



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 334 536**

② Número de solicitud: 200801042

⑤ Int. Cl.:
C12P 7/62 (2006.01)
C07D 493/04 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **11.04.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **11.03.2010**

Fecha de la concesión: **12.01.2011**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **24.01.2011**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
24.01.2011

⑰ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid
Rectorado
Avda. de Séneca, nº 2
28040 Madrid, ES**

⑱ Inventor/es: **Martínez Rodríguez, Mercedes;
El Boulifi, Nouredin y
Aracil Mira, José**

⑳ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimiento para la obtención selectiva de 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol) utilizando lipasas inmovilizadas como catalizador.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para la obtención selectiva de 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol) utilizando lipasas inmovilizadas como catalizador.

La obtención de 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol) se realiza por esterificación selectiva del ácido ricinoleico (12-hidroxi-9-cis-octadecenoico) y (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol) empleando como catalizador lipasas inmovilizadas en resinas de intercambio aniónico o acrílicas porosas u otras que confieran al catalizador obtenido un diámetro de poro entre 50 y 400 Å, y una superficie específica entre 10 y 150 m²/gr. Las lipasas empleadas provienen de las especies fúngicas *Mucor miehi* y *Candida antarctica*. La reacción de esterificación se realiza a presiones comprendidas entre la atmosférica y 1 mm de Hg a una temperatura comprendida entre 20 y 90°C. Es de destacar que mediante el procedimiento objeto de esta invención se obtiene mayoritariamente el monoéster resultante de la esterificación de isosorbide en posición 2 y como el isómero cis.

ES 2 334 536 B1

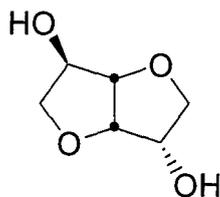
Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la obtención selectiva de 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol) utilizando lipasas inmovilizadas como catalizador.

La presente invención se refiere a un procedimiento de esterificación selectiva del ácido ricinoleico con isosorbide empleando lipasas inmovilizadas como catalizador.

El Isosorbide (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol) (Fórmula I) es un tipo de dioles cuya estructura es una heterociclo bicíclico derivado de azúcares, el cuál en estos últimos años ha recibido un interés muy considerable, particularmente por su gran actividad biológica.



Fórmula I

Estado de la técnica

La síntesis de los ésteres del isosorbide y ácidos grasos no se encuentran abundantemente reflejados en la literatura científica.

Seemayer *et al* en 1991 ("Enzymatic Preparation of Isomerically Pure 1,4:3,6-Dianhydro-D-Glucitol Monoacetates precursors for Isoglucitol 2 and 5 mononitrates", *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 3, no. 9 (1991), pg. 1123-1126) y en la patente US 5,538,891 describen la síntesis del 2-monoacetato de isosorbide en dos etapas. En la primera se obtiene el derivado diacetilato del isosorbide usando anhídrido acético y piridina seguido de una hidrólisis enzimática utilizando pseudomonas florecientes como catalizadores.

Stoss *et al* en 1987 ("Regioselective acylation of 1,4:3,6-Dianhydro-D-Glucitol" *Synthesis* vol. 2 (1987), pg. 174-176) y en la patente europea EP 0 057 847 obtienen el monoacetato de isosorbide mediante la reacción acilación con anhídrido acetilo, seguido de una destilación sobre base, carbonatos hidróxidos o alcóxidos alcalinos obteniendo un rendimiento del 70%. El proceso no es económicamente rentable por los altos costes energéticos de la operación de destilación.

Cetovic *et al* in 1989 ("Selective Esterification of 1,4:3,6-Dianhydro-D-Glucitol" *Synthesis* vol. 8 (1989), pg. 610-611), describen un método selectivo para esterificación de isosorbide con derivados de ácidos carboxílicos en presencia 4-demetilamino piridina (DMAP). Los rendimientos del 2-esterdiol fueron entre el 68% y 85%.

Otra aproximación a la síntesis del monoéster la describen Abenham *et al* in ("Selective Alkylations of 1,4:3,6-Dianhydro-D-glucitol (isosorbide)" *Carbohydrate Research*, vol. 261, no. 2 (1994), pg. 255-266) utilizando agentes protectores como grupos alilo, propilo o benzoilo.

