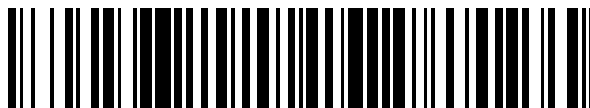


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 155**

21 Número de solicitud: 201200403

51 Int. Cl.:

C07D 309/40 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

17.04.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

21.10.2013

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

(100.0%)

Avda. Séneca 2

28040 Madrid ES

72 Inventor/es:

MARTÍNEZ RODRÍGUEZ, Mercedes;

ARACIL MIRA, José ;

EL BOULIFI, Nourdeddin y

SERRANO MARTÍNEZ, Marta

74 Agente/Representante:

PLUMET ORTEGA, Joaquín

54 Título: **Procedimiento enzimático para la obtención de 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona con actividad antioxidante**

57 Resumen:

Procedimiento enzimático para la obtención de 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona con actividad antioxidante. Los derivados del ácido kójico, que se emplea como antioxidante y agente blanqueador en cosmética, tienen por objeto mejorar algunas de sus propiedades tales como la estabilidad y solubilidad. En esta invención se describe el procedimiento de obtención un derivado del ácido kójico a través de su esterificación en la posición C-7 con un ácido graso de aceite de ricino empleando lipasas inmovilizadas como catalizador. En el proceso no se emplean disolventes y se alcanzan conversiones superiores al 80% tras 5 horas de reacción. El ricinoleato de ácido kójico obtenido puede emplearse como antioxidante; de forma concreta, se puede emplear como estabilizante del biodiesel de colza y aceites de semilla similares frente a la oxidación.

ES 2 426 155 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento enzimático para la obtención de 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona con actividad antioxidante.

5 **Resumen**

Procedimiento enzimático para la obtención de 12-hidroxi-9-cis-octadecenoato de 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona con actividad antioxidante.

10 Los derivados del ácido kójico, que se emplea como antioxidante y agente blanqueador en cosmética, tienen por objeto mejorar algunas de sus propiedades tales como la estabilidad y solubilidad. En esta invención se describe el procedimiento de obtención un derivado del ácido kójico a través de su esterificación en la posición C-7 con un ácido graso de aceite de ricino
15 empleando lipasas inmovilizadas como catalizador. En el proceso no se emplean disolventes y se alcanzan conversiones superiores al 80% tras 5 horas de reacción. El ricinoleato de ácido kójico obtenido puede emplearse como antioxidante; de forma concreta, se puede emplear como estabilizante del biodiesel de colza y aceites de semilla similares frente a la oxidación.

20

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un nuevo derivado del ácido kójico, su método de obtención y su uso como antioxidante. De manera más concreta, la
25 invención describe ester de ácido kójico obtenido a partir de un ácido graso de aceite de ricino empleando lipasas como catalizador y su uso como estabilizante de biodiesel frente a la oxidación.

Estado de la Técnica

30 El ácido kójico (5-hidroxi-2-hidroximetil-4-pirona) (fórmula II) es una γ -pirona natural que se produce biológicamente por diferentes tipos de hongos (*Penicillium* y *Aspergillus*) durante la fermentación aeróbica utilizando diversos sustratos.

Se utiliza generalmente como agente blanqueador en cosmética debido a su efecto inhibitorio sobre la acción de la tirosinasa, una enzima implicada en la formación de la melanina, que es un factor importante en la determinación del color de la piel humana. Basándose en la actividad inhibidora de tirosinasa, el ácido kójico es ampliamente utilizado en formulaciones cosméticas para la prevención de la hiperpigmentación, tales como los lunares y las pecas (JP5618569). Sin embargo, el ácido kójico es extremadamente inestable con respecto al calor y a su oxidación en agua, cuando se añade a los agentes tópicos de uso dermatológico descomponiéndose con el tiempo y causando coloración. Además, el ácido kójico es soluble en agua y su aplicación en alimentos aceitosos o cosméticos es limitada.

Para superar estos problemas, la patente japonesa JP5492632 revela métodos para mejorar las propiedades del ácido kójico, tales como la estabilidad de almacenamiento, compatibilidad, solubilidad, etc. Además, las patentes JP623820, JP6483008, JP1121205 y JP2028105 describen nuevas composiciones incorporando diversos aditivos para mejorar la solubilidad del ácido kójico y aumentar la actividad de blanqueo de la piel.

Por otra parte, las patentes JP539298, JP6056872, JP5039298 y JP4187618 describen la síntesis de varios derivados del ácido kójico, tales como éteres kójico y ácido kójico glucosilado. Estos derivados, además de tener una alta solubilidad en agua, tienen una fuerte actividad inhibidora de la tirosinasa.

Otros nuevos derivados del ácido kójico son los ésteres del ácido kójico y ácidos grasos. Estos compuestos también se utilizan en cosmética como componentes activos de formulaciones despigmentantes y antienvjecimiento. Además de tener alta estabilidad al pH, luz, calor, etc. tienen mejor estabilidad durante el almacenamiento y son solubles en aceite.

