

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 482 115**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/231** (2006.01)

**A61K 31/232** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

**A23L 3/3472** (2006.01)

**A61K 8/37** (2006.01)

**A61P 17/18** (2006.01)

**A61K 31/23** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2008 E 08850928 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.05.2014 EP 2222294**

54 Título: **Composiciones de derivados polifenólicos estilbénicos y sus aplicaciones para luchar contra las patologías y el envejecimiento de los organismos vivos**

30 Prioridad:

**15.11.2007 FR 0708020**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**01.08.2014**

73 Titular/es:

**CAUDALIE (100.0%)  
6, Place de Narvik  
75008 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**VERCAUTEREN, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

**ES 2 482 115 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

Composiciones de derivados polifenólicos estilbénicos y sus aplicaciones para luchar contra las patologías y el envejecimiento de los organismos vivos

5 La invención tiene por objeto composiciones de derivados polifenólicos estilbénicos para prevenir y luchar contra la mayor parte de las patologías y el envejecimiento de los tejidos y de los organismos vivos. También se refiere a un procedimiento de preparación de estas composiciones así como a sus aplicaciones, concretamente, en los campos de la cosmética, la dietética y la terapia.

10 Desde hace más de medio siglo se ha desarrollado la hipótesis según la cual el envejecimiento del organismo humano resulta de la acumulación de múltiples daños provocados a los tejidos por especies radicalarias o reactividades químicas oxidantes.

15 A mediados de los años 50, tras numerosos trabajos sobre el caucho, el químico Harman constató que impedir la formación de radicales libres era el medio más seguro para luchar contra su degradación y su agrietamiento. Por analogía, sugiere entonces que el envejecimiento de los tejidos en el ser humano (aparición de arrugas en la piel, por ejemplo) se debe a la formación "anómala" en el interior de las células, de especies químicas muy reactivas, y concretamente, de radicales libres y a las series de reacciones que desencadenan.

20 Se forman especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel mitocondrial mediante "transferencia" incontrolada de electrón/electrones al oxígeno (ROS: anión superóxido, peróxidos, peroxinitritos, radicales libres,...).

25 Estas ROS se propagan a continuación a los otros compartimentos celulares o al citoplasma, en función de su hidro/liposolubilidad, en los que crean daños considerables.

30 En tal contexto, la investigación de sustancias activas para luchar contra el envejecimiento se realiza, durante estas últimas décadas, basándose en su capacidad para romper las reacciones de oxidación en cadena, es decir para prevenir el estrés oxidativo. Efectivamente, cualquier sustancia que puede interaccionar con las ROS, disminuye sus efectos nocivos y, a más largo plazo, tendrá un impacto positivo sobre la salud y, por los mismos motivos, ralentizará el envejecimiento como el desarrollo de las principales patologías. Se trata de trampas de radicales libres (capacidad para suministrar un único electrón cada vez) y/o antioxidantes (transferencia de dos electrones al mismo tiempo) tales como las vitaminas (E y C) y los polifenoles.

35 No obstante, los daños que provocan el envejecimiento del organismo o que acompañan a las principales patologías no son únicamente consecuencia de un mal control del flujo de electrones debidos a "escapes" del metabolismo mitocondrial y de ROS intracelulares, sino que también implica otras fuentes de efectos nocivos potenciales que hacen intervenir la "reacción de Maillard" y el estrés carbonílico.

40 En el estrés carbonílico, la función carbonilo (aldehído) de la glucosa ejerce sus propiedades electrófilas con respecto a residuos nucleófilos de las proteínas (aminas, tioles,...): es el punto de partida del estrés carbonílico que se amplifica por la formación de propagadores.

45 Las especies químicas creadas, o los productos de glicación, se consideran productos finales: son AGE por "Advanced Glycated End-Products" (productos finales de glicación avanzada), en los que la glucosa o sus fragmentos están unidos a residuos de aminoácido de manera irreversible.

50 Las reacciones de Maillard que se producen aumentan, al mismo tiempo, la capacidad reductora de los azúcares y de sus derivados. Los compuestos dicarbonílicos que se forman adquieren una oxidabilidad mucho más fuerte incluso que sus precursores y transfieren fácilmente sus electrones al oxígeno, por ejemplo. A partir del anión superóxido formado inicialmente, se produce una misma serie de ROS que en el caso del estrés intracelular. Por tanto, el estrés carbonílico se duplica por un segundo tipo de estrés oxidativo.

55 A diferencia de los mecanismos mencionados anteriormente para las ROS de origen mitocondrial, este nuevo estrés oxidativo se produce en el exterior de las células, en el interior de la matriz extracelular. Afecta por tanto a los aminoácidos o los residuos de las proteínas de esta matriz, y concretamente a las fibras de colágeno y de elastina. Este estrés oxidativo, particularmente importante debido a que los sistemas de protección enzimáticos no son tan eficaces como los situados en la célula, desemboca en un aumento de los fenómenos de alquilación que se añaden a los productos de glicación y de glicoxidación, procedentes del estrés carbonílico.

60 Así, el estrés carbonílico, duplicado por un estrés oxidativo extracelular, es al menos tan importante como el estrés oxidativo intracelular en el desarrollo del envejecimiento y la implantación de las alteraciones tisulares que acompañan a las principales patologías.

65 El estudio por parte de los inventores de los fenómenos que conducen al envejecimiento de los tejidos les han llevado por tanto a una consideración más extendida de los mecanismos bioquímicos que son responsables del

mismo y a extraer nuevos conceptos que permiten definir nuevas dianas biológicas de acciones complementarias para combatirlos más eficazmente.

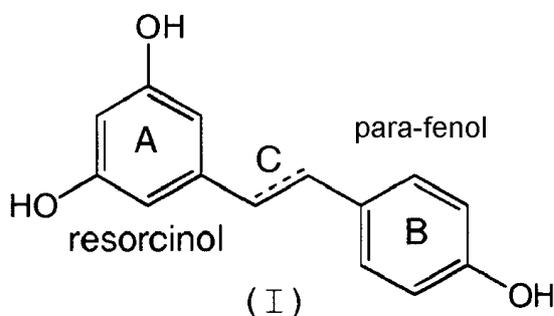
5 Sus investigaciones han llevado entonces a modificar la estructura de polifenoles con propiedades antioxidantes y de trampa de radicales libres, tales como los que constituyen extractos vegetales, para conferirles mayores capacidades para atrapar también los agentes de estrés carbonílico.

10 La invención tiene por tanto como objetivo proporcionar nuevas composiciones de derivados de polifenoles que constituyen polifenoles sobreactivados que pueden a la vez actuar con una gran eficacia sobre un mayor número de dianas biológicas (estreses oxidante y carbonílico) y están estabilizados.

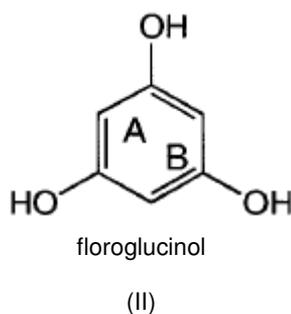
La invención también tiene como objetivo proporcionar un procedimiento que permita obtener tales derivados polifenólicos a partir de polifenoles de extractos vegetales.

15 Según aún otro aspecto, la invención se refiere a aprovechar las propiedades de estas composiciones polifenólicas de tipo floroglucínolicos, en cosmología, dietética y terapia.

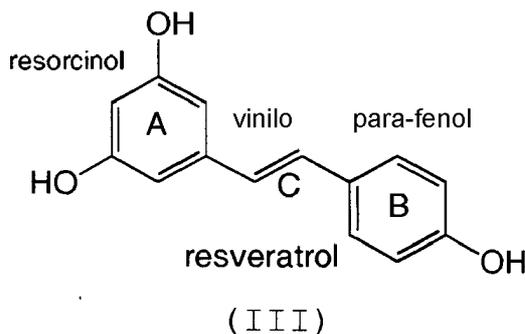
20 Las composiciones de derivados de polifenoles de la invención están caracterizadas porque dichos polifenoles encierran monómeros, oligómeros o polímeros de unidades que responden a la fórmula (I):



25 Estas unidades se caracterizan por la presencia simultánea de un núcleo de tipo resorcinol (núcleo A) y de un núcleo de tipo para-fenol (núcleo B), unidos entre sí por un enlace carbonado tal como C. En el caso el más sencillo, los dos núcleos A y B se confunden y el segmento C no existe, lo que corresponde al caso del floroglucinol de fórmula (II)



30 Los núcleos A y B de estas unidades son, lo más frecuentemente, distintos y el segmento C está constituido por 2 carbonos que tienen hibridación sp<sup>2</sup> y forman un vinilo: es el caso del resveratrol de fórmula (III)



35 El segmento C también puede estar constituido por carbonos con hibridación sp<sup>3</sup> y servir, concretamente, de punto

de unión entre los monómeros para formar los polímeros.

Dichos derivados se sobreactivan, en lo que refiere a su poder nucleófilo, mediante alquilación de al menos una función fenólica de cada unidad y se estabilizan mediante esterificación mediante mezclas de ácidos grasos mayoritariamente insaturados (AGI) de todas las demás que quedan libres.