Mukesh *et al* en 1993 ("Lipase catalysed esterification of isosorbide and sorbitol". *Biotechnology Letters* vol. 15, no. 12 (1993), pg. 1243-1246), describen la reacción de esterificación de ácido oleico e isosorbide utilizando como catalizador la enzima comercial inmovilizada lipozime IM-20 y gel de sílice. El mono éster oleato de isosorbide se obtiene como único producto de reacción en un reactor tubular. La conversión máxima fue del 95% con un tiempo de operación de 13 horas.

En 1992, Ghoshray *et al*. ("Enzymatic prepanohydric alcohols and properties of the esters". *J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 69, no. 1 (1992), pg. 85-88) describen la reacción de obtención de ésteres del ácido ricinoleico mediante la reacción de transesterificación del aceite de ricino con monoalcoholes como decanol, dodecanol, tetradecanol, hexadecanol y octadecanol utilizando una lipasa soluble de *Mucor miehi* a 60°C de temperatura.

La patente EP 0 320 132 describe una enzima inmovilizada que comprende un portador macroporoso insoluble y una enzima lipolítica adsorbida en él que se obtiene por tratamiento del portador con un ácido graso. Esta enzima tiene aplicación en procesos de esterificación y transesterificación donde la inmovilización en presencia de un ácido graso conduce un mayor rendimiento de la enzima, obteniéndose conversiones próximas al 90% en la esterificación de ácido graso con un monoalcohol o un poliol. Esta patente se refiere al uso de la enzima en procesos de esterificación en general, no estando orientada a la obtención de un producto concreto, como es el caso de la presente invención.

ES 2 334 536 B1

El procedimiento de la presente invención se caracteriza por utilizar como catalizadores lipasas inmovilizadas sobre resinas sin tratamiento previo con un ácido graso, en la reacción de esterificación entre isosorbide (poliol) y ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxi-9-cis-octadecenoico), consiguiendo conversiones superiores al 95% y selectividad al monoéster deseado próximas al 90% en tan sólo dos horas de reacción.

5 La eficacia del presente procedimiento radica en que, primero no existe referencia bibliográfica alguna para la obtención selectiva del monoéster (isosorbide monoricinoleato) del ácido ricinoleico por esterificación directa en rendimientos casi cuantitativos, segundo con este procedimiento se obtiene específicamente el isómero cis del monoéster final sin existir isomerización cis-trans y tercero este procedimiento permite filtrar el catalizador enzimático cuando la
10 reacción ha concluido, reutilizarlo y aislar el monoéster en un solo paso de purificación.

Descripción de la invención

15 En la presente invención se describe un procedimiento de esterificación del ácido ricinoleico, 12-hidroxi-9-cis-octadecenoico con 1,4:3,6-Dianhydro-D-Glucitol, en el que se utilizan como catalizadores lipasas de diferentes especies fúngicas y actividad catalítica inmovilizadas en resinas de intercambio aniónico o acrílicas macroporosas, con diferentes diámetros de poro y superficies específicas, obteniéndose altos rendimientos y selectividades de los correspondientes monoésteres.

20 La presente invención se refiere a la utilización de enzimas, de determinadas características, para dirigir la esterificación entre el ácido ricinoleico con el isosorbide para conseguir obtener una proporción superior al 90% de monoéster. La reacción de esterificación tiene lugar según procedimientos convencionales en un reactor continuo o discontinuo, de tipo tanque agitado o en un reactor cesta o en reactores continuos tipo lecho fijo o de lecho fluidizado, en el que se encuentra el catalizador enzimático. La reacción se lleva a cabo en el rango de temperaturas de 60°C y
25 80°C.

La reacción es conveniente realizarla a presión atmosférica o a vacío (1 mm Hg) cuando interesa eliminar por evaporación el agua formada. En el caso de que el equilibrio se desplace por eliminación de uno de los productos de reacción, por ejemplo el agua, se alcanzan conversiones superiores al 85%, siendo el tiempo necesario para alcanzar
30 esta conversión de 10 a 120 minutos, aunque normalmente este tiempo esta comprendido entre 10 y 60 minutos.