Un ejemplo de síntesis de derivados de ácido kójico a base de ácidos grasos se describe en el documento JP56077272 mediante la esterificación del ácido kójico con derivados de ácidos carboxílicos (butírico, caproico, caprílico, cabrico y oleico) en presencia de piridina. Los rendimientos de los ésteres

- correspondientes son bajos y en ningún caso superan el 45%. El documento CN101759676 describe un nuevo caso de síntesis de derivados de ácido kójico a base de ácidos grasos obteniéndose el ácido kójico dipalmitato por reacción del ácido palmítico con agente de cloración tal como PCl_5 en presencia de disolvente orgánico seguido de acilación del ácido kójico con cloruro de ácido obtenido en presencia de piridina. Otra aproximación a la síntesis de derivados del ácido kójico se recoge en la patente US4369174 donde se obtienen dos compuestos: mono- y di-éster de ácido kójico. La síntesis de monoéster se lleva a cabo por reacción del ácido kójico con ácidos carboxílicos alifáticos en presencia de cloruro de zinc como catalizador a alta temperatura mientras que la síntesis de diéster se lleva a cabo mediante la reacción de esterificación de ácido kójico con haluros de ácidos carboxílicos alifáticos en presencia de piridina a baja temperatura.
- 15 Por otro lado, la patente EP0320132 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 a un mayor rendimiento, obteniéndose conversiones próximas al 90% en la esterificación de ácido graso con un monoalcohol o un poliol. Esta patente se refiere, de forma general, al uso de la enzima en procesos de esterificación sin estar orientada a la obtención de un producto concreto.
- 25 El uso de enzimas inmovilizadas para la esterificación del ácido kójico con ácidos grasos elimina los problemas inherentes asociados con el uso de catalizadores químicos. Lui, K.-J. y Shaw, J.-F. (*JAOCS*, 75(11), **1998**) mejoraron la propiedad lipofílica del ácido kójico mediante la esterificación del ácido kójico y ácido láurico y el ácido oleico utilizando lipasa de *Candida atartctica* y *Pseudomonas capacia*. En este caso, la esterificación se produce en presencia de acetonitrilo como disolvente en el grupo hidroxilo en posición C-5 del ácido kójico. Los autores encontraron que el tiempo de reacción y el contenido en agua añadido fueron las variables más importantes en la producción de monolaureato de ácido kójico. El agua desempeña múltiples

funciones en la esterificación catalizada por lipasas en medios no convenciones y es sabido que el contenido en agua afecta desfavorablemente a la conversión de equilibrio. Posteriormente, Khamaruddin, N.-H et al. (*Journal of Palm Oil Research*, 20, **2008**) trataron de mejorar los rendimientos de Liu por reacción del ácido kójico con aceite de palma empleando lipasas de *Candida rugosa* y *Aspergillus Níger*. Se utiliza acetonitrilo como disolvente y se recupera la enzima por filtración. Se estudia el efecto de la enzima, de la longitud de diferentes ácidos grasos, del disolvente orgánico, la relación molar entre los dos ácidos y la cantidad de agua añadida obteniéndose conversiones en torno al 45%. Ashari, S.-E. et al. (*J. Oleo Sci.*, 58(10), **2009**) optimizaron la síntesis enzimática del ester palmítico del ácido kójico esterificado en la posición C-5 mediante síntesis enzimática con lipasa de *Rhizomucor meihei* inmovilizada sobre resina macroporosa de intercambio aniónico, obteniéndose conversiones menores del 40% tras 24-48 horas de reacción.

15

Kobayashi, T. et al. (*Biochemical Engineering Journal*, 9, **2001**) esterificaron el ácido kójico en el grupo hidroxilo C-7 con ácido laúrico a escala de decenas de gramos, en sistema semicontinuo, en presencia de acetonitrilo, utilizando lipasa de *Candida antarctica* inmovilizada y reciclando los productos no reaccionados consiguiendo conversiones inferiores al 50%.

20

Los ácidos grasos más utilizados para la obtención de ésteres del ácido kójico son ácido laúrico, esteárico, palmítico y oleico. Sin embargo, los ésteres obtenidos, aunque generalmente tienen una fuerte actividad inhibidora de la tirosinasa, son sólidos, menos solubles en agua y se obtienen en muy bajo rendimiento, en presencia de disolvente y con excesivo tiempo de reacción.