De manera general, las sustituciones específicas de los derivados de las composiciones de la invención conducen a una modulación de su actividad y hacen que puedan inhibir al mismo tiempo, y de manera específica, los principales mecanismos implicados en las principales patologías y el envejecimiento mencionados anteriormente.

Ventajosamente, el número de grupos -O-alkilo por molécula no es igual al número de hidroxilos presentes de media por molécula y, preferiblemente, es de 1 ó 2.

El o los grupos alquilo son más particularmente grupos con efecto electrodonador: metilos, isopropilos o terc-butilos, para reforzar al máximo la nucleofilia de los núcleos aromáticos y, como consecuencia, su capacidad para atrapar los agentes de estrés carbonílico.

La estabilización eficaz se obtiene mediante la formación de ésteres de AGI entre las funciones fenólicas que quedan libres y los ácidos grasos procedentes de aceites vegetales con ácidos grasos mayoritariamente insaturados (AGI). Los aceites se eligen por su impacto favorable sobre la salud. Ventajosamente, los productos activos obtenidos encierran entonces proporciones de ácidos grasos insaturados idénticas a las de los aceites de los que proceden.

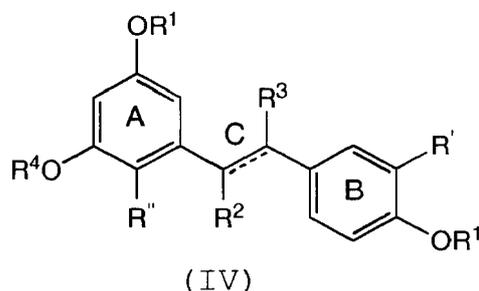
Dichos ésteres comprenden preferiblemente las mezclas de radicales acilo R de los ácidos grasos de aceite de oliva (*Olea europea*) o de aceite de pepitas de uva (*Vitis vinifera*).

Se trata más especialmente de radicales R de ácidos grasos saturados (AGS = ác. esteárico; 7-8%), de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI = ácido oleico; 55-75%) y de ácidos grasos poliinsaturados esenciales (AGPI; 15-18%): diinsaturados (ác. linoleicos) y triinsaturados (ác. linolénicos) de las series  $\omega$ -6 y  $\omega$ -3, presentes en los derivados de la invención en proporciones idénticas a las de los aceites que ejercen un beneficio máximo sobre la salud, según datos procedentes de epidemiología.

Esta estabilización permite por otro lado proteger a los polifenoles estilbénicos sobreactivados frente a una destrucción prematura segura (oxidación al aire o a la luz), al tiempo que les proporciona un carácter lipófilo con el fin de aumentar sus posibilidades de reabsorberse. Véanse, con respecto a esto, los documentos FR 2 766 176 y FR 2 772 613.

No obstante, ventajosamente, esta estabilización es temporal, y ya no es eficaz cuando se colocan los derivados en situación de actuar, con el fin de restituirles todo su poder antioxidante. Por tanto, debe ser reversible mediante acción simple de los sistemas biológicos a los que se exponen entonces los grupos estabilizantes, y concretamente, las enzimas tales como lipasas, esterasas o proteasas.

Más específicamente, la invención se refiere a composiciones caracterizadas porque dichos derivados responden a la fórmula (IV)



en la que

- R<sup>1</sup> es un radical alquilo, o un radical acilo de un ácido graso de un aceite vegetal, representado por R tal como se definió anteriormente,

- R<sup>2</sup> es un hidrógeno o el punto de unión en R'' o a R<sup>2</sup> de otra unidad,

- R<sup>3</sup> es un hidrógeno o el punto de unión en R'' o en R<sup>4</sup> de otra unidad,

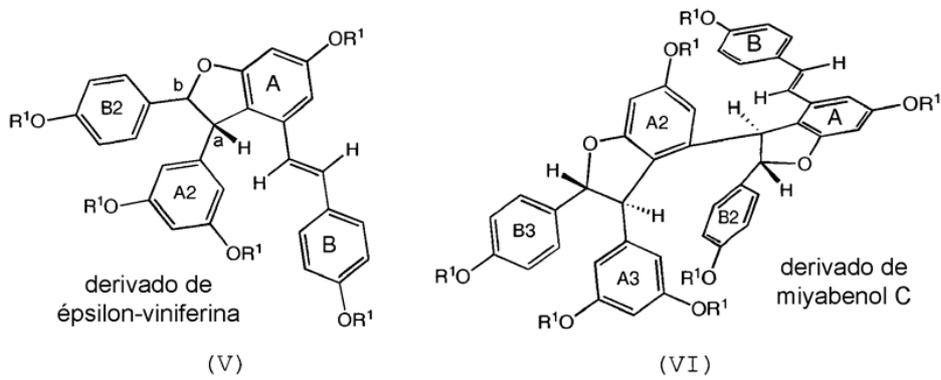
- R<sup>4</sup> es un radical alquilo, o un radical acilo de un ácido graso de un aceite vegetal, representado por R tal como se definió anteriormente o el punto de unión en R<sup>3</sup> de otra unidad.

- R<sup>n</sup> representa H o el punto de unión en R<sup>2</sup> o en R<sup>3</sup> de otra unidad,

- R' es un hidrógeno o un radical O-acilo de un ácido graso de un aceite vegetal, representado por R tal como se definió anteriormente

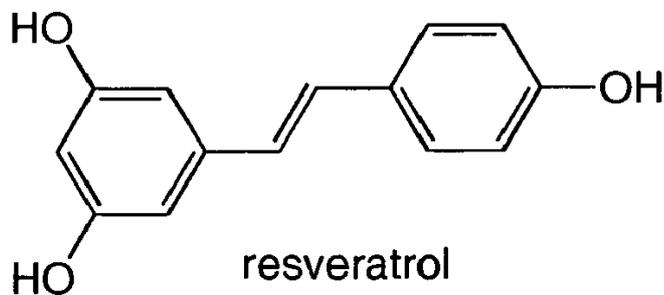
y los diastereoisómeros y los regioisómeros de estos motivos.

A modo de ejemplo, pueden proporcionarse el dímero (épsilon-viniferina) y el trímero (miyabenol C), de fórmulas (V) y (VI):



Según una disposición preferida de la invención, los derivados definidos anteriormente corresponden a derivados alquilados, después estabilizados, de extractos vegetales. Por tanto, presentan las estructuras de los polifenoles presentes en mezcla en estos extractos vegetales.

Por tanto, dichos extractos vegetales están constituidos esencialmente por derivados del resveratrol, respondiendo este último a la fórmula (III)

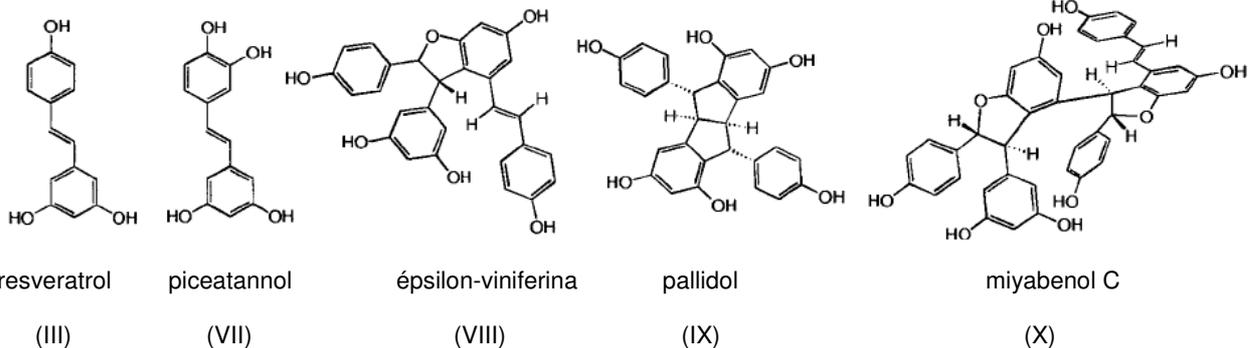


( III )

En un primer grupo de esta familia, se trata más particularmente de extractos de la vid.

La invención se refiere muy especialmente a los derivados de extractos de sarmientos y/o de escobajos de vid (*Vitis vinifera*).

La invención se refiere por tanto a composiciones de derivados de polifenoles de extractos de sarmientos de vid, comprendiendo estos extractos cantidades importantes de derivados polifenólicos que constituyen, tal como se indicó anteriormente, equivalentes vinílogos del floroglucinol. Se trata concretamente de polifenoles de fórmulas III, VII, VIII, IX y X a continuación que corresponden respectivamente al resveratrol, piceatannol, épsilon-viniferina, pallidol, miyabenol C.



En un segundo grupo de dicha primera familia, se trata de derivados de extractos de polígono (*Polygonum cuspidatum*).

En un tercer grupo, se trata de derivados de extractos de frutos, por ejemplo de moreras (*Morus sp.*).

