

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 385**

51 Int. Cl.:
A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 8/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08754745 .1**
96 Fecha de presentación: **27.05.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2155886**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.02.2010**

54 Título: **Uso cosmético de inhibidores de la tirosinasa**

30 Prioridad:
08.06.2007 US 811055

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.06.2012

73 Titular/es:
**EASTMAN CHEMICAL COMPANY
200 SOUTH WILCOX DRIVE
KINGSPORT TN 37660, US**

72 Inventor/es:
**CLENDENNEN, Stephanie Kay;
BOAZ, Neil Warren y
CLAUSON, Jeffrey, Michael**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 383 385 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso cosmético de inhibidores de la tirosinasa.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método cosmético de aclaramiento de la piel que comprende la aplicación de composiciones con base de ésteres de metanoles sustituidos que reducen la formación de melanina.

Antecedentes de la invención

10 La hiperpigmentación de la piel está relacionada directamente con la formación de melanina, un pigmento oscuro formado a partir de la tirosina. Las etapas iniciales en la conversión de la tirosina en melanina están mediadas por la enzima tirosinasa. Los inhibidores eficaces de la tirosinasa pueden inhibir la formación de la melanina y son útiles para reducir la pigmentación indeseable de la piel (por ejemplo, aclarado de la piel, equilibrado del tono de la piel o reducción de la aparición de manchas de edad). Actualmente hay varios inhibidores de la tirosina en el mercado, incluyendo la hidroquinona, el ácido kójico y la arbutina. Sin embargo, cada uno de estos productos tiene desventajas. Por ejemplo, el ácido kójico presenta una biodisponibilidad baja y por lo tanto una eficacia marginal. Otro ejemplo, la hidroquinona es oxidada por el aire, la luz y la misma tirosinasa. Estos productos oxidados de hidroquinona han sido relacionados con irritaciones de la piel y quizá citotoxicidad.

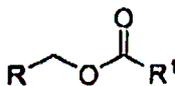
15 El ácido kójico se usa generalmente como ingrediente para el aclaramiento de la piel. Es un producto metabólico fúngico del que se ha demostrado que es tanto seguro como eficaz para uso tópico (revisado en Burdock *et al.*, **2001**, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 33: 80-101). También se han descrito monoésteres y diésteres del ácido kójico (Nagai, S.; Ixumi, T.; patente estadounidense N° 4.369.174) y parece que tienen excelente actividad inhibidora de la tirosinasa de forma que inhiben la formación de la melanina en la piel. Esta inhibición puede producir efectos excelentes en el aclaramiento de la piel.

20 Hay dos monoésteres diferentes que se pueden preparar a partir del ácido kójico o alcohol 4-hidroxi-bencílico, ya que las moléculas precursoras tienen tanto un alcohol enólico (o un fenol) como un alcohol primario. El monoéster del ácido kójico del que se informa en la patente estadounidense N° 4.369.174 se preparó por métodos químicos en condiciones de temperatura elevada y proporcionó el éster del alcohol primario. Las condiciones drásticas usadas no serían viables para componentes de reacción térmicamente inestables. Se ha publicado que el ácido kójico se acetila enzimáticamente de forma específica en el oxígeno enólico (Liu, K.J.; Shaw, J.F.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1998, 75, 1507-1511). En un informe contradictorio, una solicitud de patente japonesa (número de solicitud 2002-257704) indicó que el ácido kójico se acetiló enzimáticamente en el oxígeno del hidroximetilo cuando se usó un ácido o un éster vinílico como agente acetilante.

30 Los inhibidores que son más biodisponibles y eficaces presentan un potencial aumentado por una ventaja de aclaramiento evidente sin irritación de la piel. Otras ventajas similares incluirán la facilidad de uso, durabilidad mejorada y disminución de la frecuencia de aplicación. El objetivo de esta invención es proporcionar un método cosmético de aclaramiento de la piel usando dichos compuestos y composiciones.

Resumen de la invención

35 La invención proporciona un método cosmético para aclaramiento de la piel que comprende la aplicación en un lugar de la piel de una composición que comprende un compuesto éster representado por la fórmula 1:



1 ;

y un portador aceptable desde el punto de vista cosmético,

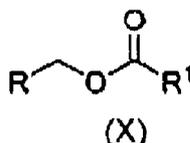
40 en el que R se elige entre el grupo que consiste en hidroxiarilo carbocíclico C₆-C₂₂ sustituido o no sustituido, y

R¹ se elige entre el grupo que consiste en alquilo C₁-C₂₂, alquenilo C₂-C₂₂, dienilo C₄-C₂₂, trienilo C₆-C₂₂, tetraenilo C₈-C₂₂ y sus mezclas.

Descripción detallada

45 Se describe adicionalmente un método biocatalítico suave y sencillo para la preparación de monoésteres y materiales relacionados en el que el éster se forma en un oxígeno primario en lugar de un oxígeno enólico. Estos compuestos funcionan como inhibidores de la tirosinasa muy eficaces.

Se describe un método para la preparación de compuestos éster representados por la fórmula general (X):



en la que

5 R se elige entre un hidroxiarilo carbocíclico C₆-C₂₂ sustituido o no sustituido, hidroxi-4H-piran-4-on-2-ilo sustituido y un hidroxiheteroarilo C₄-C₂₀ sustituido o no sustituido en el que los heteroátomos se eligen entre azufre, nitrógeno y oxígeno, y

10 R¹ se elige entre un alquilo C₁-C₂₂ saturado, de cadena lineal o ramificada, sustituido o no sustituido, alqueno C₂-C₂₂ de cadena lineal o ramificada, sustituido o no sustituido, dienilo C₄-C₂₂ de cadena lineal o ramificada, sustituido o no sustituido, trienilo C₆-C₂₂ de cadena lineal o ramificada sustituido o no sustituido y tetraenilo C₈-C₂₂ de cadena lineal o ramificada, sustituido o no sustituido, o sus mezclas.

15 Los grupos arilo que puede representar R pueden incluir fenilo, naftilo, o antraceno y fenilo, naftilo, o antraceno sustituidos con un grupo hidroxilo y uno a tres sustituyentes adicionales elegidos entre un alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, arilo C₆-C₁₀, arilo C₆-C₁₀ sustituido, alcoxi C₁-C₆, hidroxilo, halógeno, carboxi, ciano, alcanoiloxi C₁-C₆, alquiltio C₁-C₆, alquilsulfonilo C₁-C₆, trifluorometilo, hidroxilo, alcoxi C₂-C₆-carbonilo, alcanoilamino C₂-C₆ y -O-R², S-R², -SO₂-R², -NHSO₂R² y -NHCO₂R², donde R² es fenilo, naftilo, o fenilo o naftilo sustituidos con uno a tres grupos elegidos entre alquilo C₁-C₆, arilo C₆-C₁₀, alcoxi C₁-C₆ y halógeno.