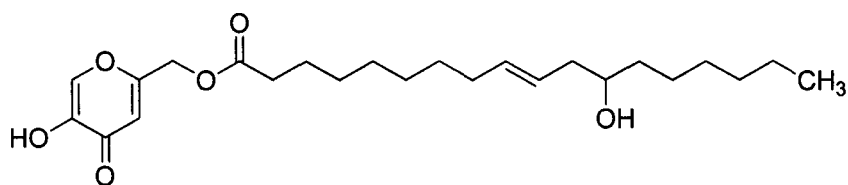
25

Con el fin de resolver los anteriores problemas y obtener con alto rendimiento un nuevo derivado del ácido kójico que tenga mejor propiedad lipofílica e hidrofóbica, se ha llevado a cabo la síntesis de ricinoleato de ácido kójico (fórmula I) a partir de ácido kójico (fórmula II) y ácido ricinoleico (fórmula III). El ácido ricinoleico es el principal componente del aceite de ricino y él mismo se utiliza en productos cosméticos y farmacéuticos como emulsionante. La esterificación entre el ácido ricinoleico y el ácido kójico se realiza sin emplear

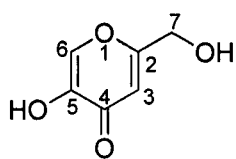
30

disolventes (el propio ácido ricinoleico se comporta como reactivo y disolvente) y utilizando como catalizadores lipasas inmovilizadas sobre resinas (sin tratamiento previo con un ácido graso). La recuperación del catalizador por filtración, la reutilización del ácido kójico sin reaccionar y el aislamiento del monoéster producido se realiza en un solo paso de purificación. Se consiguen conversiones superiores al 80% y selectividades al monoéster del 100% en la posición C-7 de ácido kójico tras 5 horas de reacción.

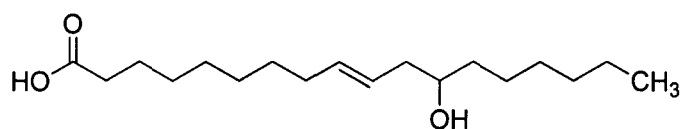
10



(I)



(II)



(III)

15

Descripción de la invención

En la presente invención se describe un procedimiento de esterificación del ácido ricinoleico (12-hidroxi-9-cis-octadecenoico) con el ácido kójico (5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona) utilizando 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.

Los catalizadores utilizados poseen unas características que permiten dirigir la esterificación entre el ácido ricinoleico y el ácido kójico para conseguir obtener

el monoéster sólo en la posición C-7. Los sistemas catalíticos a los que se refiere la 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 e inmovilizadas sobre resinas de intercambio aniónico o acrílicas macroporosas, con diferentes propiedades para cada una de ellas. Las dos especies enzimáticas pueden ejercer con elevada efectividad la acción de lipasa o la acción carboxilesterasa y, también en ambos casos, la especificidad de dichas enzimas puede ser posicional o no dependiendo el tipo del tipo de sustrato que se desee modificar con ellas. Los sistemas catalíticos tienen un diámetro medio que se encuentra en el rango de 50 a 400 Å, preferentemente entre 120 y 300 Å, siendo el rango en el que se encuentra la superficie específica de 10 a 150 m²/g, preferentemente entre 25 y 100 m²/g.

Lo 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 µmoles de ácido palmítico transformados por trioleína por minuto utilizando la enzima inmovilizada a una temperatura de 40°C). 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 µmoles de laurato de n-propilo obtenidos partiendo de ácido laúrico y 1-propanol durante un tiempo de reacción de 15 minutos, a temperatura de 60°C).

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 de tipo lecho fijo o de lecho fluidizado, en el que se encuentra el catalizador enzimático. La reacción se llevó a cabo en un rango de temperaturas de 60 a 80°C, relación molar (alcohol:ácido 4,5:1-1:4,5) preferiblemente (1:3-3:1) y el porcentaje de catalizador (0,5-9%) preferiblemente (3-7%) con respecto a los ácidos.

La reacción se realiza a presión atmosférica o a vacío (760 -1 mmHg) cuando interesa eliminar por evaporación el agua formada. En 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 80%, siendo el tiempo necesario para alcanzar esta conversión de 3 a 7 horas, aunque normalmente el tiempo está comprendido entre 3 y 5 horas.

5 El ricinoleato de ácido kójico obtenido por la esterificación descrita se purifica y, posteriormente, se identifica de forma cualitativa y cuantitativa mediante combinación de técnicas tales como espectrometría de infrarrojo, resonancia magnética nuclear (^1H , ^{13}C , Dept y HMBC), espectrometría de masas y cromatografía de gases.

10

El derivado de ácido kójico obtenido en la presente invención, al igual que otros antioxidantes secuestradores de radicales libres derivados del ácido kójico, es un poderoso antioxidante. De forma concreta, el ricinoleato de ácido kójico obtenido actúa como estabilizante para ayudar a aumentar la vida útil de los combustibles renovables, como el biodiesel procedente de aceite de colza.

15

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra la estructura y el dato espectral (^1H -NMR) del ricinoleato de ácido kójico.

20

La figura 2 representa el espectro bidimensional HMBC (CDCl_3 ; 300MHz) del ricinoleato de ácido kójico.