Las composiciones de derivados de polifenoles de la invención se obtienen ventajosamente según un procedimiento que comprende la reacción de las composiciones de polifenoles de los extractos vegetales definidos anteriormente

- en una primera etapa, con un agente de alquilación en condiciones que permiten sustituir el hidrógeno de al menos 1 grupo OH fenólico por molécula, preferiblemente de 1 a 2, por un grupo alquilo, y

- en una segunda etapa, con un agente de acilación, concretamente, un anhídrido o un cloruro de ácido, en condiciones que permiten sustituir el hidrógeno de los grupos -OH, todavía libres tras la alquilación, por una mezcla de radicales acilo -COR liberados por el agente de acilación, siendo R tal como se definió anteriormente.

La reacción de alquilación recurre a reactivos disponibles comercialmente, tales como halogenuros (yoduros, bromuros,...), o ésteres sulfúricos a razón de un equivalente químico y medio. Se añaden lentamente a una disolución del extracto polifenólico en un disolvente aprótico (acetato de etilo, diclorometano,...), y en presencia de una base mineral (carbonato de potasio,...), se lleva a reflujo, con agitación y atmósfera inerte (nitrógeno, argón, de manera ideal).

Se detiene la reacción de alquilación, tras enfriamiento, mediante adición de un ácido diluido (clorhídrico, por ejemplo) hasta la obtención de un pH ácido. Se continúa la agitación durante 45 min complementarios, aproximadamente. Se concentra el medio de reacción a vacío (evaporación del disolvente). Se extrae la fase acuosa mediante un volumen igual de disolvente no miscible (acetato de etilo, diclorometano,...), que a su vez se lava con dos volúmenes equivalentes de agua destilada (hasta la neutralidad). Se seca esta fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, después se filtra y se evapora a presión reducida para dejar el residuo de los polifenoles alquilados.

El agente de acilación se prepara a partir de un aceite vegetal según un procedimiento que comprende:

- la saponificación de los glicéridos de un aceite vegetal, seguida por una acidificación,

- una activación mediante deshidratación en el caso en el que el agente de acilación es un anhídrido de ácido, o mediante cloración, en el caso en el que se trata de un cloruro de ácido, pero pueden usarse otros derivados que confieren el mismo efecto de activación (transesterificación, acilación enzimática, según los casos).

La reacción de saponificación se realiza en fase acuosa en presencia de un agente alcalino como el hidróxido de potasio en cantidad al menos estequiométrica, preferiblemente a la temperatura de reflujo. Entonces se lleva la disolución a pH ácido mediante adición de ácido mineral, después se extrae mediante un disolvente orgánico con el fin de aislar la mezcla de los ácidos libres formados durante la reacción.

La reacción de deshidratación se desarrolla a reflujo, en presencia de disolvente que puede crear un azeótropo con el agua, con el fin de permitir su eliminación, a medida que se forma. Se usa por ejemplo tolueno y se atrapa el agua mediante un sistema de tipo "Dean Stark".

La reacción de cloración se realiza en presencia de disolvente que puede disolver los ácidos grasos libres. Se cataliza mediante una base de Lewis y se realiza mediante adición lenta del agente de cloración, a temperatura controlada, próxima a 0°C. Cuando se termina la adición, se prolonga la agitación a la temperatura ambiente, después se concentra el medio de reacción mediante evaporación a vacío, y se purifican los cloruros mediante destilación.

Ventajosamente:

- se usa, como disolvente de la cloración, diclorometano o cloroformo, por ejemplo, con la condición de que no se estabilice mediante un alcohol,

5

- el agente de cloración es, por ejemplo, el cloruro de tionilo o el cloruro de oxalilo,

- el catalizador puede ser la dimetilformamida,

10 - la purificación de los cloruros de acilo tiene lugar mediante destilación a alto vacío, en un "horno tubular" (Kugelrohr).

La reacción de acilación se realiza con la mayor frecuencia en presencia de un disolvente que permite una solubilización, aunque sea parcial, de los compuestos polifenólicos alquilados resultantes de la reacción de alquilación descrita anteriormente.

15

Se eligen disolventes apropiados de los derivados halogenados tales como el diclorometano, el cloroformo o el 1,2-dicloroetano, o de los derivados nitrogenados tales como la piridina, o incluso el hexano, según los compuestos alquilados que deban disolverse.

20

Se colocan los derivados polifenólicos alquilados, en disolución en el disolvente de reacción elegido y ventajosamente con adición de un agente de catálisis básico (por ejemplo, la trietilamina o la piridina), con agitación y bajo atmósfera inerte (argón, nitrógeno).

25 Se usan dos equivalentes de anhídridos o de cloruros de AG, tal como se prepararon anteriormente, como agentes de acilación. Se añaden gota a gota, en disolución en el disolvente de la reacción, si no se trata de piridina sola. En el caso en el que la piridina es a la vez el disolvente y el catalizador básico, se procede a una adición "inversa". Es la disolución de los derivados polifenólicos la que se añade gota a gota a los acilpiridínios previamente formados.

30 Una alternativa que puede aplicarse consiste en añadir con agitación vigorosa una fase acuosa básica ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_3\text{PO}_4$ ) a la disolución orgánica ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) de los derivados polifenólicos alquilados y de los agentes de acilación, realizando así las condiciones de Schotten-Baumann.

35 Independientemente del procedimiento adoptado, la reacción se realiza preferiblemente a temperatura ambiente, con una duración de aproximadamente 7 a 8 horas.

Los derivados esterificados así formados se purifican mediante adición de agua acidificada ( $\text{HCl}$ , c.s.p. pH ácido), después mediante varios lavados de la fase orgánica con agua destilada. Tras secado sobre sulfato de sodio, se filtra la disolución, después se evapora hasta sequedad para liberar los productos activos flavonoídicos alquilados y estabilizados.

40

Los productos activos con doble potencialidad de la invención, que pueden a la vez atrapar las ROS, independientemente de su origen intra o extracelular, y atrapar los compuestos dicarbonílicos (antiglicación y anti-AGE), presentan un gran interés como los medios de lucha más completos y más eficaces actualmente contra el envejecimiento cutáneo.

45

Por tanto, las composiciones de la invención son particularmente apropiadas para la elaboración de preparaciones cosméticas.

50 En estas preparaciones, las composiciones están asociadas a vehículos apropiados para un uso externo. De manera ventajosa, su carácter liposoluble favorece su incorporación en las formas galénicas habitualmente usadas en cosmética.

La invención se refiere por tanto a composiciones cosméticas caracterizadas porque encierran una cantidad eficaz para luchar contra el envejecimiento de la piel, de una o más composiciones de derivados de polifenoles estilbénicos tal como se definieron anteriormente en asociación con vehículos inertes apropiados para un uso externo.

55

Estas composiciones se presentan en una forma apropiada para una administración por vía tópica tal como crema, pomada, emulsión, gel, liposomas, loción.

60

Encierran del 0,5 al 5% de producto activo, preferiblemente del 2 al 3%.

La invención también se refiere a un método para prevenir el envejecimiento de la piel, caracterizado por la aplicación en la piel o la ingestión de una o más composiciones cosméticas tal como se definieron anteriormente.

65

Según otro aspecto de gran interés, las composiciones de la invención pueden usarse en dietética. Gracias

concretamente a sus propiedades antirradicales y de atrapamiento de compuestos carbonílicos, garantizan una mejor conservación de los alimentos. Además, constituyen generalmente un aporte de factor vitamínico. Por tanto, se añaden ventajosamente a las bebidas, por ejemplo a los zumos de frutas, bebidas tónicas, a los productos lácteos y derivados tales como la mantequilla.

5 También pueden usarse tal cual en forma líquida, o incluso en gránulos o similares, geles o en forma de pasta, por ejemplo incorporadas en dulces tales como pastas de frutas, caramelos, chicles.

10 Las propiedades de las composiciones de la invención también se aprovechan ventajosamente para un uso como medicamentos.

15 La invención se refiere por tanto a composiciones farmacéuticas, caracterizadas porque encierran una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una composición tal como se definió anteriormente, en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Estas composiciones se presentan ventajosamente en una forma apropiada para una administración concretamente por vía oral, tópica o parenteral.

20 Por tanto, para una administración por vía oral, las composiciones se presentan más particularmente en forma de comprimidos, cápsulas, disoluciones o jarabes.

Para una administración por vía tópica, las composiciones se presentan en forma de crema, pomadas, geles, parches o lociones.

25 Para una administración por vía parenteral, las composiciones se presentan en forma de disolución inyectable estéril o esterilizable.

Otras características y ventajas de la invención se facilitan, a modo ilustrativo, en los siguientes ejemplos en los que se hace referencia a las figuras 1 a 11, que representan, respectivamente:

30 - figura 1: el espectro de IR-FT en modo ATR, de resveratroles monoalquilados (metilados) mediante yoduro de metilo,

35 - figura 2: el espectro de RMN 2D HMBC de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz) de resveratroles monoalquilados (metilados) mediante yoduro de metilo,

- figura 3: el espectro de IR-FT de resveratroles monoalquilados (metilados) mediante DMS,

40 - figura 4: el espectro de RMN 2D HMBC de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz) de resveratroles monoalquilados (metilados) mediante yoduro de metilo,

- figura 5: el espectro de IR-FT de ácidos grasos procedentes de la saponificación de un aceite de oliva "virgen", en modo ATR,

45 - figura 6: el cromatograma en fase gaseosa, detectado mediante espectrometría de masas (GC-DSQ2) de ésteres metílicos preparados a partir de los cloruros de AG de oliva,

- figura 7: el espectro de IR-FT de cloruros de AG de oliva (en modo ATR),

50 - figura 8: el espectro de RMN de protón a 500 MHz ( $\text{CDCl}_3$ ) de cloruros de AG de oliva,

- figura 9: el espectro de IR-FT de polifenoles estilbenoídicos de sarmientos de vid alquilados y estabilizados mediante AG de aceite de oliva,

55 - figura 10: el espectro de RMN 2D HMBC de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de polifenoles estilbenoídicos de sarmientos de vid alquilados y estabilizados mediante AG de aceite de oliva.