20 Los grupos heteroarilo que R puede representar incluyen un anillo aromático de 5 ó 6 miembros sustituido con hidroxilo, que contiene uno a tres heteroátomos elegidos entre oxígeno, azufre y nitrógeno. Los ejemplos de dichos grupos heteroarilo son el hidroxitienilo, hidroxifurilo, hidroxipirrolilo, hidroximidazolilo, hidroxipirazolilo, hidroxitiazolilo, hidroxisotiazolilo, hidroxioxazolilo, hidroxisoxazolilo, hidroxitriazolilo, hidroxitiadiazolilo, hidroxioxadiazolilo, hidroxitetrazolilo, hidroxipiridilo, hidroxipirimidilo, hidroxibenzoxazolilo, hidroxibenzotiazolilo, hidroxibencimidazolilo, hidroxindolilo y similares. Los radicales heteroarilo pueden estar sustituidos, por ejemplo, con hasta tres grupos adicionales tales como alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, hidroxilo, halógeno, alquiltio C₁-C₆, arilo, ariltio, ariloxi, alcocarbonil C₂-C₆ y alcanoilamino C₂-C₆. Los radicales heteroarilo también pueden estar sustituidos con un sistema de anillo condensado, por ejemplo un resto benzo o nafto, que puede estar sustituido o no sustituido, por ejemplo, con hasta tres de los grupos indicados en la sentencia precedente.

El término "halógeno" se usa para incluir el flúor, cloro, bromo y yodo.

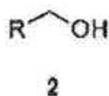
30 Los grupos alquilo, alqueno, dienilo, trienilo y tetraenilo que pueden ser representados por R¹ pueden ser radicales hidrocarbonados alifáticos de cadena lineal o ramificada que contengan hasta 20 átomos de carbono y que pueden estar sustituidos, por ejemplo, con uno a tres grupos elegidos entre alcoxi C₁-C₆, ciano, alcocarbonilo C₂-C₆, alcanoiloxi C₂-C₆, hidroxilo, arilo, heteroarilo, tiol, tioéter, ditiolano y halógeno.

Los términos "alcoxi C₁-C₆", "alcocarbonil C₂-C₆" y "alcanoiloxi C₂-C₆" se usan para indicar radicales que corresponden a las estructuras -OR³, -CO₂R³ y -OCOR³, respectivamente, en los que R³ es un alquilo C₁-C₆ o un alquilo C₁-C₆ sustituido.

35 Los compuestos para el uso en el método cosmético de la invención se definen en la fórmula 1, y los preferidos son aquellos en los que R es fenol.

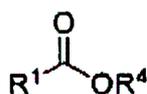
Los compuestos particularmente preferidos se representan por estructuras 1 en las que R es 4-hidroxifenilo y R¹ se elige entre los grupos alquilo C₁-C₁₆.

El procedimiento de preparación comprende la reacción del alcohol 2:



40

con un derivado ácido de fórmula 3:



3

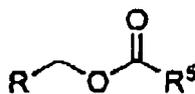
5 en presencia de una lipasa y tamices moleculares, y en presencia o ausencia de un disolvente orgánico para formar el éster **1** deseado en el que el sustituyentes R del alcohol **2** y el R¹ del derivado ácido **3** son como se han definido anteriormente y el sustituyentes R⁴ del derivado ácido se elige entre el hidrógeno y los grupos alquilo C₁-C₄ sustituidos o no sustituidos. Los ejemplos de grupos alquilo C₁-C₄ incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, s-butilo y similares. Los sustituyentes R⁴ preferidos incluyen hidrógeno, metilo y etilo, siendo el hidrógeno el más preferido.

10 El procedimiento se puede realizar con o sin un disolvente adicional u opcionalmente en un disolvente inerte elegido entre los disolventes de éter cíclico o acíclico tales como dietil éter, diisopropil éter, terc-butil metil éter, o tetrahidrofurano, los hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolueno o xileno, los hidrocarburos alifáticos o alicíclicos saturados o no saturados tales como hexano, heptano, ciclohexano o limoneno, los hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, dicloroetano, dibromoetano, tetracloroetileno o clorobenceno, los disolventes apróticos polares tales como acetonitrilo, dimetil formamida o sulfóxido de dimetilo, o sus mezclas. Los disolventes preferidos son el tolueno y el acetonitrilo. El procedimiento se puede realizar a una temperatura entre 15 aproximadamente -100°C y el punto de ebullición del disolvente, preferiblemente a aproximadamente 0-70°C, lo más preferiblemente 20-60°C. La cantidad del derivado ácido **3** puede estar entre 0,85 y 20 equivalentes con respecto a **2**, y está preferiblemente entre 1 y 10 equivalentes. La enzima usada en el procedimiento es una lipasa. La lipasa puede estar en formar de células completas, enzimas nativas aisladas o inmovilizadas sobre soportes. Los ejemplos de lipasa incluyen, pero sin estar limitados a ellas, Lipasa PS (de *Pseudomonas sp*), Lipasa PS-C (de *Pseudomonas sp* inmovilizada sobre cerámica), Lipasa PS-D (de *Pseudomonas sp* inmovilizada sobre tierras diatomeas), Lipoprime 50T, Lipozyme TT, IM o Novozym 435 (de *Candida antarctica* inmovilizada sobre resina acrílica).

20 El procedimiento se puede realizar opcionalmente en presencia de varios añadidos elegidos entre los tamices moleculares y las resinas de intercambio iónico. Los preferidos particularmente son los tamices moleculares, ya que la presencia de estos materiales puede eliminar subproductos tales como el agua o alcoholes de cadena inferior generados durante la reacción. Los ejemplos de estos incluyen los tamices moleculares 3A, 4A y 5A.

25 El producto del procedimiento se puede aislar usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo extracción, filtración o cristalización. El producto **1** se puede purificar si es necesario usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo extracción, cromatografía, destilación o cristalización.

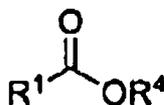
Otro procedimiento descrito implica la transesterificación de un éster **4**:



4

30

con un derivado ácido de fórmula **3**:



3

35 en presencia de una lipasa y en presencia o ausencia de un disolvente orgánico para formar el éster **1** deseado en el que el sustituyentes R del éster **4** y R¹ y R⁴ del derivado ácido **3** son como se han definido anteriormente y el sustituyentes R⁵ del éster **4** se elige entre hidrógeno y los grupos alquilo C₁-C₄ sustituidos o no sustituidos. Los ejemplos de grupos alquilo C₁-C₄ incluyen metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, i-butilo, s-butilo y similares. Los sustituyentes R⁵ preferidos incluyen hidrógeno, metilo y etilo.

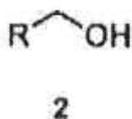
40 El procedimiento se puede realizar con o sin un disolvente adicional u opcionalmente en un disolvente inerte elegido entre los disolventes de éter cíclico o acíclico tales como dietil éter, diisopropil éter, terc-butil metil éter, o tetrahidrofurano, los hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolueno o xileno, los hidrocarburos alifáticos o alicíclicos saturados o no saturados tales como hexano, heptano, ciclohexano o limoneno, los hidrocarburos

halogenados tales como diclorometano, dicloroetano, dibromoetano, tetracloroetileno o clorobenceno, los disolventes apróticos polares tales como acetonitrilo, dimetil formamida o sulfóxido de dimetilo, o sus mezclas. Los disolventes preferidos son el tolueno y el acetonitrilo. El procedimiento se puede realizar a una temperatura entre aproximadamente -100°C y el punto de ebullición del disolvente, preferiblemente a aproximadamente 0-70°C, lo más preferiblemente 20-60°C. La cantidad del derivado ácido **3** puede estar entre 0,85 y 20 equivalentes con respecto a **4**, y está preferiblemente entre 1 y 10 equivalentes. La enzima usada en el procedimiento es una lipasa. La lipasa puede estar en formar de células completas, enzimas nativas aisladas o inmovilizadas sobre soportes. Los ejemplos de lipasa incluyen, pero sin estar limitadas a ellos, Lipasa PS (de *Pseudomonas sp*), Lipasa PS-C (de *Pseudomonas sp* inmovilizada sobre cerámica), Lipasa PS-D (de *Pseudomonas sp* inmovilizada sobre tierras diatomeas), Lipoprime 50T, Lipozyme TL IM o Novozym 435 (de *Candida antarctica* inmovilizada sobre resina acrílica).

