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.

- 5 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.

10

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
- 15 20 25 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 μmol 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 100rpm y 250 rpm. En estas condiciones el producto mayoritario es el éster de resveratrol en la posición 3-.

- 30 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
5 respecto al 3-O-acetil-resveratrol 2.5:1 y 2:1, respectivamente.

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
10 evaporativo de dispersión de luz).

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
15 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
25 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.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

30

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.

5

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.

10

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 (◇).

15

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).

20

25

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.

30

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.

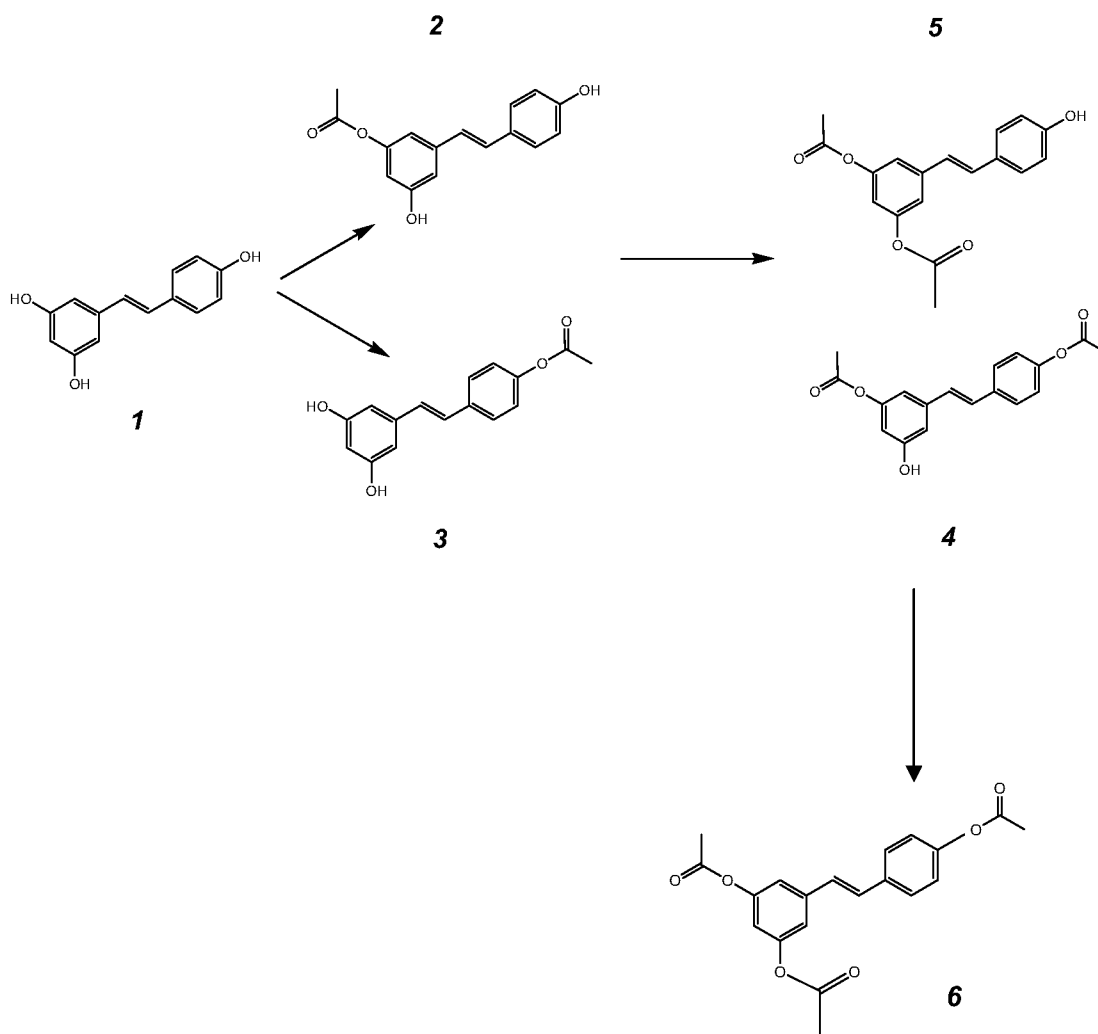
EJEMPLO 1: Síntesis de 3-O-acetil-resveratrol con diferentes lipasas.

10

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.



10

15 EJEMPLO 2: Producción de 3-O-acetil-resveratrol.

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

5 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)

10 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

15 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

20 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 3:1 (v/v) como eluyente. En estas condiciones se obtiene 3-O-acetilresveratrol con un alto grado de pureza.