Ejemplo 1: O-alkilación del floroglucinol

60 Se disuelven 1,560 g de floroglucinol (12,3 mmol) en 20 ml de acetona anhidra, en un matraz de dos bocas equipado con un refrigerante. Con agitación y bajo atmósfera de argón, en presencia de 1,685 g (12,3 mmol, 2 eq. químicos) de carbonato de potasio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ), se añaden 766 microlitros de yoduro de metilo (= 1,746 g;  $d = 2,28 \text{ g/ml}$  a  $25^\circ\text{C}$ ), es decir 12,3 mmol = 1 equivalente molar con respecto al resveratrol. Se lleva la reacción reflujo durante 3 horas.

65 Se filtra el medio de reacción sobre frita  $n.^\circ$  4 para eliminar el  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y se evapora la acetona a vacío. Se lleva el residuo a 15 ml de acetato de etilo. La fase orgánica, lavada 2 veces con 15 ml de agua destilada, secada sobre

sulfato de sodio, filtrada y evaporada hasta sequedad, deja un residuo de 1357 mg, identificado como 5-metoxi-resorcinol (rendimiento bruto = 89%; P.M. = 124) basándose en sus constantes espectrales:  $^1\text{H-RMN}$ , acetona- $\text{d}_6$ , 500 MHz,  $\delta$  ppm: 5,95 (1H, d); 5,90 (2H, d); 3,65 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C-RMN}$ , acetona- $\text{d}_6$ , 125 MHz,  $\delta$  ppm: 167,2 (s); 164,22 (2 s); 100,61 (d); 98,26 (2 d); 59,6 (cuad.).

5

#### Ejemplo 2: O-alkilación del resveratrol

Se disuelven 450 mg de resveratrol (1,97 mmol) en 10 ml de acetona anhidra, en un matraz de dos bocas equipado con un refrigerante. Con agitación y bajo atmósfera de argón, en presencia de 270 mg (1,97 mmol, 2 eq. químicos) de carbonato de potasio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ), se añaden 123 microlitros de yoduro de metilo (= 280 mg;  $d = 2,28$  g/ml a  $25^\circ\text{C}$ ), es decir 1,97 mmol = 1 equivalente molar con respecto al resveratrol. Se lleva la reacción a reflujo durante 3 horas.

10

Se filtra el medio de reacción sobre frita n.º 4, para eliminar el  $\text{K}_2\text{CO}_3$  y se evapora la acetona a vacío. Se lleva el residuo a 15 ml de acetato de etilo. La fase orgánica, lavada 2 veces con 15 ml de agua destilada, secada sobre sulfato de sodio, filtrada y evaporada hasta sequedad, deja un residuo de 548 mg (rendimiento bruto = 91,6%, basándose en los resveratroles monometilados, P.M. = 304).

15

El estudio de espectroscopía de IR-FT de este extracto de resveratroles O-metilados permite establecer las características comunes a todos estos derivados metilados, incluidos los más complejos de los extractos polifenólicos estilbenoídicos de vegetales, indicadas mediante flechas en el espectro (figura 1): bandas a 2838 (CH) y 1251, 1143 y 1058  $\text{cm}^{-1}$  (éteres).

20

Esta mezcla de resveratroles monometilados se caracteriza en RMN mediante las correlaciones, diagnósticas de la alquilación, entre carbonos oxigenados aromáticos del resveratrol ( $\delta = 160$  ppm) y los protones de los metil éteres ( $\delta = 3,8$  ppm). El espectro de RMN 2D HMBC (figura 2) muestra correlaciones entre carbonos aromáticos oxigenados (de 155 a 162 ppm) y los protones de los metil éteres, que tienen resonancia a una frecuencia centrada en 3,8 ppm.

25

#### Ejemplo 3: Etapa de O-alkilación de polifenoles estilbénicos

Se trabaja con 10,08 g (44 mmol) de extracto de polifenoles estilbenoídicos tal como se obtienen según el procedimiento de la patente FR 2 766176, se disuelven en 50 ml de acetona. Se añaden 12,25 g de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  activado (88 moles = 4 eq. químicos), después 3,15 ml (33 mmol, 1,5 eq. químicos) del agente alquilante, en este caso el sulfato de dimetilo (DMS), con agitación y bajo atmósfera de argón.

30

Se realiza el cálculo de los equivalentes químicos contando una "media" de 3 residuos hidroxilo por unidad de resveratrol. Por tanto, se considera que cada tramo de 228 g de extracto corresponde a "1 mol de resveratrol", y presenta tres funciones fenólicas de las cuales sólo una debe transformarse en éter de alquilo. Por tanto, el equivalente químico del reactivo de alquilación es igual a un tercio del número de moles de extracto de resveratrol puesto en práctica, considerando que el peso molecular es de 228.

35

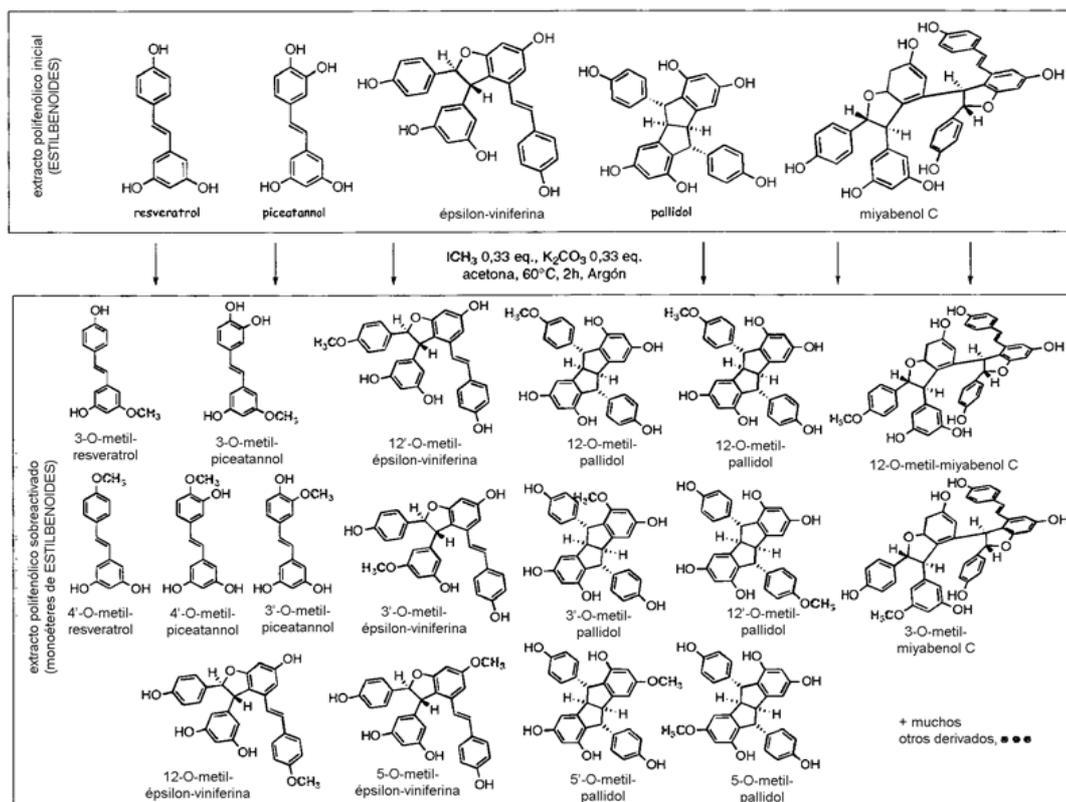
Se lleva la disolución nítida obtenida a reflujo durante 7 horas y se enfría la reacción. Tras adición de una disolución de ácido clorhídrico diluido, hasta la obtención de un pH ácido (220 ml), se continúa la agitación durante 45 min adicionales. Se concentra el medio de reacción a vacío (evaporación de la acetona). Se extrae la fase acuosa residual mediante un volumen igual de acetato de etilo, que se lava con dos veces con 200 ml de agua destilada (hasta la neutralidad del agua de lavado). A continuación se seca esta fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtra y se evapora a presión reducida para dejar el residuo de polifenoles estilbenoídicos alquilados (9,923 g; rendimiento bruto = 93,2%, P.M. medio = 242).

40

45

En el caso preferido, en el que cada molécula del extracto inicial experimenta una única metilación por unidad estilbenoídica ("resveratrol"), se obtiene una mezcla de diferentes regio y estereoisómeros posibles, tales como los monómeros y dímeros presentados a continuación.