Los procedimientos se pueden realizar opcionalmente en presencia de varios añadidos elegidos entre los tamices moleculares o las resinas de intercambio iónico. Los preferidos particularmente son las resinas de intercambio iónico. Los ejemplos de estas resinas son las resinas básicas débiles Amberlite® o Amberlyst®, tales como Amberlite IRA-95, Amberlite IRA-94 y Amberlyst A-21, aunque parece que cualquier resina básica débil será aceptable.

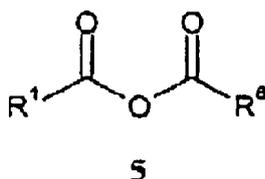
El producto del procedimiento se puede aislar usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo extracción, filtración o cristalización. El producto **1** puede ser purificado si es necesario usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo extracción, cromatografía, destilación o cristalización.

Otro procedimiento descrito implica la reacción del alcohol **2**:



20

con un anhídrido ácido de fórmula **5**:



en presencia de una lipasa y en presencia o ausencia de un disolvente orgánico para formar el éster **1** deseado en el que el sustituyentes R del alcohol **2** y R¹ del anhídrido ácido **5** son como se han definido anteriormente y el sustituyentes R⁶ del anhídrido ácido se elige entre los grupos alquilo C₁-C₂₂ saturados, de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, alqueno C₂-C₂₂ de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, dienilo C₄-C₂₂ de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, trienilo C₆-C₂₂ de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos y tetraenilo C₈-C₂₂ de cadena lineal o ramificada, sustituidos o no sustituidos, o sus mezclas. Los anhídridos ácidos preferidos incluyen aquellos en los que R¹ y R⁶ son idénticos.

El procedimiento se puede realizar con o sin un disolvente adicional u opcionalmente en un disolvente inerte elegido entre los disolventes de éter cíclico o acíclico tales como dietil éter, diisopropil éter, terc-butil metil éter, o tetrahidrofurano, los hidrocarburos aromáticos tales como benceno, tolueno o xileno, los hidrocarburos alifáticos o alicíclicos saturados o no saturados tales como hexano, heptano, ciclohexano o limoneno, los hidrocarburos halogenados tales como diclorometano, dicloroetano, dibromoetano, tetracloroetileno o clorobenceno, los disolventes apróticos polares tales como acetonitrilo, dimetil formamida, o sus mezclas. Los disolventes preferidos son el tolueno y el acetonitrilo. El procedimiento se puede realizar a una temperatura entre aproximadamente -100°C y el punto de ebullición del disolvente, preferiblemente a aproximadamente 0-70°C, lo más preferiblemente 20-60°C. La cantidad del anhídrido ácido puede estar entre 0,85 y 20 equivalentes con respecto a **2**, y está preferiblemente entre 1 y 5 equivalentes. La enzima usada en el procedimiento es una lipasa. La lipasa puede estar en formar de células completas, enzimas nativas aisladas o inmovilizadas sobre soportes. Los ejemplos de lipasa incluyen, pero sin estar limitados a ellos, Lipasa PS (de *Pseudomonas sp*), Lipasa PS-C (de *Pseudomonas sp* inmovilizada sobre cerámica), Lipasa PS-D (de *Pseudomonas sp* inmovilizada sobre tierras diatomeas), Lipoprime 50T, Lipozyme TL IM o Novozym 435 (de *Candida antarctica* inmovilizada sobre resina acrílica).

El producto del procedimiento se puede aislar usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo extracción, filtración o cristalización. El producto **1** puede ser purificado si es necesario usando métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo extracción, cromatografía, destilación o cristalización.

45

Las etapas iniciales de la biosíntesis de la melanina a partir de la tirosina en la piel de los mamíferos están catalizadas por la enzima tirosinasa. Los compuestos que inhiben la tirosinasa son eficaces para reducir la pigmentación de la piel. La capacidad de un compuesto para reducir la pigmentación de la piel puede predecirse muy eficazmente midiendo la actividad inhibitoria de la tirosinasa en un ensayo *in vitro*. Una tirosinasa purificada (generalmente de hongo) se incubaba en presencia de un sustrato de tirosinasa (L-DOPA) y se varían las concentraciones del compuesto que se quiere ensayar. La actividad dependiente de la concentración del compuesto de ensayo se mide como el grado de inhibición de la oxidación catalizada por la tirosinasa de la L-DOPA, una reacción colorimétrica. Otros métodos para ensayar la actividad de un compuesto para el aclaramiento de la piel incluyen: exponer los cultivos celulares de melanocito cultivados primariamente o inmortalizados (a menudo derivados de células murinas o humanas) a los compuestos y medir la producción de melanina; exponer un modelo de piel reconstruida que contiene melanocitos, queratinocitos y/o fibroblastos cocultivados; o aplicar el compuesto a la piel de un sujeto mamífero controlando los cambios en el color o la reflectancia de la superficie a lo largo del tiempo (por ejemplo, Virador *et al. Analytical Biochemistry* **1999**, 270, 207; Boissy *et al. Experimental Dermatology* **2005**, 14, 601).

El ensayo de inhibición de la tirosinasa es un método bien aceptado para medir la potencial actividad de aclaramiento de la piel de un compuesto de ensayo (por ejemplo, Um *et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, 11, 5345). Los ésteres de esta invención presentan una capacidad potente para inhibir la enzima tirosinasa.

Las composiciones de aclaramiento de la piel típicas para usar en el método cosmético de la invención contienen al menos 0,0001% en peso de los ésteres descritos. Por ejemplo, las composiciones pueden contener de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10,0% en peso o de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 2,0% en peso de los ésteres descritos. Se pueden emplear concentraciones menores para condiciones de hiperpigmentación menos pronunciadas y en protectores solares y bloqueadores solares usados después del tratamiento de aclaramiento de la piel, y se pueden emplear concentraciones más elevadas para condiciones de pigmentación más agudas. Los intervalos sugeridos también dependen de cualquier ingrediente adjunto empleado en las composiciones y de los tipos de piel y pigmentación del usuario así como del alcance y la severidad del problema de hiperpigmentación.

Las composiciones para el aclaramiento de la piel también pueden contener otros ingredientes para el aclaramiento de la piel además de los ésteres. Dichos otros ingredientes son conocidos para los expertos en la técnica.