La Figura 3 muestra el efecto de la concentración del ricinoleato de ácido kójico como antioxidante en la estabilidad a la oxidación del biodiesel procedente de aceite de colza.

25

Modo de realización de la invención

La siguiente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos que no son, sin embargo, limitativos de su alcance:

30

Ejemplo 1

En este ejemplo se muestra la influencia de la actividad de un catalizador enzimático obtenido a partir de especie fúngica *Mucor miehi*, inmovilizada en

resina de intercambio aniónico, con un diámetro medio de poro de 176 Å, una superficie específica de 60 m²/g y una actividad de 60 BIUS.

5 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 ácido kójico en una relación molar 1:1, con una concentración inicial de catalizador enzimático del 5% peso. La temperatura de reacción se mantiene en 70°C, la presión de trabajo en 55 mmHg y la velocidad de agitación es de 600 r.p.m. Después de 5 horas de reacción, la mezcla de
10 reacción se deja enfriar. La enzima y el ácido kójico sin reaccionar se recuperan por filtración para reutilizarlos y el éster resultantes se aísla por cromatografía de columna o a través de neutralización.

Aislamiento del ricinoleato de ácido kójico por cromatografía en columna

15 La purificación se realiza por cromatografía flash en columna sobre gel de sílice (silica gel 60, Merck 230-400 mesh) , empleando como efluyentes 800ml de hexano/acetato de etilo en proporción 72:25.

Aislamiento de ricinoleato de ácido kójico por neutralización

20 La mezcla de reacción se filtra primero para retirar la enzima y el ácido kójico sin reaccionar. A continuación, el producto se disuelve en éter etílico y el exceso de ácido ricinoleico sin reaccionar se neutraliza por una solución de hidróxido sódico (NaOH). Después de la decantación por centrífuga para separar las dos fases, la fase orgánica se lava con agua y el disolvente y las
25 trazas de agua se eliminan por evaporación a vacío.

La conversión de ácido ricinoleico fue del 40% y el producto obtenido es un líquido oleoso amarillo a temperatura ambiental. Su estructura se identifica mediante combinación de técnicas tales como cromatografía de gases,
30 espectrometría de masas (EM), infrarrojo y resonancia magnética nuclear (RMN) (¹H, ¹³C, HMQC y HMBC). La tabla 1 muestra los datos espectrales (¹H, ¹³C-NMR y EM) del ricinoleato de ácido kójico obtenido.

Tabla 1

IR (cm ⁻¹) (CCl ₄)	2924, 2855, 1738, 1630, 1456.
¹ H-NMR (300 MHz)	7.79 (1H, s, H ₆), 6.43 (1H, s, H ₃), 5.45-5.32 (2H, m, H _i y H _j), 4.86 (1H, s, H ₇), 3.55 (1H, t, J = 5.7, H _l), 2.35-2.30 (2H, t, J = 7.5, H _b), 2.14 (2H, t, J = 6.6, H _k), 2.00-1.94 (2H, m, H _h), 1.60-1.53 (2H, m, H _c), 1.41-1.33 (2H, m, H _m), 1.23-1.21 (16H, m), 0.82-0.78 (3H, m, H _r).
¹³ C-NMR (300 MHz)	174.2, 172.7, 163.0, 162.9, 146.1, 138.7, 130.0, 125.3, 111.5, 71.5, 61.1, 36.8, 35.3, 33.8, 31.8, 29.7, 29.5, 29.3, 29.1, 29.0, 27.3, 26.7, 24.7, 22.6, 14.1.
EM m/z (%)	422 (M ⁻ , 19), 421 (M ⁺ , 100), 297 (20).

La figura 1 muestra la estructura química y el espectro ¹H-NMR del producto obtenido.

5

La figura 2 muestra el espectro HMBC donde se observan señales que representan las conectividades entre ¹H y ¹³C en un rango más amplio, hasta tres enlaces, lo cual permite asignar sin lugar a duda la estructura del compuesto obtenido al verse de forma clara que la esterificación ocurrió en la posición C-7 y no en la posición C-5.

10

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 resina acrílica macroporosa, con un diámetro medio de poro de 180 Å, una superficie específica de 95 m²/g y una actividad de 7000 PLUS/g.

15

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 los ácidos ricinoleico y kójico en una relación molar 1:1, con una concentración de

20

inicial de catalizador enzimático del 5% en peso. La temperatura de reacción se mantiene en 70°C, la presión de trabajo en 55 mmHg y la velocidad de agitación en 600 r.p.m. Después de 5 horas de reacción la conversión de ácido ricinoleico fue del 79%. La formación de monoéster se produjo en el grupo hidroxilo en posición C-7 de ácido kójico.

Ejemplo 3

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

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 los ácidos ricinoleico y kójico en una relación molar 1:1, siendo la concentración inicial de catalizador del 5% en peso. La temperatura de reacción se mantuvo en 70°C, la presión de trabajo en 55 mmHg y la velocidad de agitación en 800 r.p.m. Después de 5 horas de reacción la conversión del ácido kójico fue del 49%.