50



Ejemplos de polifenoles estilbenoídicos activados contra los estreses carbonílicos

5 No obstante, generalmente, las diversas funciones fenólicas de cada una de las moléculas reaccionan con cinéticas diferentes. Para el resveratrol, por ejemplo, las proporciones entre los diferentes isómeros de posición son las siguientes:

resveratrol	6%
3-O-metil-resveratrol	8%
4'-O-metil-resveratrol	13%
3,4'-di-O-metil-resveratrol y 3,5-di-O-metil-resveratrol	23%
3,4',5-tri-O-metil-resveratrol	13%

10 Se obtiene como resultado una gran diversificación de los productos activos estilbenoídicos sobreactivados que están constituidos por los derivados monometilados de la figura anterior, pero no obstante van acompañados de manera minoritaria por isómeros di y trimetilados posibles.

15 Como para el ejemplo anterior, las estructuras alquiladas (metiladas), de estos compuestos estilbenoídicos se deducen a partir del análisis de sus diferentes espectros:

20 - La presencia de metil éteres de fenol se traduce en IR (figura 3), concretamente, por la aparición de bandas de absorción a entre 2974 y 2836  $\text{cm}^{-1}$  características de los C-H de metilos (alargamiento) y, entre 1040 y 1235  $\text{cm}^{-1}$ , éstas características de las funciones (C-O) éteres.

- El espectro de RMN 2D HMBC (figura 4), muestra correlaciones entre carbonos aromáticos oxigenados (de 155 a 160 ppm) y los protones de los metil éteres, que tienen resonancia a una frecuencia centrada en 3,8 ppm.

Ejemplo 4: Preparación de los agentes acilantes

25 Etapa n.º 1: saponificación del aceite de oliva:

30 A 50,46 g de aceite de oliva "virgen" (57 mmol, = "171 eq.") colocados en un matraz equipado con un condensador, se le añaden 16,08 g de hidróxido de potasio (285 mmol, 1,67 eq.), en disolución en 2,5 ml de etanol y 50 ml de agua. Se lleva la reacción a reflujo durante 5 horas. Se agita adicionalmente durante 14 h, a temperatura ambiente.

Tras haber diluido la disolución resultante mediante 300 ml de agua, se añade ácido clorhídrico a una décima parte (3,7%; p/v), hasta obtener un pH ácido de la fase acuosa (250 ml aproximadamente). Entonces se transfiere el contenido del matraz, que comprende un producto "insoluble" pastoso en la superficie, a un embudo de decantación y se extrae mediante 700 ml de hexano. Se separa la fase orgánica, después se lava 2 veces con 300 ml de agua destilada (obtención de un pH neutro de esta fase acuosa).

Se seca la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se filtra sobre frita n.º 4, después se evapora para proporcionar un residuo de 42,9 g (rendimiento bruto = 88,8%).

El espectro infrarrojo registrado en modo ATR con transformada de Fourier (figura 5) muestra una banda característica de los ácidos orgánicos libres a  $1709\text{ cm}^{-1}$ , al mismo tiempo que la desaparición de las bandas de ésteres del aceite de partida.

Etapa n.º 2: Activación de ácidos grasos procedentes de la saponificación del aceite de oliva mediante formación de cloruros:

Se agita la disolución de 41,5 g de ácidos grasos libres (147,1 mmol) procedentes de la etapa n.º 1, en 232 ml de cloroformo (estabilizado sobre amileno), bajo atmósfera de argón, en un matraz enfriado mediante un baño de hielo. Por medio de un embudo de adición, se introducen gota a gota 13,8 ml de cloruro de oxalilo ( $162\text{ mM} = 1,1\text{ eq.}$ ), a lo largo de un periodo de 30 minutos. Se introduce 1 ml de dimetilformamida (DMF) y se continúa la agitación sobre un baño de hielo durante 5 minutos. La concentración a presión reducida de la mezcla de reacción (cloroformo y cloruro de oxalilo en exceso) proporciona entonces 44,3 g de residuo aceitoso, de color ligeramente amarillo (rendimiento bruto = 100%).

Mediante destilación en un horno tubular (Kugelrohr), a vacío importante (2 mm de Hg), se elimina la coloración de este residuo (líquido incoloro), recogiendo las fracciones que destilan a de  $178\text{ a }195^{\circ}\text{C}$ .

Con el objetivo de analizar la composición de la mezcla de cloruros de ácidos grasos obtenidos, se exponen algunos microlitros de destilado a metanol. Entonces se inyecta la totalidad en un cromatógrafo en fase gaseosa equipado con una columna de tipo "FAME" ("Fatty Acid Methyl Ester", "éster metílico de ácidos grasos") y con un detector de masas en línea (DSQ-II). en el cromatograma presentado en la figura 6, el pico a 17,8 min corresponde al estearato ( $M^+ = 298$ ), aquél a 18,07 min al oleato ( $M^+ = 296$ ), aquél a 18,08 min a un linoleato ( $M^+ = 294$ ) y aquél a 19,38 min al linolenato ( $M^+ = 292$ ). Sus intensidades relativas son una buena indicación de sus proporciones respectivas. Los espectros de IR-FT (figura 7) y de RMN de protón (figura 8) concuerdan perfectamente con la formación exclusiva de estos cloruros:

Una banda a  $1798\text{ cm}^{-1}$ , característica de los cloruros de acilo.

Los protones en alfa del carbonilo ( $t, J = 7,5\text{ Hz}$ ) presentan un desplazamiento químico a 2,9 ppm, característico de la transformación de los carboxilos en cloruros de ácido.

Ejemplo 5: Esterificación de oligómeros de resveratrol O-alkilados

Se ponen 8,4 g (35 mmol) de oligómeros de resveratrol O-alkilados según el ejemplo 3, en suspensión en 106 ml de hexano con adición de 9,3 ml de trietilamina (70 mmol), se agitan bajo atmósfera de argón. Se añaden gota a gota 10,65 g de los cloruros preparados en el ejemplo 4, diluidos en 45 ml de hexano (35,1 mmol, 1 eq.).

Se deja la reacción aún durante 6 horas con agitación a temperatura ambiente, antes de colocarse en un embudo de decantación y lavarse con 100 ml de ácido clorhídrico a una décima parte, después 90 ml de una disolución de  $\text{NaHCO}_3$  al 10% (p/v) en agua, y finalmente con agua destilada hasta la neutralidad (dos veces con 90 ml). Se seca la fase orgánica sobre sulfato de sodio, se filtra, después se evapora hasta sequedad, a presión reducida. Deja un residuo de 19,21 g de productos activos estilbenoídicos de sarmientos de vid alkilados y estabilizados (=  $24,64\text{ mmol}$ ; rendimiento bruto = 70,6%, P.M. medio = 774).

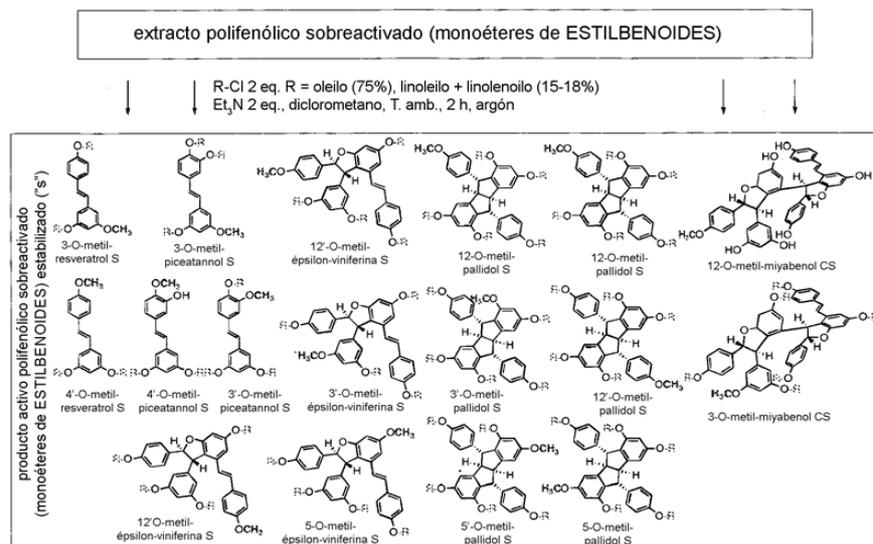
Con el objetivo de obtener medios de identificación de estos productos activos, entonces se somete el total a mediciones espectrales:

- El espectro infrarrojo mediante transformada de Fourier adquirido en modo ATR (figura 9) muestra la aparición de una banda intensa a  $1764\text{ cm}^{-1}$ , característica de los carboxilos de ésteres fenólicos, de manera concomitante con la desaparición de la banda grande centrada en  $3350\text{ cm}^{-1}$ , que correspondía a los hidroxilos fenólicos libres.

- El espectro de RMN bidimensional heteronuclear de  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  a larga distancia a 500 MHz (figura 10), obtenido en modo inverso (HMBC), hace que aparezcan netamente las correlaciones que concuerdan perfectamente con las estructuras diversificadas de polifenoles estilbenoídicos alkilados (metil éteres de oxígenos aromáticos) y esterificados (ésteres de ácidos grasos mayoritariamente insaturados, en mezcla estadística tal como resulta del aceite de oliva usado para preparar los agentes de acilación).