Típicamente, la aplicación tópica en los sitios en la piel se realiza en asociación con un portador. Cuando se emplea, el portador es inerte en el sentido de que no produce una desactivación u oxidación del (de los) ingrediente(s) activo(s) o adjunto(s) y en el sentido de que no produce ningún efecto adverso en las áreas de la piel sobre las que se aplica. Por ejemplo, los compuestos según la presente invención se aplican mezclados con un portador o un vehículo aceptables desde el punto de vista dermatológico (por ejemplo, como una loción, crema, ungüento, jabón, barra o similares) de forma que se facilita la aplicación tópica y, en algunos casos, proporciona efectos beneficiosos adicionales que pueden producirse, por ejemplo humedecer las áreas de la piel afectadas. En la técnica se conocen muchas preparaciones, e incluyen lociones que contienen aceites y/o alcoholes y emolientes tales como aceite de oliva, aceites y ceras hidrocarbonados, aceites de silicona, otras grasas o aceites vegetales, animales o marinos, derivados de glicéridos, ácidos grasos o ésteres o alcoholes o alcohol éteres de ácidos grasos, lecitina, lanolina y derivados, alcoholes o ésteres polihídricos, ésteres de ceras, esteroides, fosfolípidos y similares, y generalmente también emulsionantes (no iónicos, catiónicos o aniónicos), aunque algunos de los emolientes presentan inherentemente propiedades emulsionantes. Estos mismos ingredientes generales se pueden formular en una crema más que en una loción o en geles o en barras sólidas mediante la utilización de proporciones diferentes de los ingredientes y/o por inclusión de agentes espesantes tales como gomas u otras formas de coloides hidrofílicos.

Ejemplos de referencia

Los procedimientos descritos se ilustran adicionalmente mediante los siguientes ejemplos de referencia.

Ejemplo de referencia 1

Preparación del acetato de 5-hidroxi-4H-piran-4-on-2-metilo (1a)

Se preparó una lechada de 2-hidroximetil-5-hidroxi-4H-piran-4-ona (**2a**; 500 mg; 3,52 mmoles) en 10 mL de acetronitrilo. Se añadió acetato de vinilo (324 μ L; 3,52 mmoles; 1,0 equiv.), seguido por 120 mg de Novozyme 435. La mezcla se calentó a 50°C durante 6 horas, momento en el que los análisis por tlc indicaron una conversión significativa a **1a**. Se añadieron 0,2 equivalentes adicionales de acetato de vinilo y la mezcla se calentó durante la noche para dar una pequeña cantidad residual de **2a**. Se añadieron 0,2 equivalente adicionales de acetato de vinilo y la mezcla se calentó a 50°C durante 12 horas hasta consumir completamente el **2a** según el análisis por tlc. La mezcla se filtró mientras estaba caliente para eliminar la enzima y el filtrado se eliminó para obtener 0,64 g (99%) de **1a**. Este compuesto fue un potente inhibidor de la tirosinasa (EC_{50} 0,0049 mM) significativamente mejor que el **2a** (EC_{50} 0,015 mM) (véase la tabla 1).

RMN de 1H (DMSO- d_6) δ 9,24 (br s, 1H); 8,08 (s, 1H); 6,47 (s, 1H); 4,93 (s, 2H); 2,10 (s, 3H).

Ejemplo de referencia 1'*Preparación del acetato de 2-hidroximetil-4H-piran-4-on-2-ilo (6a)*

Se preparó una lechada de 2-hidroximetil-5-hidroxi-4H-piran-4-ona (**2a**; 1,00 g; 7,04 mmoles) en 30 mL de diclorometano. Se añadió trietilamina (1,74 mL; 10,6 mmoles; 1,5 equiv.) y a continuación se añadió gota a gota anhídrido acético (0,69 mL; 7,04 mmoles; 1,0 equiv.). La mezcla heterogénea se hizo homogénea en 30 minutos y se agitó durante la noche para producir una mancha principal de polaridad intermedia según el análisis por tlc (eluyente de acetato de etilo) así como una mancha no polar. La mezcla de reacción se concentró y se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice ultrarrápida y se eluyó con un gradiente de disolvente de 4:1 acetato de etilo:heptano a 100% de acetato de etilo. Se recogió un corte central de la mancha intermedia, produciendo 415 mg (32%) de **6a**. Este compuesto fue un inhibidor de la tirosinasa considerablemente menos potente (EC_{50} 0,084 mM) que el **2a** (EC_{50} 0,015 mM) (véase la tabla 1).

RMN de 1H (DMSO- d_6) δ 8,46 (s, 1H); 6,42 (s, 1H); 5,77 (br s, 1H); 4,34 (br s, 2H); 2,25 (s, 3H).

Ejemplo de referencia 2*Preparación del propionato de 5-hidroxi-4H-piran-4-on-2-metilo (1b)*

Se añadieron Novozyme 435 (120 mg) y tamices moleculares 4A secos (1 g) en un matraz de 50 mL, se añadió 2-hidroximetil-5-hidroxi-4H-piran-4-ona (**2a**; 500 mg; 3,52 moles) y se lavó con 10 mL de acetonitrilo. Se añadió ácido propiónico (525 μ L; 7,04 mmoles; 2 equiv.) y la mezcla se calentó a 50°C durante la noche momento en el que los análisis de tlc (eluyente: acetato de etilo) indicaron la conversión a **1b**. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El producto bruto se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice ultrarrápida y se eluyó con 4:1 de acetato de etilo:heptano para producir 285 mg (41%) de **1b**. Este compuesto fue un potente inhibidor de la tirosina (EC_{50} 0,0046 mM) significativamente mejor que **2a** (EC_{50} 0,015 mM) (véase la tabla 1).

RMN de 1H (DMSO- d_6) δ 9,25 (br s, 1H); 8,09 (s, 1H); 6,46 (s, 1H); 4,95 (s, 2H); 2,42 (q, 2H, J = 7,42 Hz); 1,04 (t, 3H, J = 7,42 Hz).

Ejemplo de referencia 3

Preparación del propionato de 5-hidroxi-4H-piran-4-on-2-metilo (1b) por esterificación enzimática usando anhídrido propiónico

Se preparó una lechada de 2-hidroximetil-5-hidroxi-4H-piran-4-ona (**2a**; 500 mg; 3,52 mmoles) en 10 mL de acetonitrilo y se añadió anhídrido acético (0,54 mL; 4,2 mmoles; 1,2 equiv.). Se añadió Novozyme 435 (120 mg) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5,5 horas hasta convertir casi completamente el **2a** a **1b** según los análisis por HPLC y tlc (eluyente: acetato de etilo). La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El producto bruto se disolvió en acetato de etilo y se diluyó con heptano para producir un precipitado que se recogió, se lavó con heptano y se secó. Este filtrado se concentró hasta sequedad y el sólido resultante se trituró con heptano, se filtró, se lavó con heptano y se secó. Los sólidos combinados (576 mg; 83%) se analizaron como **1b** puro por RMN de 1H .

Ejemplo de referencia 2'*Preparación del propionato de 2-hidroximetil-4H-piran-4-on-5-ilo (6b)*

Se preparó una lechada de 2-hidroximetil-5-hidroxi-4H-piran-4-ona (**2a**; 852 mg; 6,00 mmoles) en 30 mL de diclorometano. Se añadió trietilamina (1,25 mL; 9,0 mmoles; 1,5 equiv.) y a continuación se añadió gota a gota anhídrido propiónico (0,77 mL; 6,0 mmoles; 1,0 equiv.) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se hizo homogénea en un minuto y se agitó durante la noche para producir una mancha principal por tlc (eluyente: acetato de etilo). Se eliminaron los volátiles y el residuo se diluyó con acetato de etilo y se lavó con HCl 1M (15 mL) y bicarbonato de sodio saturado (15 mL). Se secó la disolución orgánica con sulfato de magnesio y se concentró para obtener 0,92 g de producto bruto. Al análisis del producto bruto por RMN de 1H indicó una pequeña cantidad de **2a**, una pequeña cantidad de dipropionato de **2a** (**7b**) y una relación de 90:10 entre el **6b** y el **1b**. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice ultrarrápida y se eluyó con 1:1 acetato de etilo:heptano a 4:1 acetato de etilo:heptano para obtener 476 mg (40%) de **6b**. Este compuesto fue un inhibidor de la tirosinasa considerablemente menos potente (EC_{50} 0,10 mM) que el **2a** (EC_{50} 0,015 mM) (véase la tabla 1).