Ejemplo 4

En este ejemplo se muestra la influencia de la temperatura de reacción. Se realiza la reacción con el mismo sistema catalítico y en las mismas condiciones descritas en el ejemplo 2 salvo la temperatura de reacción que se mantiene en 80°C. Después de 5 horas de reacción la conversión fue del 83%.

Ejemplo 5

En este ejemplo se muestra la influencia de la concentración inicial de catalizador. Se realiza la reacción con el mismo sistema catalítico y las mismas condiciones descritas en el ejemplo 2 salvo la concentración inicial de catalizador que se fijó en 7,8% en peso. Después de 5 horas de reacción la conversión de ácido fue del 85%

Ejemplo 6

En este ejemplo se muestra la influencia de la presión de trabajo. Se realiza la reacción con el mismo catalizador y condiciones de reacción del ejemplo 5, salvo la presión de trabajo que se mantuvo en 380 mmHg. Después de 5 horas de reacción la conversión de ácido fue del 71%.

5

Ejemplo 7

En este ejemplo se muestra la influencia de la relación molar alcohol:ácido. Se realiza la reacción con el mismo catalizador y condiciones de reacción del ejemplo 2, salvo la relación molar alcohol/ácido, que se fijó en 3. Después de cinco horas de reacción, la conversión de ácido fue del 46%.

10

Ejemplo 8

En este ejemplo se muestra la influencia de la velocidad de agitación. Se realiza la reacción con el mismo catalizador y condiciones de reacción del ejemplo 2, salvo la velocidad de reacción que se fijó en 100 r.p.m. Después de cinco horas de reacción, la conversión de ácido fue del 35%.

15

Ejemplo 9

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

20

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 introducen en él ácidos ricinoleico y kójico 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 mmHg y la velocidad de agitación en 700 r.p.m. Después de 5 horas de reacción la conversión de ácido fue del 75%:

25

30

Ejemplo 10

En este ejemplo se ilustra la influencia de la luz de malla. Se realiza la reacción del ejemplo 9 con el mismo catalizador y condiciones de operación salvo la luz

de malla que se fijó en 400 μm . Después de 5 horas de reacción la conversión de ácido fue del 84%.

Ejemplo 11

5 En un lecho 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 ácido kójico en una relación molar 1:1 a un caudal de 1ml/min. El catalizador enzimático empleado es el obtenido a partir de la
10 especie fúngica *Candida antarctica*, inmovilizada en resina acrílica macroporosa, con un diámetro medio de poro de 180 Å, una superficie específica de 95 m^2/g y una actividad de 7000 PLUS/g. La temperatura de reacción se mantuvo en 70°C, la presión de trabajo en 760 mmHg. El tiempo de residencia medio fue de 1,3 horas y la conversión del ácido fue del 16%.

15

Ejemplo 12

En este ejemplo se usa un ricinoleato de ácido kójico como estabilizante del biodiesel.

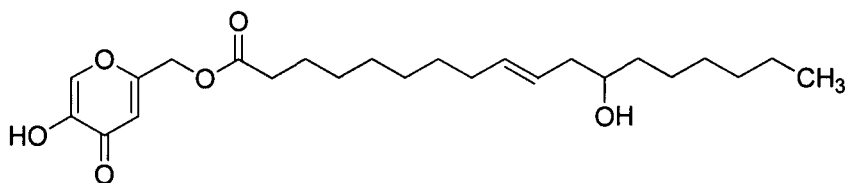
20 Se prepara 3 g de biodiesel de colza y se añade el antioxidante de la presente invención. El rango de las concentraciones de antioxidante es 0-2044 ppm. La estabilidad a la oxidación de las muestras se mide por el tiempo de inducción de acuerdo con al norma europea EN1112 utilizando un instrumento Rancimat 734.

25

El tiempo de inducción se mide como una indicación de la estabilidad a la oxidación del biodiesel. La figura 3 muestra el efecto de la concentración de antioxidante en la estabilidad a la oxidación. El tiempo de inducción de biodiesel de colza sin antioxidante es de 4,75 horas, inferior al valor estándar de la estabilidad a la oxidación de 6 h (Knothe, G. *Fuel Processing Technology*, **88(7)**, **2007**). El tiempo de inducción del biodiesel aumenta con la
30 concentración del compuesto de fórmula I hasta llegar a 6,30 horas.

Reivindicaciones

1. Derivado del ácido kójico de fórmula (I):



5

(I)

2. Procedimiento de obtención del compuesto de fórmula I por esterificación selectiva del ácido ricinoleico con ácido kójico empleando como sistema catalítico lipasas inmovilizadas.

10

3. Procedimiento, según reivindicación 2, donde las lipasas provienen de las especies fúngicas *Mucor miehi* y *Candida antarctica*.