25 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.

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.

15

EJEMPLO 3: Producción de 3-O-estearil-resveratrol

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 x 4.6 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).

- 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
- 5 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 - ^{13}C .
- 10 Los resultados del ejemplo 3 están representados en las Figuras 4 y 5.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de acilación del resveratrol, caracterizado porque comprende la incubación de resveratrol con un éster vinílico en presencia
5 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
10 de vinilo.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el éster vinílico es un éster vinílico de un ácido graso (C₄-C₂₆).
- 15 4. Procedimiento según la reivindicación 3, donde el éster vinílico es un éster vinílico de un ácido graso (C₁₆-C₂₂).
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la lipasa procede de una bacteria de la especie *Alcaligenes sp.*
20
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la lipasa procede de una bacteria de la especie *Pseudomonas cepacia*.
7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la
25 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.
- 30 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.

5

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.

12.Procedimiento según la reivindicación 11, donde la incubación se realiza a una temperatura de entre 30°C y 50°C.

10

13.Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde la incubación se realiza con agitación.

14.Procedimiento según la reivindicación 13, donde la agitación es orbital y de entre 100 rpm y 250 rpm.

15

20

25

30

1 / 3

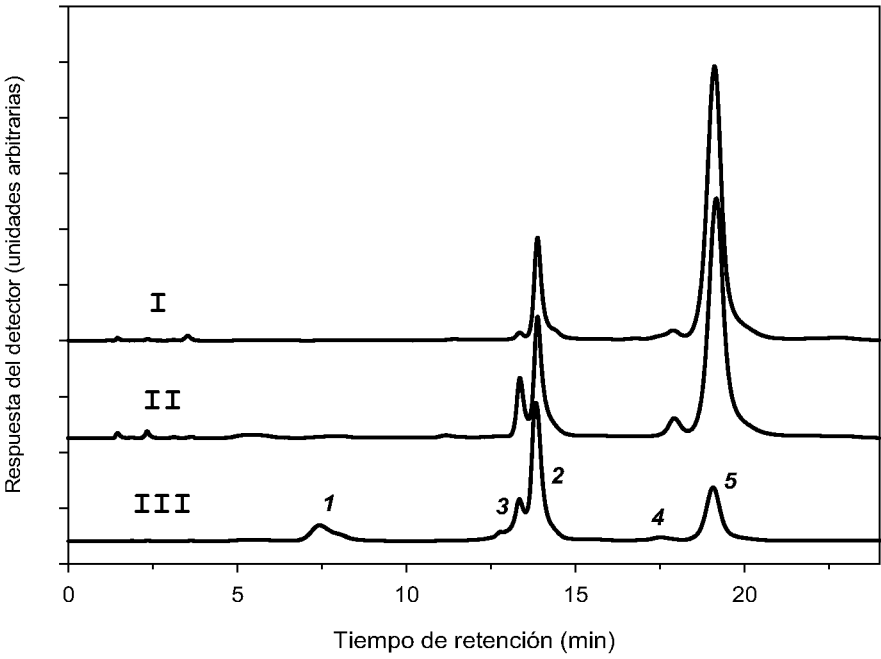


FIG. 1

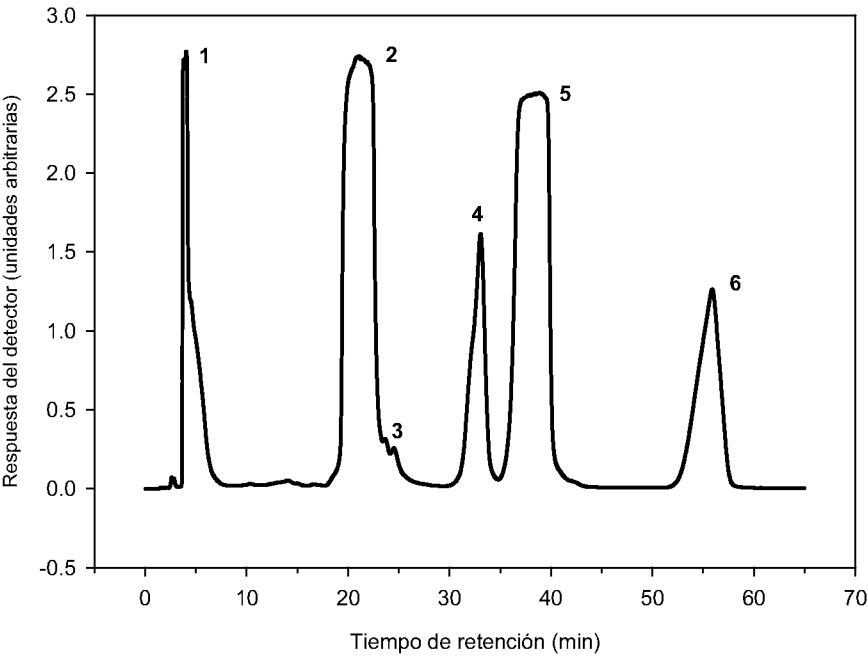