En el caso preferido, en el que cada molécula del extracto inicial sólo ha experimentado una metilación por unidad estilbenoídica (“resveratrol”), y en el que todas las funciones fenólicas residuales están aciladas por la mezcla de AG de aceite de oliva, se obtiene una mezcla de diferentes regio y estereoisómeros posibles de monómeros y dímeros presentados a continuación:

5



Ejemplo 5: Formulaciones cosméticas

10

- FÓRMULA A

FASES	MATERIAS PRIMAS	%
101	Agua	80,8000
102	EDTA de tetrasodio	0,0500
103	Glicerina	5,0000
104	Carbómero	0,3500
201	Cetearilglicósidos de trigo	0,7500
202	Cetearilglicósidos de cebada	1,7500
203	Alcohol cetearílico	2,5000
<b>204</b>	<b>Composición de la invención</b>	<b>del 0,05 al 1</b>
205	Manteca de <i>Butyrospermum parkii</i>	2,5000
206	Acetato de tocoferilo	0,5000
207	Aceite de pepitas de uva ( <i>Vitis vinifera</i> )	3,0000
208	Alcohol cetílico	1,0000
209	Cetilfosfato de potasio	1,0000
301	Conservantes	0,6000
401	Aroma	0,2000
501	Hidróxido de sodio, c.s.p. pH 6,00	

- FÓRMULA B

15

FASES	MATERIAS PRIMAS	%
101	Agua	79,40000
102	EDTA de tetrasodio	0,05000
103	Ácido cítrico, c.s.p. pH final 5,5	0,15000
201	Goma xántica	0,30000
202	Butilenglicol	5,00000
301	Cetearil éter 20	1,50000
302	Estearato de glicerilo	2,00000
<b>303</b>	<b>Composición de la invención</b>	<b>del 0,05 al 1</b>

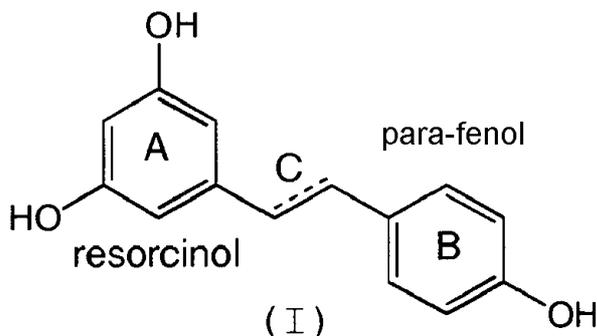
ES 2 482 115 T3

304	Manteca de <i>Butyrospermum Parkii</i>	1,00000
305	Laurato de hexilo	4,00000
306	Dimeticona	3,00000
307	Escualano	2,00000
308	Acetato de tocoferilo	0,50000
401	Conservantes	0,60000
501	Aroma	0,50000

## REIVINDICACIONES

1. Composiciones de polifenoles, **caracterizadas por que** se trata de monómeros, oligómeros o polímeros de unidades polifenólicas que responden a la fórmula (I):

5

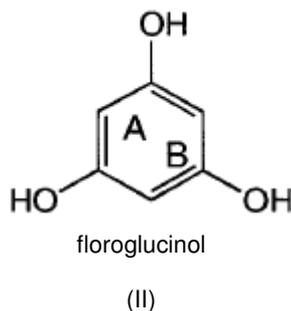


estando estas unidades **caracterizadas por** la presencia simultánea de un núcleo de tipo resorcinol (núcleo A) y de un núcleo de tipo para-fenol (núcleo B), unidos entre sí por un enlace carbonado C, sobreactivándose dichas unidades, en lo que se refiere a su poder nucleófilo, mediante alquilación de al menos una función fenólica de cada unidad presente en monómeros, oligómeros o polímeros, y mediante esterificación mediante mezclas de ácidos grasos que comprenden de manera mayoritaria ácidos grasos insaturados (AGI) de las funciones fenólicas no modificadas mediante la alquilación.

10

2. Composiciones según la reivindicación 1, **caracterizadas por que** en dichas unidades los núcleos A y B se confunden y el segmento C no existe, como en el floroglucinol de fórmula (II)

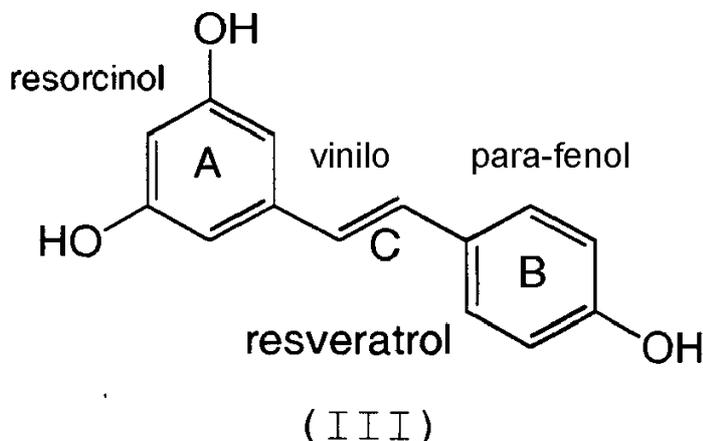
15



20

3. Composiciones según la reivindicación 1, **caracterizadas por que**, en dichas unidades, los núcleos A y B son distintos y el segmento C está constituido por 2 carbonos que o bien tienen hibridación sp<sup>2</sup> y forman un vinilo como en el resveratrol de fórmula (III)

25



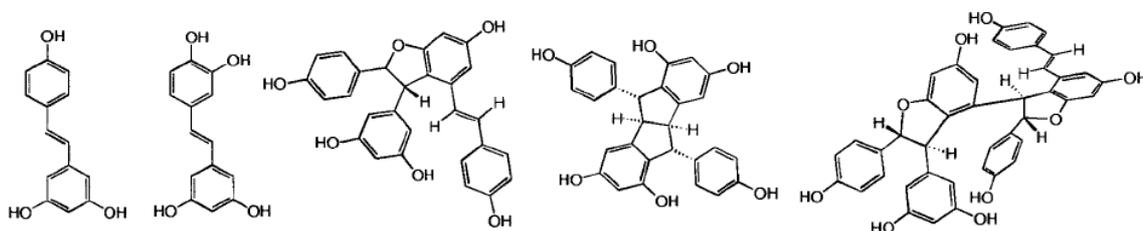
o bien tienen hibridación sp<sup>3</sup> y sirven de puente de unión entre los monómeros para formar los oligómeros y polímeros.

30

4. Composiciones según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizadas por que** el número de



miyabenol C, correspondientes respectivamente, a las fórmulas III, VII, VIII, IX y X a continuación:



- |   |                      |                      |                              |                  |                    |
|---|----------------------|----------------------|------------------------------|------------------|--------------------|
| 5 | resveratrol<br>(III) | piceatannol<br>(VII) | épsilon-viniferina<br>(VIII) | pallidol<br>(IX) | miyabenol C<br>(X) |
|---|----------------------|----------------------|------------------------------|------------------|--------------------|

obtenidos a partir de sarmientos y/o de escobajos de vid, de polígono, de frutos, por ejemplo de moreras.

- 10
12. Procedimiento de preparación de composiciones según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizado por que** se hacen reaccionar los polifenoles de los extractos vegetales definidos anteriormente
- 15
- en una primera etapa, con un agente de alquilación en condiciones que permiten sustituir el hidrógeno de al menos 1 grupo OH fenólico por unidad polifenólica constitutiva de monómeros, de oligómeros o de polímeros, preferiblemente de 1 a 2, por un grupo alquilo, y
  - en una segunda etapa, con un agente de acilación, concretamente, un anhídrido o un cloruro de ácido, en condiciones que permiten sustituir el hidrógeno de las funciones fenólicas que se dejan intactas por la alquilación, por un mezcla de radicales acilo, siendo R tal como se definió en la reivindicación 6.
- 20
13. Composiciones cosméticas, **caracterizadas por que** encierran una cantidad eficaz para luchar contra el envejecimiento de la piel, de una o más composiciones de dichos polifenoles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en asociación con vehículos inertes apropiados para un uso externo.
- 25
14. Aplicación de las composiciones según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en dietética.
15. Composiciones según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para un uso como medicamentos.