Los sistemas catalíticos a los que se refiere la presente invención son preparados enzimáticos constituidos por lipasas, triacilglicerol hidrolasas (EC 3.1.1.3), producidas por la especie fúngica *Mucor miehi* o la especie fúngica
35 *Candida antarctica*, e inmovilizadas sobre resinas de intercambio aniónico o acrílicas macroporosas, con diferentes propiedades para cada una de ellas, y a diferentes Las dos especies enzimáticas pueden ejercer con elevada efectividad la acción de lipasa o la acción de carboxilesterasa y, también en ambos casos, la especificidad de dichas enzimas puede ser posicional o no dependiendo del tipo de sustrato que se desee modificar con ellas. Los sistemas catalíticos tienen un diámetro de poro medio que se encuentra en el rango de 50 y 400 Å, preferentemente entre 120 y 300 Å. Siendo el rango en el que se encuentra la superficie específica de 10 y 150 m²/g, preferentemente entre 25 y 100 m²/g.
40

Los sistemas catalíticos producidos a partir de la especie fúngica *Mucor miehi* tienen una actividad que se encuentra en el rango de 20 a 80 BIUS (número de μ moles de ácido palmítico transformados con trioleina por minuto utilizando la enzima inmovilizada a una temperatura de 40°C).

45 Los sistemas catalíticos producidos a partir de la especie fúngica *Candida antarctica* tienen una actividad que se encuentra en el rango de 5000 a 12000 PLUS/g (número de μ moles de laurato de n-propilo obtenidos partiendo de ácido láurico y 1-propanol durante un tiempo de reacción de 15 minutos, a una temperatura de 60°C).

El objetivo de la presente invención es la obtención selectiva de 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de isosorbide.
50 La identificación cualitativa y cuantitativa se ha llevado a cabo mediante una combinación de técnicas tales como IR (infrarrojo), ¹H-RMN (Resonancia magnética nuclear de ¹H), ¹³C-RMN (Resonancia magnética nuclear de ¹³C), espectrometría de masas y cromatografía de gases.

Modo de realización de la invención

55 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

60 En este ejemplo se muestra la influencia de la actividad de un catalizador enzimático obtenido a partir de la especie fúngica *Mucor miehi*, inmovilizada en una resina de intercambio aniónico, con un diámetro medio de poro de 176 Å. Una superficie específica 60 m²/g. y una actividad de 60 BIU.

65 La reacción se lleva a cabo en un reactor de mezcla completa de 250 ml de capacidad, provisto de un sistema de destilación a vacío. Se introduce en él ácido ricinoleico y isosorbide en una relación molar 1:1, con una concentración inicial de catalizador enzimático del 5% en peso. La temperatura de reacción se mantuvo en 70°C, la presión de trabajo en 55 mm Hg y la velocidad de agitación fue de 600 r.p.m.

ES 2 334 536 B1

Después de 2 horas de reacción, la conversión de ácido fue del 45%, con una selectividad en la formación de monoéster del 92%, el resto está formado por diéster.

5 Ejemplo 2

En este ejemplo se muestra la influencia de la actividad de un catalizador enzimático obtenido a partir de la especie fúngica *Candida antarctica*, inmovilizada en una resina acrílica macroporosa, con un diámetro medio de poro de 180 Å, una superficie específica 95 m²/g. y una actividad de 7000 PLUS/g.

10 La reacción se lleva a cabo en un reactor de mezcla completa de 250 ml de capacidad, provisto de un sistema de destilación a vacío. Se introduce en él ácido ricinoleico y isosorbide en una relación molar 1:1, con una concentración inicial de catalizador enzimático del 5% en peso. La temperatura de reacción se mantuvo en 70°C, la presión de trabajo en 55 mm Hg, y la velocidad de agitación en 600 r.p.m.

15 Después de dos horas de reacción, la conversión de ácido fue del 97%, con una selectividad en la formación de monoéster del 91% el resto está formado por diéster.

20 Ejemplo 3

En este ejemplo se muestra la influencia de la actividad de un catalizador enzimático obtenido a partir de la especie fúngica *Candida antarctica* inmovilizada en una resina acrílica macroporosa con un diámetro medio de poro de 210 Å, una superficie específica 67 m²/g. y una actividad de 7800 PLUS/g.