FIG. 2

2 / 3

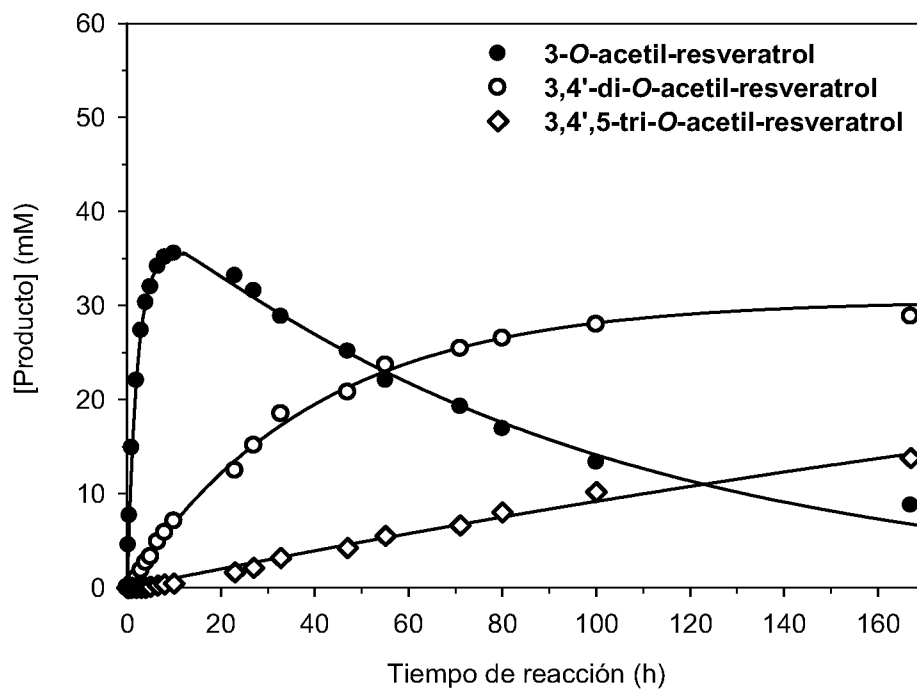


FIG. 3

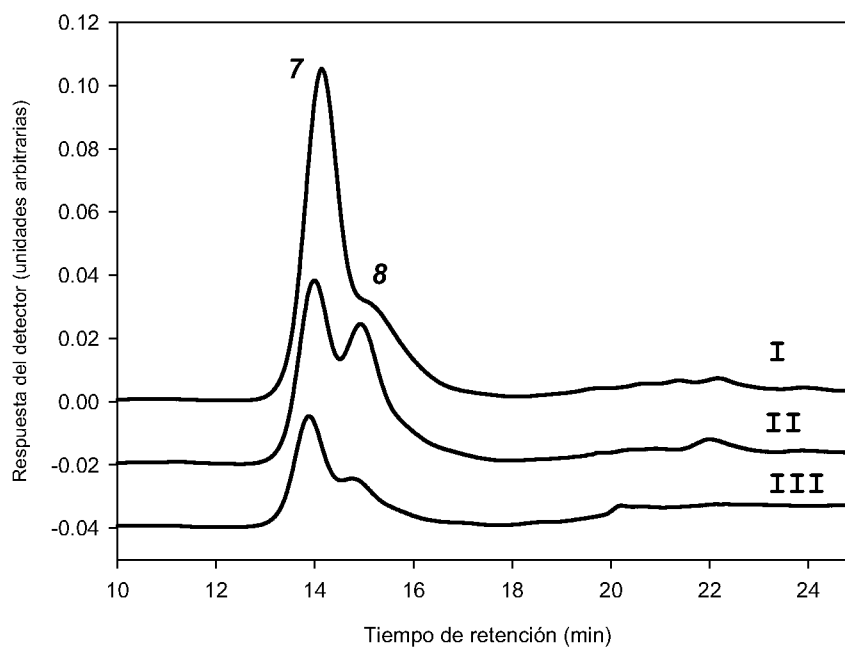
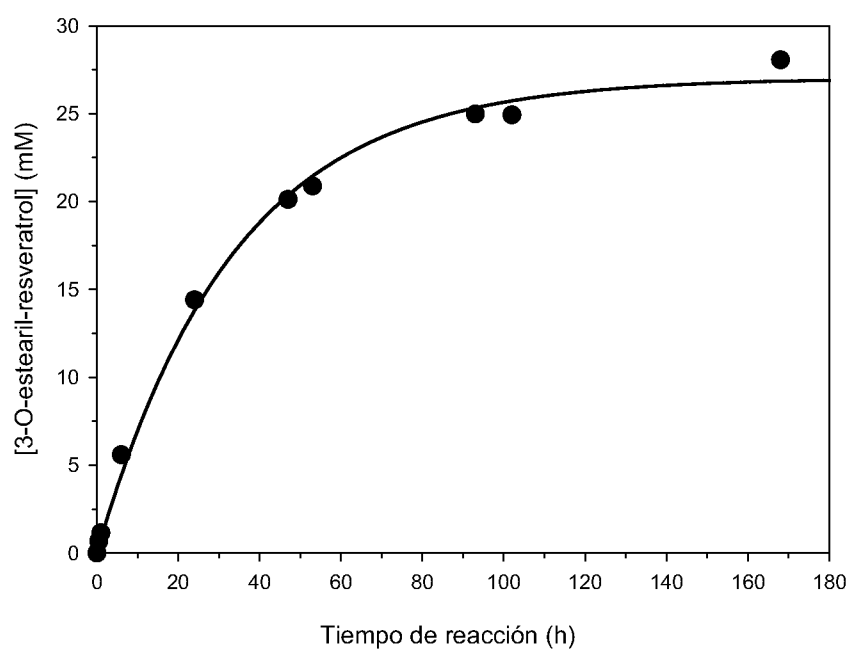


FIG. 4

3 / 3

**FIG. 5**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2009/070476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 7/62 (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P

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

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
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, Pages 109-116, ISSN: 1024-2422, the whole document.	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, pages 22-33, ISSN 0045-2068, the whole document.	1-14
A	NICOLOSI, G. et al., "Chemo-enzymatic preparation of resveratrol derivatives.", JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B ENZYMATIC, 2002, Vol. 16, No. 5-6, páginos 223-229, ISSN 1381-1177, the whole document.	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.		
"E" earlier document but published on or after the international filing date		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
	"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 February 2010 (12.02.2010)

Date of mailing of the international search report

(18/02/2010)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

J.L. Vizán Arroyo

Telephone No. +34 91 349 85 73

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 2009/070476

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SANTANIELLO, E. et al., "Lipase-catalyzed deacylation by alcoholysis: A selective, useful transesterification reaction", CURRENT ORGANIC CHEMISTRY, 2006, Vol. 10, No. 10, pages 1095-1123, ISSN: 1385-2728, page 1106, scheme 27.	1-14
A	US 5387514 A (SCHUDOK et al.) 07.02.1995, the whole document.	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 ENZYMATIC, 2006, Vol. 40, No. 3-4, pages 81-85, ISSN: 1381-1177, the whole document.	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/070476

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5387514 A	07.02.1995	CA 2058185 A EP 0492497 AB EP 19910121933 JP 4287689 A JP 3117157 B AT 141950 T DK 0492497 T	25.06.1992 01.07.1992 20.12.1991 13.10.1992 11.12.2000 15.09.1996 06.01.1997

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070476

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12P 7/62 (2006.01)

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12P

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

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
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 ENZYMATIC, 2002, Vol. 16, No. 5-6, páginos 223-229, ISSN 1381-1177, todo el documento.	1-14

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

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

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. **12 Febrero 2010 (12.02.2010)**

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
18-FEBRERO-2010 (18/02/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
O.E.P.M.

Funcionario autorizado
J.L. Vizán Arroyo

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

N° de teléfono +34 91 349 85 73

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070476

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
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, página 1106, esquema 27.	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 ENZYMATIC, 2006, Vol. 40, No. 3-4, páginas 81-85, ISSN: 1381-1177, todo el documento.	1-14

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070476

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 5387514 A	07.02.1995	CA 2058185 A EP 0492497 AB EP 19910121933 JP 4287689 A JP 3117157 B AT 141950 T DK 0492497 T	25.06.1992 01.07.1992 20.12.1991 13.10.1992 11.12.2000 15.09.1996 06.01.1997