RMN de 1H (DMSO- d_6) δ 8,46 (s, 1H); 6,42 (t, 1H, J = 0,82 Hz); 5,76 (t, 1H, J = 6,05 Hz); 4,34 (dd, 2H, J = 0,82, 6,05 Hz); 2,58 (q, 2H, J = 7,42 Hz); 1,11 (t, 3H, J = 7,42 Hz).

Ejemplo de Referencia 3'*Preparación del propionato de 2-propioniloximetil-4H-piran-4-on-5-ilo (7b)*

Se preparó una lechada de 2-hidroximetil-5-hidroxi-4H-piran-4-ona (**2a**; 852 mg; 6,00 mmoles) en 30 mL de diclorometano. Se añadió trietilamina (2,51 mL; 18,0 mmoles; 3 equiv.) y a continuación se añadió gota a gota anhídrido propiónico (1,69 mL; 13,2 mmoles; 2,2 equiv.) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se hizo homogénea en un minuto y se agitó durante la noche para producir una mancha principal por tlc (eluyente: acetato de etilo). Se eliminaron los volátiles y el residuo se diluyó con acetato de etilo y se lavó con HCl 1M (15 mL) y bicarbonato de sodio saturado (15 mL). La disolución orgánica se secó con sulfato de magnesio y se concentró para obtener 2,30 g de producto bruto que se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice ultrarrápida y se eluyó con 1:1 acetato de etilo:heptano para obtener 1,39 g (97%) de **7b**. Este compuesto fue un inhibidor de la tirosinasa considerablemente menos potente (EC_{50} 0,097 mM) que el **2a** (EC_{50} 0,015 mM) (véase la tabla 1).

10 RMN de 1H (DMSO- d_6) δ 8,52 (s, 1H); 6,59 (s, 1H); 5,01 (s, 1H); 2,59 (q, 2H, J = 7,42 Hz); 2,44 (q, 2H, J = 7,42 Hz); 1,11 (t, 3H, J = 7,42 Hz); 1,05 (t, 3H, J = 7,42 Hz).

Ejemplo de referencia 4

Preparación del hexanoato de 5-hidroxi-4H-piran-4-on-2-metilo (1c) por esterificación enzimática usando anhídrido hexanoico

15 Se preparó una lechada de 2-hidroximetil-5-hidroxi-4H-piran-4-ona (**2a**; 500 mg; 3,52 mmoles) en 10 mL de acetonitrilo y se añadió anhídrido hexanoico (0,81 mL; 3,52 mmoles; 1,0 equiv.). Se añadió Novozyme 435 (120 mg) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche para obtener un 85% de conversión del **2a** a **1c** según los análisis por HPLC. Se añadió anhídrido hexanoico adicional (0,12 mL; 0,53 mmoles; 0,15 equiv.) y la mezcla se agitó durante la noche para obtener 98% de conversión de **2a** en **1c**. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida a temperatura ambiente. El residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó con agua (10 mL) y una disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (3 x 10 mL). La disolución orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró para obtener **1c** (761 mg; 90%) como un sólido blancuzco. Este compuesto fue un inhibidor de la tirosinasa muy potente (EC_{50} 0,00098 mM) significativamente mejor que **2a** (EC_{50} 0,015 mM) (véase la Tabla 1).

25 RMN de 1H (DMSO- d_6) δ 9,25 (br s, 1H); 8,08 (s, 1H); 6,45 (s, 1H); 4,95 (s, 2H); 2,39 (t, 2H, J = 7,42 Hz); 1,59-1,49 (m, 2H); 1,31-1,20 (m, 4H); 0,85 (m, 3H).

Ejemplo de referencia 5

Preparación de octanoato de 5-hidroxi-4H-piran-4-on-2-metilo (1d)

30 Se añadieron Novozyme 435 (500 mg; 50% en peso) y tamices moleculares 4A secos (2 g; 2 equiv. en peso) en un matraz. Se añadió 2-hidroximetil-5-hidroxi-4H-piran-4-ona (**2a**; 1,00 g; 7,04 mmoles) y se lavó con 20 mL de acetonitrilo. Se añadió ácido octanoico (2,23 mL; 14,07 mmoles; 2 equiv.) y la mezcla se calentó a 50°C durante la noche, momento en el que el análisis por tlc (eluyente: acetato de etilo) indicó la conversión a **1d**. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El producto bruto se disolvió en acetato de etilo y se lavó con agua (10 mL), bicarbonato de sodio saturado (2 x 10 mL), se secó con sulfato de magnesio y se concentró para obtener 1,81 g de un aceite incoloro. Este aceite se disolvió en heptano y se concentró para obtener una cera sólida. El sólido se trituró con heptano, se filtró, se lavó con heptano y se secó para obtener 0,79 g (42%) de **1d**. Este compuesto fue un inhibidor de la tirosinasa muy potente (EC_{50} 0,00039 mM) significativamente mejor que **2a** (EC_{50} 0,015 mM) (véase la Tabla 1).

40 RMN de 1H (DMSO- d_6) δ 9,24 (br s, 1H); 8,07 (s, 1H); 6,45 (s, 1H); 4,95 (s, 2H); 2,390 (t, 2H, J = 7,15 Hz); 1,53 (m, 2H); 1,24 (m, 8H); 0,85 (m, 3H).

Ejemplo de referencia 6

Preparación de octanoato de 5-hidroxi-4H-piran-4-on-2-metilo (1d) por esterificación enzimática usando anhídrido octanoico

45 Se preparó una lechada de 2-hidroximetil-5-hidroxi-4H-piran-4-ona (**2a**; 1,04 g; 7,32 mmoles) en 20 mL de acetonitrilo y se añadió anhídrido octanoico (2,90 mL; 8,05 mmoles; 1,1 equiv.). Se añadió Novozyme 435 (0,33 g) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas para consumir completamente el **2a** según los análisis por HPLC. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida a temperatura ambiente. El residuo se disolvió en heptano y se lavó con una mezcla 1:1:1 de agua:bicarbonato de sodio acuoso saturado:metanol (3 x 30 mL). La disolución orgánica se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró y se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice ultrarrápida y se eluyó con 2:1 de acetato de etilo:heptano para obtener 1,91 g de una mezcla de **1d** y ácido octanoico. El material se recrystalizó en un volumen mínimo de heptano caliente por enfriamiento a temperatura ambiente para obtener 1,38 g (70%) de **1d**.