4. Procedimiento, según reivindicaciones 2 y 3, donde las lipasas están inmovilizadas en resinas de intercambio aniónico o acrílicas porosas.

15

5. Procedimiento, según reivindicaciones anteriores, donde el sistema catalítico tiene un diámetro de poro entre 50 y 400 Å.

6. Procedimiento, según reivindicaciones anteriores, donde la reacción de esterificación se realiza a una temperatura entre 60-80°C y con una concentración de catalizador entre 3-7%.

20

7. Procedimiento, según reivindicaciones anteriores, donde la reacción de esterificación se realiza a una relación molar alcohol:ácido entre 1:3 y 3:1.

25

8. Procedimiento, según reivindicaciones anteriores, donde la reacción de esterificación se lleva a cabo a una presión entre 1 y 760 mmHg.

9. Procedimiento, según reivindicaciones anteriores, donde el tiempo de reacción varía entre 2 y 5 horas para alcanzar una conversión superior o igual al 85%.
- 5 10. Procedimiento, según reivindicaciones anteriores, donde la esterificación tiene lugar en un reactor tanque agitado, continuo o discontinuo.
11. Procedimiento, según reivindicaciones 2 a 6, donde la esterificación tiene lugar en un reactor tipo cesta, continuo o discontinuo.
- 10 12. Procedimiento, según reivindicaciones 2 a 6, donde la esterificación tiene lugar en un reactor tipo lecho fijo o lecho fluidizado.
13. Uso del compuesto de fórmula (I) como antioxidante.
- 15 14. Uso del compuesto de fórmula (I), según reivindicación 12, como estabilizante del biodiesel de colza y aceites de semilla similares frente a la oxidación.