25 La reacción se lleva a cabo en un reactor de mezcla completa de 250 ml de capacidad, provisto de un sistema de destilación a vacío. Se introducen él ácido ricinoleico y isosorbide en una relación molar 1:1, siendo concentración inicial de catalizador enzimático del 5% en peso. La temperatura de reacción se mantuvo en 70°C, la presión de trabajo en 55 mm Hg, y la velocidad de agitación en 800 r.p.m.

30 Después de dos horas de reacción, la conversión de ácido fue del 49%, con una selectividad en la formación de monoéster del 94%, el resto está formado por diéster.

35 Ejemplo 4

En este ejemplo se muestra la influencia de la temperatura de reacción. Se repitió el ejemplo 2 con el mismo catalizador y condiciones de operación, salvo la temperatura de reacción, que se mantuvo a 80°C.

40 Después de dos horas de reacción, la conversión de ácido fue del 100%, con una selectividad en la formación de monoéster del 87%, el resto está formado por diéster.

Ejemplo 5

45 En este ejemplo se muestra la influencia de la concentración inicial de catalizador. Se repitió el ejemplo 2, con el mismo catalizador y condiciones de operación, salvo la concentración inicial de catalizador, que se fijó en 7.8% en peso.

50 Después de dos horas de reacción, la conversión de ácido fue del 93%, con una selectividad en la formación de monoéster del 91%, el resto está formado por diéster.

Ejemplo 6

55 En este ejemplo se muestra la influencia de la presión de trabajo. Se repitió el ejemplo 5, con el mismo catalizador y condiciones de operación, salvo la presión de trabajo, que se mantuvo en 380 mm Hg.

60 Después de 2 horas de reacción, la conversión de ácido fue del 71%, con una selectividad en la formación de monoéster del 92%, el resto está formado por diéster.

Ejemplo 7

65 En este ejemplo se muestra la influencia de la relación molar alcohol:ácido. Se repitió el ejemplo 5, con el mismo catalizador y condiciones de operación, salvo la relación molar alcohol:ácido, que se fijó en 3.

Después de 2 horas de reacción, la conversión de ácido fue del 96%, con una selectividad en la formación de monoéster del 91%, el resto está formado por diéster.

ES 2 334 536 B1

Ejemplo 8

En este ejemplo se muestra la influencia de la velocidad de agitación. Se repitió el ejemplo 2, con el mismo catalizador y condiciones de operación, salvo la velocidad de reacción que se fijó en 100 r.p.m.

5

Después de dos horas de reacción, la conversión de ácido fue del 45%, con una selectividad en la formación de monoéster del 92%, el resto está formado por diéster.

10 Ejemplo 9

En este ejemplo se muestra la influencia de la actividad de un catalizador enzimático obtenido a partir de la especie fúngica *Candida antarctica*, inmovilizada en una resina acrílica macroporosa, con un diámetro medio de poro de 180 Å, una superficie específica 95 m²/g. y una actividad de 7000 PLUS/g.

15

La reacción se lleva a cabo en un reactor tipo cesta de 250 ml de capacidad y una luz de malla de 300 μm, provisto de un sistema de destilación a vacío. Se introduce en él ácido ricinoleico y isosorbide en una relación molar 1:1, y la concentración inicial de catalizador enzimático del 5% en peso. La temperatura de reacción se mantuvo en 70°C, la presión de trabajo en 55 mm Hg, y la velocidad de agitación en 700 r.p.m. Después de dos horas de reacción, la conversión de ácido fue del 85%, con una selectividad en la formación de monoéster del 92%, el resto está formado por diéster.

20

Ejemplo 10

25

En este ejemplo se muestra la influencia de la luz de malla. Se repitió el ejemplo 9, con el mismo catalizador y condiciones de operación, salvo la luz de malla que se fijó en 400 μm.

Después de dos horas de reacción, la conversión de ácido fue del 94%, con una selectividad en la formación de monoéster del 92%, el resto está formado por diéster.