Ejemplo de referencia 4'

Preparación del octanoato de 2-hidroximetil-4H-piran-4-on-5-ilo (6d)

Se preparó una lechada de yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio (1,84 g; 7,19 mmoles; 1,2 equiv.) y ácido octanoico (0,95 mL; 6,00 mmoles; 1,0 equiv.) en 10 mL de diclorometano. Se añadió trietilamina (2,01 mL; 14,39 mmoles; 2,4 equiv.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió 2-hidroximetil-5-hidroxi-4H-piran-4-ona (**2a**; 852 mg; 6,00 mmoles) y se lavó con 5 mL de diclorometano. La mezcla se decoloró pasando de una lechada amarilla a una de color tostado en aproximadamente 30 minutos. La mezcla de reacción se agitó a lo largo de la noche a temperatura ambiente para obtener una mancha mayoritaria y una minoritaria por tlc (3:2 acetato de etilo:heptano). Esta mezcla se filtró y el precipitado se lavó con diclorometano. El filtrado combinado se concentró y el residuo se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice ultrarrápida y se eluyó con un gradiente de disolvente de 3:2 a 4:1 de acetato de etilo:heptano para obtener 864 mg (54%) de **6d**. Este compuesto fue un inhibidor de la tirosinasa considerablemente menos potente (EC_{50} 0,18 mM) que el **2a** (EC_{50} 0,015 mM) (véase la tabla 1).

RMN de 1H (DMSO- d_6) δ 8,45 (s, 1H); 6,42 (s, 1H); 5,76 (t, 1H, J = 6,05 Hz); 4,34 (d, 2H, J = 5,50 Hz); 2,54 (t, 2H, J = 7,15 Hz); 1,65-1,55 (m, 2H); 1,38-1,25 (m, 8H); 0,86 (t, 3H, J = 6,60 Hz).

Ejemplo de referencia 5'

Preparación del octanoato de 2-octanoiloximetil-4H-piran-4-on-5-ilo (7d)

Se preparó una lechada de yoduro de 2-cloro-1-metilpiridinio (2,16 g; 8,44 mmoles; 2,4 equiv.) y ácido octanoico (1,28 mL; 8,44 mmoles; 2,4 equiv.) en 10 mL de diclorometano. Se añadió trietilamina (2,35 mL; 16,9 mmoles; 4,8 equiv.) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió 2-hidroximetil-5-hidroxi-4H-piran-4-ona (**2a**; 500 mg; 3,52 mmoles) y se lavó con 5 mL de diclorometano. La mezcla inicialmente era una disolución amarilla casi homogénea y a continuación se convirtió en una lechada de color tostado en aproximadamente 30 minutos. La mezcla de reacción se agitó a lo largo de la noche a temperatura ambiente para obtener una única mancha por tlc (3:2 acetato de etilo:heptano). Esta mezcla se filtró y el precipitado se lavó con diclorometano. El filtrado combinado se concentró y el residuo se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice ultrarrápida y se eluyó con 2:1 de acetato de etilo:heptano para obtener 1,07 g (83%) de **7d**. Este compuesto fue un inhibidor débil de la tirosinasa (EC_{50} > 1,0 mM) (véase la tabla 1).

RMN de 1H (DMSO- d_6) δ 8,51 (s, 1H); 6,57 (s, 1H); 5,00 (s, 2H); 2,55 (t, 2H, J = 7,42 Hz); 2,41 (t, 2H, J = 7,42 Hz); 1,62-1,49 (m, 4H); 1,30-1,25 (m, 16H); 0,88-0,83 (m, 6H).

Ejemplo de referencia 7

Preparación del lipoato de 5-hidroxi-4H-piran-4-on-2-metilo (1e)

Se añadieron Novozyme 435 (400 mg; 80% en peso) y tamices moleculares 4A secos (1 g; 2 equiv. en peso) en un matraz. Se añadió 2-hidroximetil-5-hidroxi-4H-piran-4-ona (**2a**; 500 mg; 3,52 mmoles) y se lavó con 10 mL de acetonitrilo. Se añadió ácido lipoico (1,0 g; 4,85 mmoles; 1,38 equiv.) y la mezcla se calentó a 50°C durante la noche, momento en el que el análisis por tlc (eluyente: acetato de etilo) indicó la conversión a **1e**. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida. El producto bruto se disolvió en acetato de etilo y se lavó con bicarbonato de sodio saturado (2 x 10 mL), se secó con sulfato de magnesio y se concentró. El producto bruto se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice ultrarrápida y se eluyó con 4:1 de acetato de etilo:heptano para obtener 350 mg (30%) de **1e**. Este compuesto fue un inhibidor de la tirosinasa muy potente (EC_{50} 0,00093 mM) significativamente mejor que **2a** (EC_{50} 0,015 mM) (véase la Tabla 1).

RMN de 1H (DMSO- d_6) δ 9,20 (br s, 1H); 8,08 (s, 1H); 6,46 (s, 1H); 4,95 (s, 2H); 3,65-3,56 (m, 1H); 3,23-3,06 (m, 2H); 2,46-2,35 (m, 1H); 2,21 (t, 2H, J = 7,15 Hz); 1,92-1,80 (m, 1H); 1,68-1,46 (m, 4H); 1,42-1,32 (m, 2H).

Ejemplo de referencia 8

Preparación del acetato de 4-hidroxibencilo (1f)

Se preparó una lechada de alcohol 4-hidroxibencilico (**2b**) (3,5 g; 28,2 mmoles) en 20 mL de acetonitrilo. Se añadió acetato de vinilo (3,64 mL; 39,5 mmoles; 1,4 equiv.) seguido por Novozyme 435 (500 mg; 14% en peso). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 horas, momento en el que el análisis por tlc (eluyente: 1:1 de acetato de etilo:heptano) indicó que no había **2b** y una única mancha no polar grande. La mezcla de reacción se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida para obtener 4,67 g (99%) de **1f**. Este compuesto fue un inhibidor de la tirosinasa (EC_{50} 0,038 mM) y fue más potente que **2b** (EC_{50} 0,19 mM) (véase la Tabla 1).

RMN de 1H (DMSO- d_6) δ 9,6 (br s, 1H); 7,17 (m, 2H); 6,74 (m, 2H); 4,93 (s, 2H); 2,01 (s, 3H).

Ejemplo de referencia 6'

Preparación del alcohol 4-acetoxibencilico (6f)

Se preparó una lechada de alcohol 4-hidroxibencilico (**2b**) (500 mg; 4,03 mmoles) en 15 mL de acetonitrilo. Se añadió trietilamina (0,84 mL; 6,04 mmoles; 1,5 equiv.) y a continuación se añadió gota a gota anhídrido acético (0,39 mL; 4,03 mmoles; 1,0 equiv.). La mezcla heterogénea se hizo homogénea en 30 minutos y se agitó durante la noche

a temperatura ambiente para obtener la conversión parcial a **6f** según análisis por tlc (1:1 de acetato de etilo:heptano). La mezcla de reacción se concentró y el residuo se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice ultrarrápida y se eluyó con 3:2 heptano:acetato de etilo para obtener 390 mg (58%) de **6f**. Este compuesto fue un inhibidor de la tirosinasa menos potente (EC_{50} 0,92 mM) que **2b** (EC_{50} 0,19 mM) (véase la Tabla 1).

- 5 RMN de 1H (DMSO- d_6) δ 7,34 (d, 2H, J = 7,97 Hz); 7,06 (m, 2H); 5,215 (t, 1H, J = 5,77 Hz); 4,49 (d, 2H, J = 5,77 Hz); 2,26 (s, 3H).