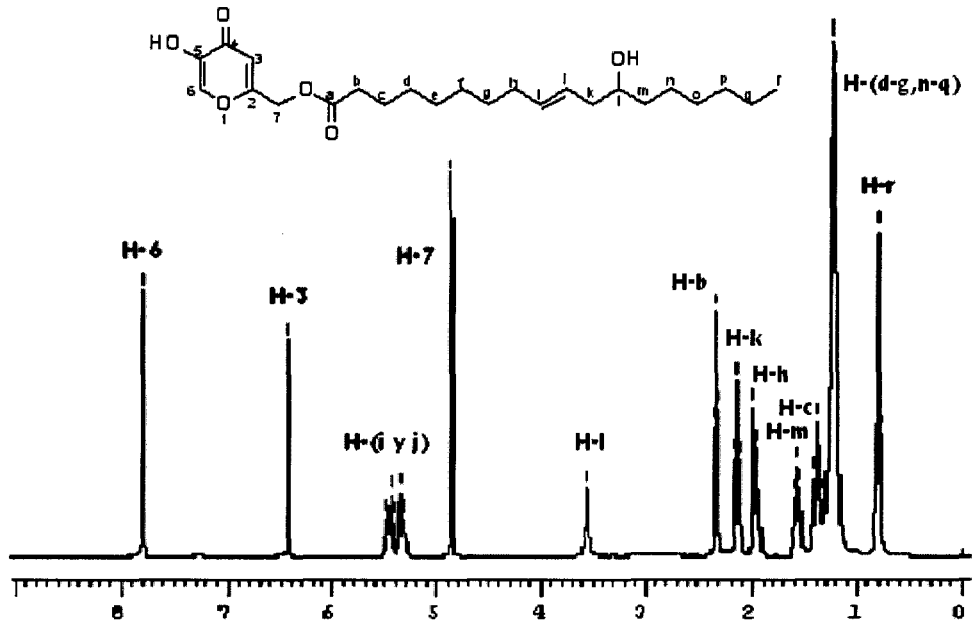


Figura 1

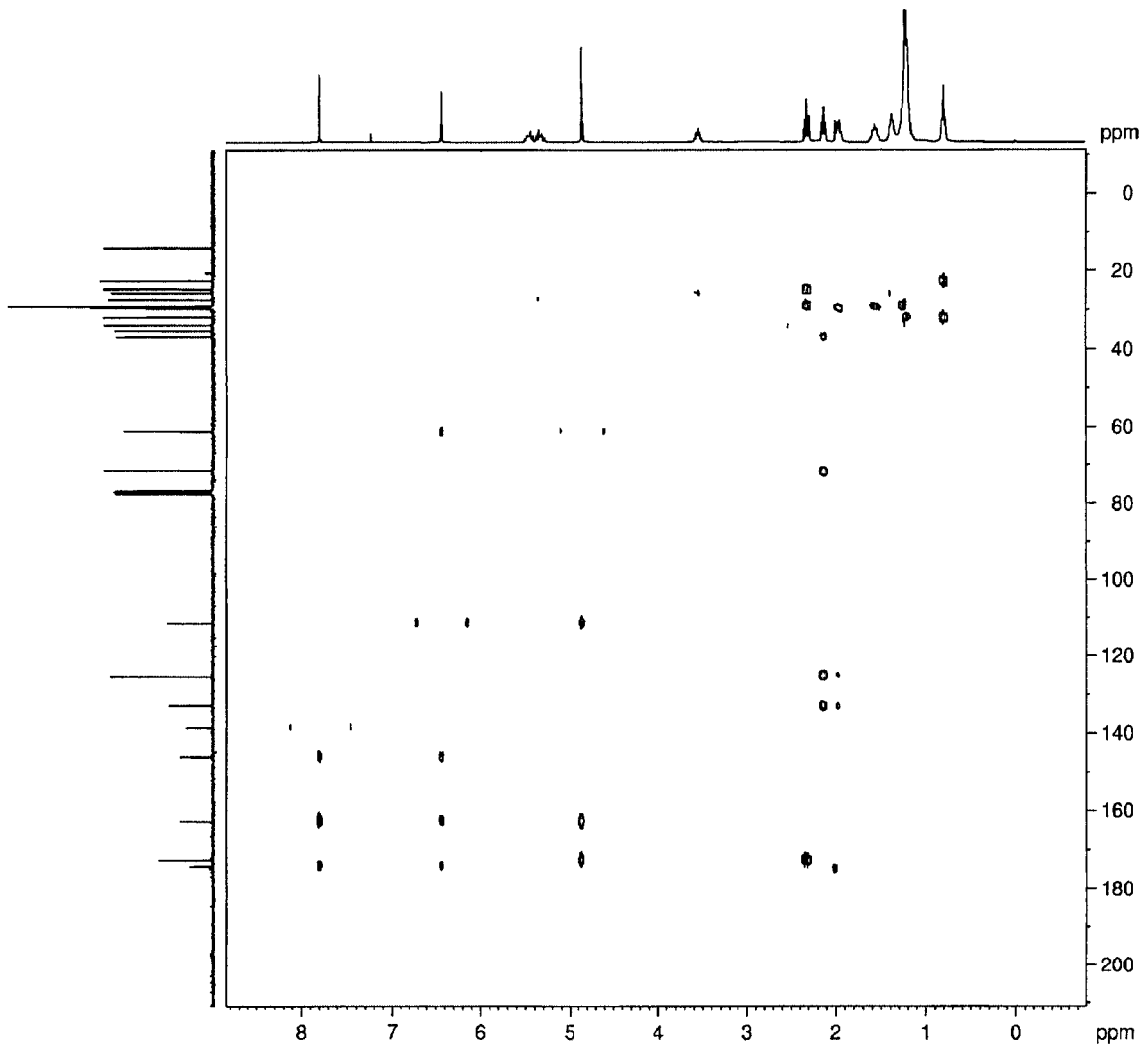


Figura 2

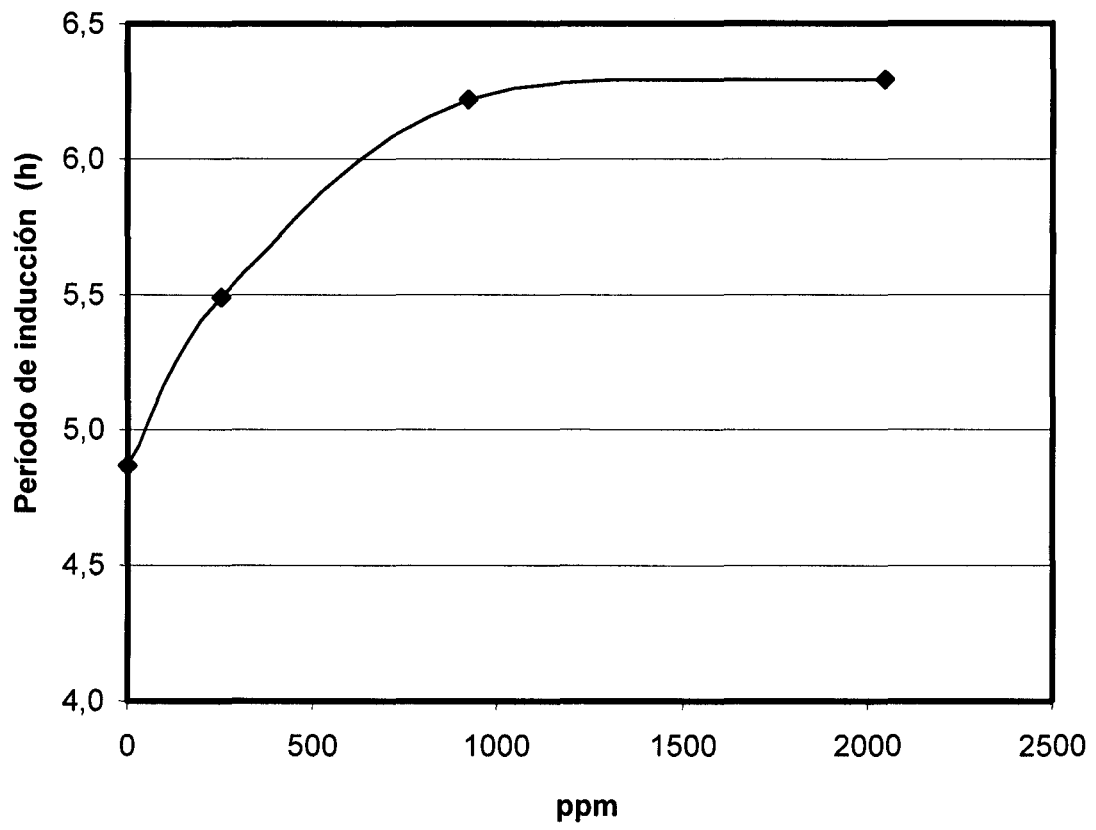


Figura 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201200403

②② Fecha de presentación de la solicitud: 17.04.2012

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C07D309/40** (2006.01)
C12P7/64 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	S ASHARI et al., Journal Oleo Science 2009, vol 58, nº 10, págs 503-510. "Optimization of enzymatic synthesis of palm-based kojic acid ester", todo el documento.	1-12
Y	N KHAMARUDDIN et al., Journal Oil Palm Research 2008, vol 20, págs 461-469. "Enzymatic synthesis and characterization of palm-based kojic acid ester", todo el documento.	1-12
Y	K LIU et al., Journal American Oil Chemist Society 1998, vol 75, nº 11, págs 1507-1511. "Lipase-catalyzed synthesis of kojic acid esters in organic solvents", todo el documento.	1-12
A	JP 2001131572 A (RIKEN VITAMIN) 15.05.2001, resumen	13,14

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.10.2012

Examinador
M. P. Fernández Fernández

Página
1/4

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

C07D, C12P

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

INVENES, EPODOC, WPI, CAS

OPINIÓN ESCRITA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.10.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 13,14	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	S ASHARI et al., Journal Oleo Science 2009, vol 58, nº 10, págs 503-510. "Optimization of enzymatic synthesis of palm-based kojic acid ester", todo el documento.	2009
D02	N KHAMARUDDIN et al., Journal Oil Palm Research 2008, vol 20, págs 461-469. "Enzymatic synthesis and characterization of palm-based kojic acid ester", todo el documento.	2008
D03	K LIU et al., Journal American Oil Chemist Society 1998, vol 75, nº 11, págs 1507-1511. "Lipase- catalyzed synthesis of kojic acid esters in organic solvents", todo el documento.	1998
D04	JP 2001131572 A (RIKEN VITAMIN)	15.05.2001

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