Fig. 1

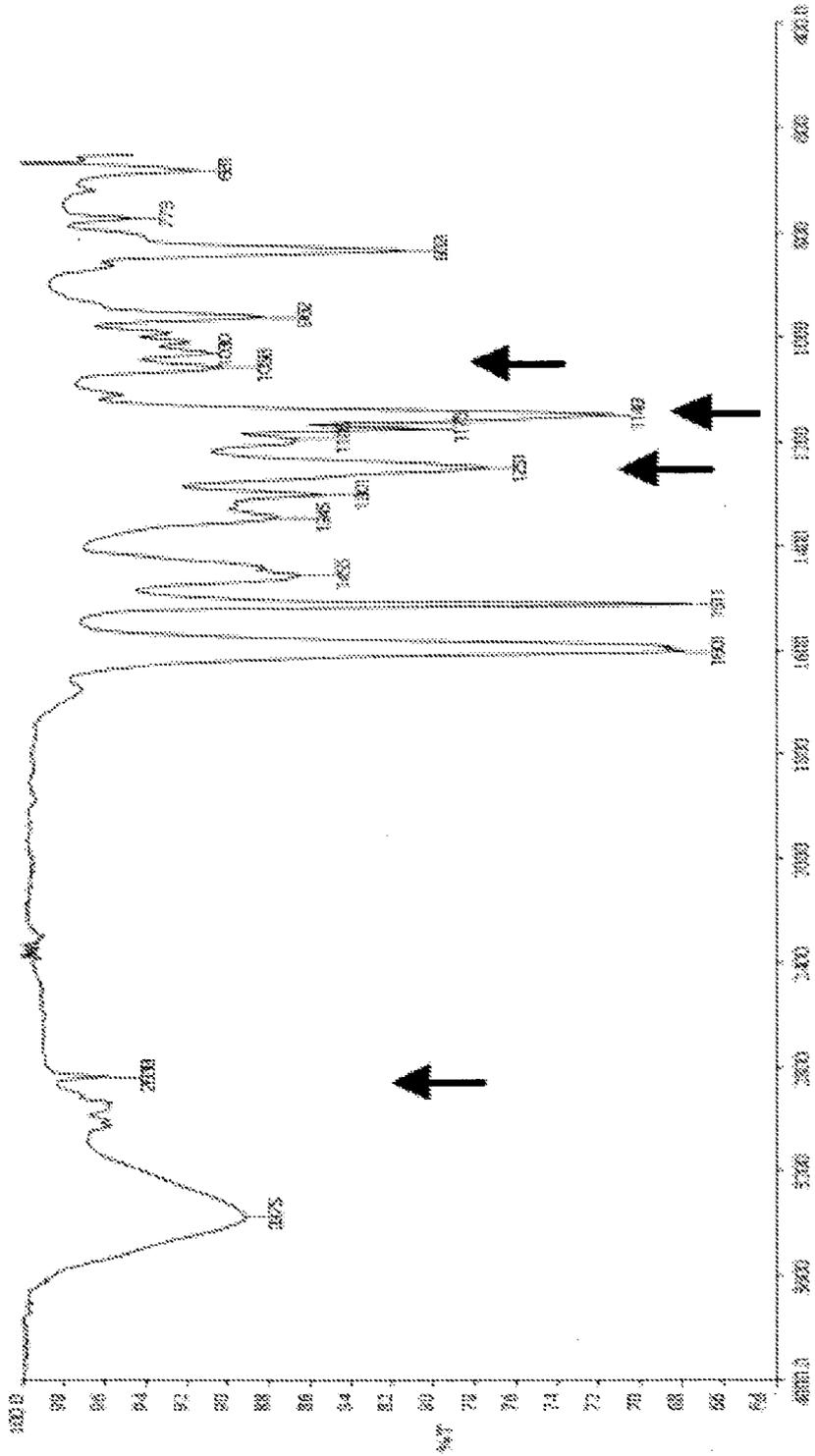


Fig. 2

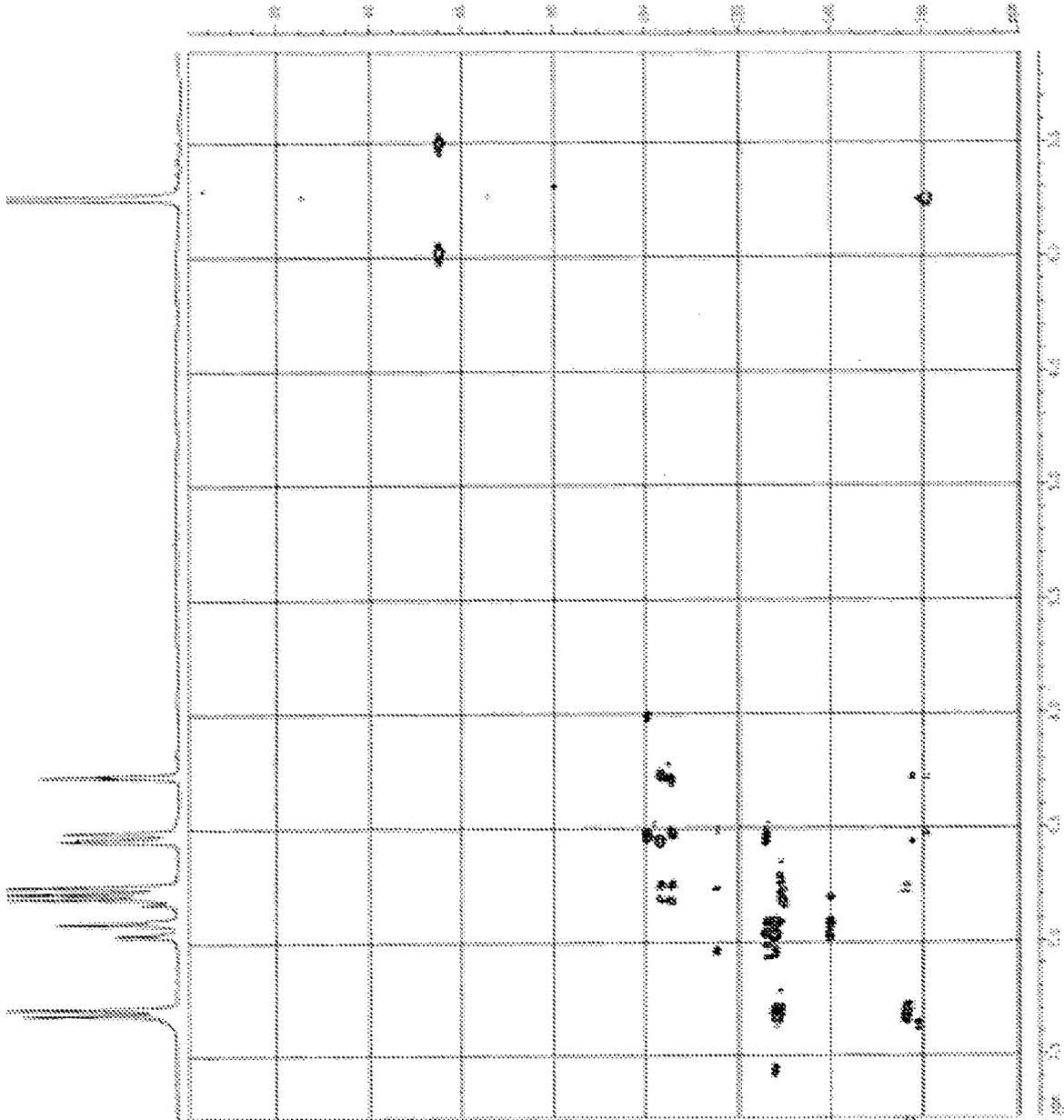


Fig. 3

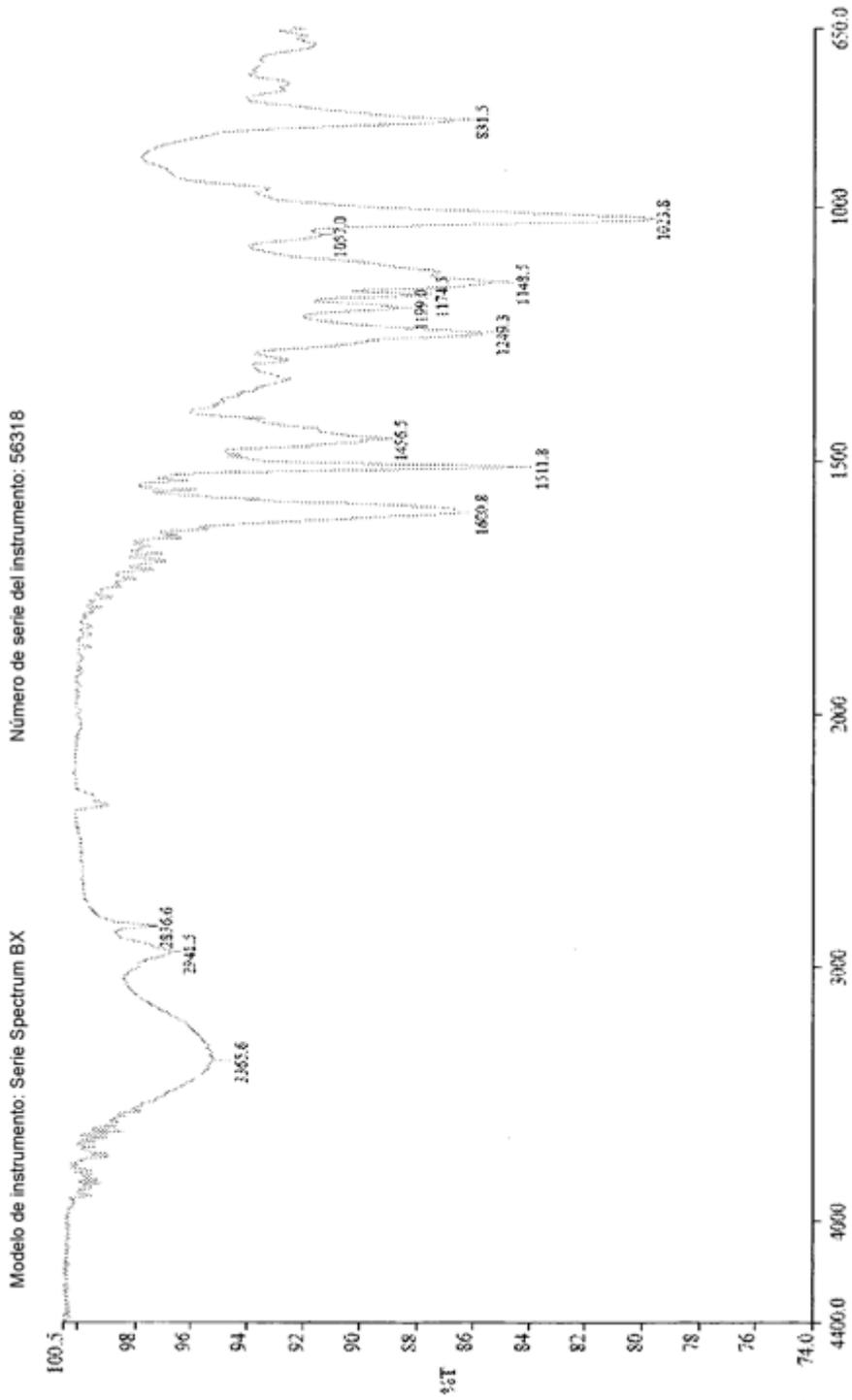