Ejemplo de referencia 9

Preparación del propionato de 4-hidroxibencilo (1g)

- 10 Se disolvió alcohol 4-hidroxibencílico (**2b**) (530 mg; 4,27 mmoles) en 14 mL de acetonitrilo. Se añadió ácido propiónico (2,0 mL; 26,8 mmoles; 6,3 equiv.) y se añadieron Novozyme 435 (625 mg; 1,17 equiv. en peso) y tamices moleculares 4A secos (900 mg; 1,7 equiv. en peso). La mezcla de reacción se agitó y se calentó a 50°C durante la noche, momento en el que el análisis por HPLC indicaba aproximadamente 30% de conversión a **1g**. La mezcla de reacción se filtró y el precipitado se lavó con acetonitrilo y tolueno. El combinado de filtrado/lavado se concentró y el residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó con bicarbonato de sodio saturado (10 mL). La disolución orgánica se secó con sulfato de magnesio, se concentró y el residuo se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice ultrarrápida y se eluyó con 1:4 de acetato de etilo:heptano para obtener 185 mg (24%) de **1g**. Este compuesto fue un inhibidor potente de la tirosinasa (EC_{50} 0,017 mM), significativamente mejor que **2b** (EC_{50} 0,19 mM) (véase la Tabla 1).

- 20 RMN de 1H (DMSO- d_6) δ 9,50 (s, 1H); 7,17 (d, 2H, J = 8,25 Hz); 6,74 (d, 2H, J = 7,97 Hz); 4,94 (s, 2H); 2,31 (2H, q, J = 7,42 Hz); 1,02 (t, 3H, J = 7,42 Hz).

Ejemplo de referencia 10

Preparación del propionato de 4-hidroxibencilo (1g) por esterificación enzimática con anhídrido propiónico

- 25 Se disolvió alcohol 4-hidroxibencílico (**2b**) (5,00 g; 40,3 mmoles) en 100 mL de acetonitrilo. Se añadió anhídrido propiónico (6,20 mL; 48,3 mmoles; 1,2 equiv.) seguido por Novozyme 435 (0,25 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas hasta convertir casi completamente el **2b** en **1g** según el análisis por HPLC. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida a temperatura ambiente. El residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó con una disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (2 x 25 mL). La disolución orgánica se secó con sulfato de magnesio y se concentró y el producto bruto se filtró a través de un almohadilla de gel de sílice ultrarrápida para obtener **1h** (5,84 g; 80%) como un aceite incoloro.

- 30 Ejemplo de referencia 7'

Preparación de alcohol 4-propioniloxibencílico (6g)

- 35 Se preparó una lechada de alcohol 4-hidroxibencílico (**2b**) (500 mg; 4,03 mmoles) en 15 mL de diclorometano. Se añadió trietilamina (0,84 mL; 6,04 mmoles; 1,5 equiv.) y a continuación se añadió gota a gota anhídrido propiónico (0,52 mL; 4,03 mmoles; 1,0 equiv.) y la mezcla heterogénea se hizo homogénea en un minuto. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche para obtener una mancha mayoritaria y una minoritaria según el análisis por tlc (1:1 acetato de etilo:heptano). La mezcla se concentró y el residuo se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice ultrarrápida y se eluyó con 3:2 de heptano:acetato de etilo para obtener 442 mg (61%) de **6g**. Este compuesto fue un inhibidor de la tirosinasa menos potente (EC_{50} 1,01 mM) que el **2b** (EC_{50} 0,015 mM) (véase la tabla 1).

- 40 RMN de 1H (DMSO- d_6) δ 7,34 (m, 2H); 7,06 (m, 2H); 5,22 (br t, 1H); 4,49 (d, 2H, J = 4,94 Hz); 2,59 (2H, q, J = 7,42 Hz); 1,13 (t, 3H, J = 7,42 Hz).

Ejemplo de referencia 8'

Preparación del propionato de 4-propioniloxibencilo (7g)

- 45 Se preparó una lechada de alcohol 4-hidroxibencílico (**2b**) (500 mg; 4,03 mmoles) en 15 mL de diclorometano. Se añadió trietilamina (1,40 mL; 10,1 mmoles; 2,5 equiv.) y a continuación se añadió gota a gota anhídrido propiónico (1,14 mL; 8,9 mmoles; 2,2 equiv.). La mezcla heterogénea se hizo homogénea en 15 minutos y se agitó durante la noche a temperatura ambiente para obtener una única mancha no polar según el análisis por tlc (1:1 acetato de etilo:heptano). La mezcla de reacción se concentró y el residuo se disolvió en acetato de etilo. La disolución orgánica se lavó con HCl 1,5M (20 mL) y bicarbonato de sodio saturado (10 mL) y se secó sobre sulfato de magnesio. La concentración de esta disolución orgánica permitió obtener 923 mg (97%) de **7g**. Este compuesto fue un inhibidor débil de la tirosinasa (EC_{50} > 10 mM) (véase la tabla 1).

- 50 RMN de 1H (DMSO- d_6) δ 7,40 (m, 2H); 7,12 (m, 2H); 5,08 (s, 2H); 2,60 (q, 2H, J = 7,42 Hz); 2,37 (q, 2H, J = 7,42 Hz); 1,13 (t, 3H, J = 7,42 Hz); 1,04 (t, 3H, J = 7,42 Hz).

Ejemplo de referencia 11*Preparación del hexanoato de 4-hidroxibencilo (1h) por esterificación enzimática con anhídrido hexanoico*

Se disolvió alcohol 4-hidroxibencílico (**2b**) (500 mg; 4,03 mmoles) en 10 mL de acetonitrilo. Se añadió anhídrido hexanoico (1,12 mL; 4,83 mmoles; 1,2 equiv.) seguido por Novozyme 435 (120 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 7,5 horas hasta convertir casi completamente el **2b** en **1h** según el análisis por HPLC. La mezcla se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida a temperatura ambiente. El residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó con una disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (3 x 10 mL). La disolución orgánica se secó con sulfato de magnesio y se concentró para obtener **1h** (832 mg; 93%) como un aceite incoloro. Este compuesto fue un potente inhibidor de la tirosinasa (EC₅₀ 0,043 mM) y fue un inhibidor mejor que **2b** (EC₅₀ 0,19 mM) (véase la Tabla 1).

RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 9,49 (s, 1H); 7,17-7,14 (m, 2H); 6,76-6,71 (m, 2H); 4,94 (s, 2H); 2,28 (t, 2H, J = 7,42 Hz); 1,56-1,46 (m, 2H); 1,31-1,21 (m, 4H); 0,83 (m, 3H).

Ejemplo de referencia 12*Preparación del octanoato de 4-hidroxibencilo (1i)*

Se disolvió alcohol 4-hidroxibencílico (**2b**) (250 mg; 2,02 mmoles) en 5 mL de acetonitrilo. Se añadió ácido octanoico (500 µL; 3,3 mmoles; 1,63 equiv.) seguido por Novozyme 435 (200 mg; 80% en peso) y tamices moleculares 4A (500 mg; 2 equiv. en peso). La mezcla se agitó y se calentó a 50°C durante la noche. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y el precipitado se lavó con acetonitrilo. El filtrado combinado se concentró y el residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó con bicarbonato de sodio saturado (2 x 10 mL). La disolución orgánica se secó (sulfato de magnesio) y se concentró y el producto bruto se filtró a través de un almohadilla de gel de sílice ultrarrápida y se eluyó con 1:4 de acetato de etilo:heptano para obtener 960 mg de **1i** que contenía un poco de ácido octanoico residual.

RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 9,48 (br s, 1H); 7,18-7,13 (m, 2H); 6,75-6,71 (m, 2H); 4,94 (s, 2H); 2,28 (t, 2H, J = 7,42 Hz); 1,51 (m, 2H); 1,22 (m, 8H); 0,84 (m, 3H).

Ejemplo de referencia 13*Preparación del octanoato de 4-hidroxibencilo (1i) por transesterificación*

Se disolvió acetato de 4-hidroxibencilo (**1f**) (83 mg; 0,50 mmoles) en 1,5 mL de tolueno. Se añadió ácido octanoico (158 µL; 1,0 mmoles; 2,0 equiv.) seguido por Novozyme 435 (60 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, momento en el que el análisis por HPLC indicó 58,1% de conversión en **1i** (también se observaron 40,4% de **1f** y 1,4% de alcohol 4-hidroxibencílico).

Ejemplo de referencia 14*Preparación del octanoato de 4-hidroxibencilo (1i) por transesterificación en presencia de Amberlyst A-21*

Se combinaron acetato de 4-hidroxibencilo (**1f**) (83 mg; 0,50 mmoles) y Amberlyst A-21 (83 mg; 1 equiv. en peso) en 1,5 mL de tolueno. Se añadió ácido octanoico (158 µL; 1,0 mmoles; 2,0 equiv.) seguido por Novozyme 435 (60 mg). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche, momento en el que el análisis por HPLC indicó 88,2% de conversión en **1i** (también se observaron 11,1% de **1f** y 0,8% de alcohol 4-hidroxibencílico).

Ejemplo de referencia 15*Preparación del lipoato de 4-hidroxibencilo (1j)*

Se disolvió alcohol 4-hidroxibencílico (**2b**) (520 mg; 4,19 mmoles; 1,24 equiv.) en 10 mL de acetonitrilo. Se añadió ácido lipoico (0,70 g; 3,39 mmoles) seguido por Novozyme 435 (150 mg) y tamices moleculares 4A (1 g). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y el precipitado se lavó con acetonitrilo. El filtrado combinado se concentró y el residuo se disolvió en acetato de etilo y se lavó con bicarbonato de sodio saturado (2 x 10 mL). La disolución orgánica se secó (MgSO₄) y se concentró y el producto bruto se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice ultrarrápida y se eluyó con 1:4 de acetato de etilo:heptano para obtener 184 mg (16%) de **1j**.

RMN de ¹H (DMSO-d₆) δ 9,50 (s, 1H); 7,18-7,14 (m, 2H); 6,75-6,70 (m, 2H); 4,94 (s, 2H); 3,62-3,52 (m, 1H); 3,27-3,06 (m, 2H); 2,43-2,35 (m, 1H); 2,31 (t, 2H, J = 7,15 Hz); 1,89-1,78 (m, 1H); 1,68-1,46 (m, 4H); 1,39-1,23 (m, 2H).

Ejemplo de referencia 16

Preparación de la 2-aciloximetil-5-hidroxi-4H-piran-4-ona a partir de una mezcla de ésteres de ácidos grasos sin disolvente (1k)

Se añadieron Novozyme 435 (100 mg) y 2-hidroximetil-5-hidroxi-4*H*-piran-4-ona (**2a**; 100 mg; 0,7770 mmoles) en un matraz y se añadieron 2 mL de etil ésteres mezclados de aceite de fruta de la pasión. La mezcla se calentó a 60°C durante la noche, momento en el que el análisis por tlc (eluyente: acetato de etilo) indicó una conversión significativa a **1k**.

5 La tirosinasa es responsable de catalizar las primeras dos etapas de la vía biosintética que lleva de la tirosina a la melanina. Hidroxila la tirosina a dihidroxifenilalanina (L-DOPA) y subsiguientemente oxida la L-DOPA a dopaquinona. El presente método para determinar la actividad inhibitoria de la tirosinasa de varios compuestos se centra en la etapa de oxidación de la L-DOPA a dopaquinona por la aparición espectrofotométrica de la dopaquinona a 475 nm. El ensayo enzimático se basa principalmente en el método descrito en Zhang, J. T., Chen Q. X., Song K. K. y Xie J., *J. Food Chemistry* **2006**, 95, 579-584.

10 Se evaluó la solubilidad de los compuestos de interés en un medio acuoso y se prepararon diluciones apropiadas preparadas bien en agua o bien en sulfóxido de dimetilo. Se preparó un amplio intervalo a partir de disoluciones madre, generalmente para medir concentraciones finales del inhibidor de 10nM a 10mM.

15 La mezcla de ensayo se compone de Na₂HPO₄ 50mM/NaH₂PO₄ pH 7,0 y L-DOPA 0,5mM. La reacción enzimática se inicia mediante la adición de 18 unidades de tirosinasa de champiñón (Sigma T3824). Se midió la tasa inicial de línea base a 475 nm usando un espectrofotómetro UV/visible Beckman Coulter DU 800 en formato de reacción de 1 mL a 30°C, a continuación se añade/mezcla una alícuota de 25 µL de disolución del inhibidor y se anota el cambio en la tasa. El cambio en la tasa se relaciona con el porcentaje de inhibición de la tirosinasa debido a la presencia del inhibidor. Los efectos inhibitorios de cualquier cantidad de DMSO que pueda haber presente se minimizan limitando la concentración final a 2,5% y teniendo en cuenta cualquier inhibición residual con blancos de DMSO para cada ensayo.

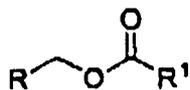
20 El grado de inhibición de la tirosinasa se midió en términos de la concentración del inhibidor necesaria para inhibir la tirosinasa en 50%, el valor EC₅₀. Este se determinó mediante curvas sigmoidales de dosis-respuesta generadas mediante un Graphalmohadilla Prizm® Versión 4, representando el logaritmo de la concentración de inhibidor frente a la tasa (% de inhibición). Los datos de los diferentes ejemplos se muestran en la tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Valores de inhibición de la tirosinasa

Compuesto	EC ₅₀ (milimolar)		Compuesto	EC ₅₀ (milimolar)
2a	0,015		2b	0,19
1a	0,0049		1f	0,038
6a	0,084		6f	0,92
1b	0,0046		1g	0,017
6b	0,10		6g	1,01
7b	0,097		7g	> 10
1c	0,00098		1h	0,049
1d	0,00039			
6d	0,18			
7d	> 1,0			
1e	0,00093			

REIVINDICACIONES

1.- Un método cosmético para el aclaramiento de la piel que comprende la aplicación en un lugar en la piel de una composición que comprende un compuesto éster representado por la fórmula 1:



1

;

5 y un portador aceptable desde el punto de vista cosmético

en el que R se elige entre el grupo que consiste en un hidroxiarilo carbocíclico C₆-C₂₂ sustituido o no sustituido, y

R¹ se elige entre el grupo que consiste en un alquilo C₁-C₂₂, alquenilo C₂-C₂₂, dienilo C₄-C₂₂, trienilo C₆-C₂₂, tetraenilo C₈-C₂₂ y sus mezclas.