30

Ejemplo 11

35

En un lecho fijo de capacidad extensible, con un diámetro de 1.6 cm. y una altura de 6 cm., provisto de una camisa para termostatar la operación, se introducen 4.5 g. de enzima inmovilizada. A través del mismo se hace circular una mezcla de ácido ricinoleico y isosorbide en una relación molar 1:1 a un caudal de 1 ml/min. El catalizador enzimático empleado es el obtenido a partir de la especie fúngica *Candida antarctica*, inmovilizada en una resina acrílica macroporosa, con un diámetro medio de poro de 180 Å, una superficie específica 95 m²/g. y una actividad de 7000 PLUS/g. La temperatura de reacción se mantuvo en 70°C y la presión de trabajo en 760 mm Hg.

40

El tiempo de residencia medio fue de 1.3 horas y la conversión de ácido fue del 16%, con una selectividad en la formación de monoéster del 93%, el resto está formado por diéster.

45

50

55

60

65

ES 2 334 536 B1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para producir 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol) que comprende la esterificación selectiva de ácido ricinoleico con isosorbide empleando como catalizador lipasas inmovilizadas en resinas.
2. Método para producir 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol), según reivindicación 1, donde las lipasas provienen de las especies fúngicas *Mucor miehi* y *Candida antarctica*.
- 10 3. Método para producir 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol), según reivindicaciones 1 y 2, donde el catalizador obtenido tiene un diámetro de poro entre 50 y 400 Å.
4. Método para producir 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol)r, según reivindicación 1, donde las resinas son de intercambio aniónico o acrílicas porosas.
- 15 5. Método para producir 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol), según reivindicaciones anteriores, donde la reacción de esterificación se realiza a una temperatura entre 20 y 90°C.
- 20 6. Método para producir 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol), según reivindicaciones anteriores, donde la reacción de esterificación se realiza a una presión entre 1 y 760 mmHg.
7. Método para producir 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol)r, según reivindicaciones anteriores, donde el tiempo de reacción varía entre 10 y 120 minutos para alcanzar una conversión del 85%.
- 25 8. Método para producir 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol), según reivindicaciones anteriores, donde la esterificación tiene lugar en un reactor de tipo tanque agitado, continuo o discontinuo.
9. Método para producir 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol), según reivindicaciones 1 a 7, donde la esterificación tiene lugar en un reactor cesta, continuo o discontinuo.
- 30 10. Método para producir 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de (1,4:3,6-dianhidro-D-glucitol), según reivindicaciones 1 a 7, donde la esterificación tiene lugar en un reactor tipo lecho fijo o fluidizado.
- 35 11. Monoéster de isosorbide del ácido ricinoleico obtenible por el procedimiento reivindicado.

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 334 536

② Nº de solicitud: 200801042

③ Fecha de presentación de la solicitud: 11.04.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12P 7/62 (2006.01)
C07D 493/04 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	MUKESH, D. et al. "Lipase catalysed esterification of isosorbide and sorbitol". Biotechnology Letters, 1993, Volumen 15, Nº 12, páginas 1243-1246. Ver página 1243, resumen; página 1244, Materiales y Métodos; página 1245, Figura 1.	1-11
X	US 5538891 A (SCHNEIDER, M. & SEEMAYER, R.) 23.07.1996, columna 14, reivindicación 18; columna 15, reivindicación 23; columna 8, ejemplos 5 y 6.	1-11
A	ROY, A. & CHAWLA, H.P.S. "Biocatalysis in organic solvents: a process for multigram synthesis of 1,4:3,6-dianhydro-D-glucitol 2-acetate and its isomeric 5-acetate using immobilized lipase Pseudomonas sp." Enzyme and Microbial Technology, 2001, Volumen 29, páginas 490-493. Ver página 490, resumen; página 491, Figura 1, Apartado 2.4.	1-11
A	GB 2358859 A (CLARIANT LIFE SCIENCE MOLECULES) 08.08.2001, página 19, ejemplo 2a.	1-11
A	WO 2007147899 A2 (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 27.12.2007, página 24, reivindicación 1; página 25, reivindicación 5.	1-11

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 25.02.2010	Examinador N. Martín Laso	Página 1/1
---	-------------------------------------	----------------------