La solicitud se refiere al éster del ácido ricinoleico con ácido kójico de fórmula (I) (reivindicación 1), procedimiento para su obtención utilizando lipasas de *Mucor meiei* y *Candida antarctica* como sistema catalítico (reivindicaciones 2-12) y su uso como antioxidante y estabilizante de aceites de semillas y biodiesel de colza (reivindicaciones 13 y 14).

El documento D1 divulga la síntesis del monooleato del ácido kójico utilizando lipasa inmovilizada de *Mucor meiei* para catalizar la esterificación, ver resumen de D1. Se evalúan los parámetros para determinar las condiciones óptimas de la esterificación enzimática y su uso a escala industrial, tales como cantidad de enzima, temperatura, tiempo de reacción y relación molar ácido kójico : ácido oleico. El documento D2 (ver resumen) divulga la síntesis de ésteres de ácido kójico con varios ácidos grasos de 18 C, ver tablas 3 y 4 de D2, utilizando como catalizador lipasa de *Pseudomonas* o *Candida* (tabla 2); también se determinan las condiciones de reacción más favorables.

El documento D3 divulga la síntesis del monooleato y el monolaurato de ácido kójico utilizando varias lipasas, entre ellas *C. antarctica* y *Mucor miehei* (tabla 1) y se optimizan los parámetros de reacción.

El documento D4 divulga el uso como antioxidante para aceites y grasas de una composición que contiene ácido kójico y un éster glicérido de ácido ricinoleico. No se menciona la utilización de un éster de ácido graso con ácido kójico.

Los documentos D1, D2 y D3 divulgan la esterificación de ácido kójico con varios ácidos grasos usando como catalizador varias lipasas, entre ellas las de la reivindicación 3 de la solicitud. No se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica el ricinoleato de ácido kójico, sin embargo no se aprecia actividad inventiva al hecho de utilizar un ácido graso no empleado anteriormente pues la invención de la solicitud simplemente selecciona un ácido graso C18 de los varios posibles y usa el mismo procedimiento biocatalítico ampliamente divulgado en el estado de la técnica.

En consecuencia, se considera que las reivindicaciones 1-14 de la solicitud cumplen el requisito de novedad y las reivindicaciones 1-12 carecen de actividad inventiva, según lo establecido en los Art. 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes 11/1986.