Fig. 4

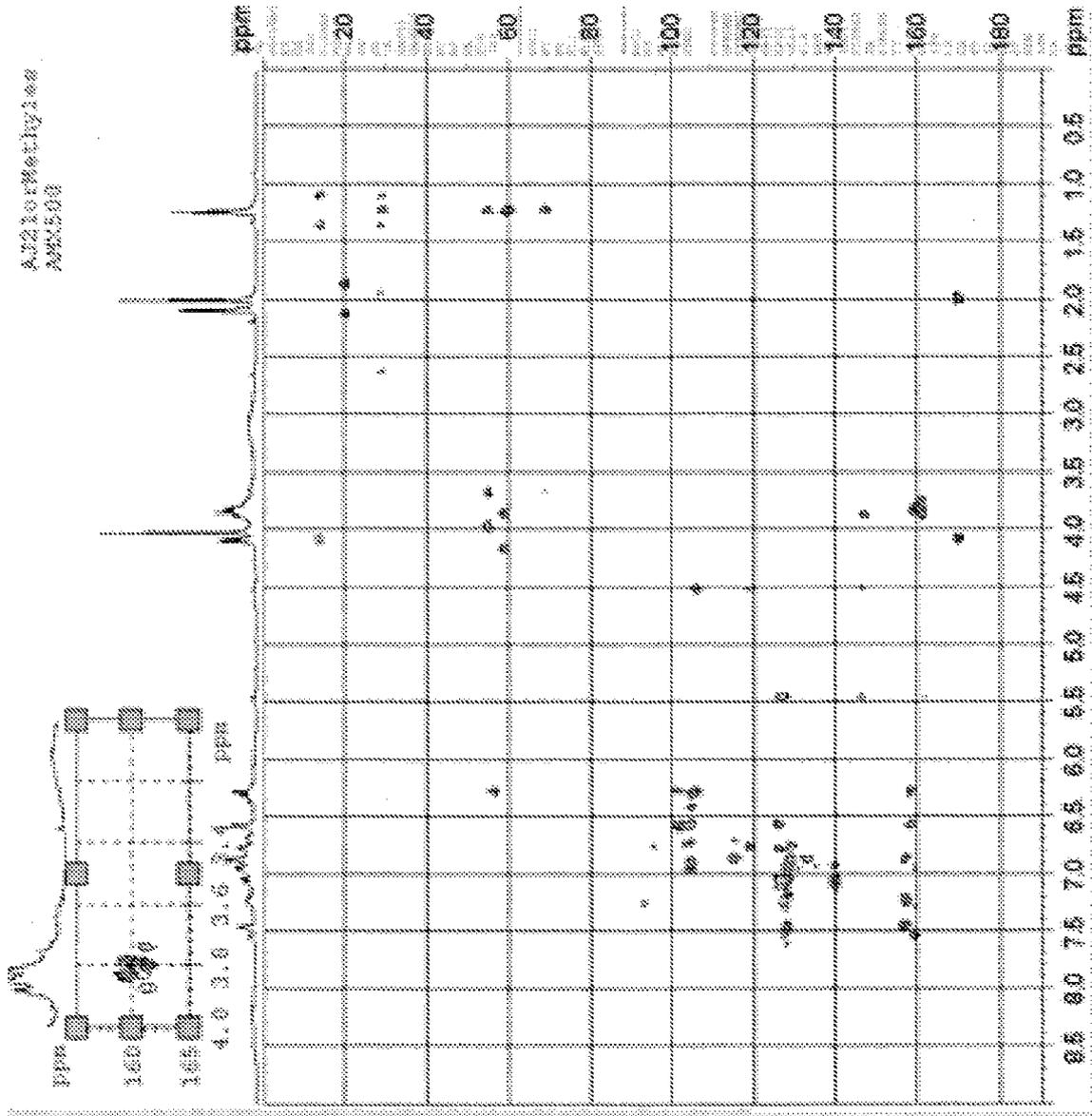


Fig. 5

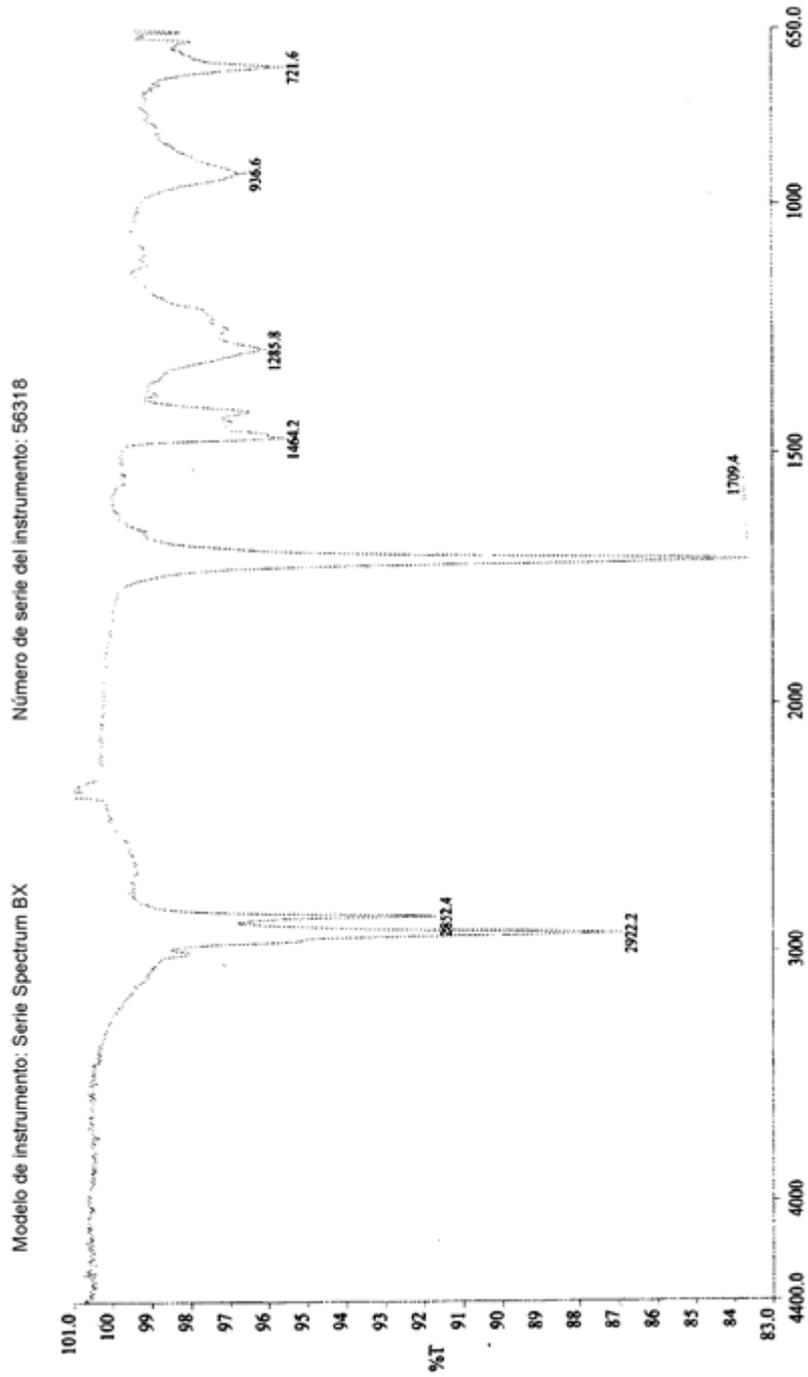


Fig. 6

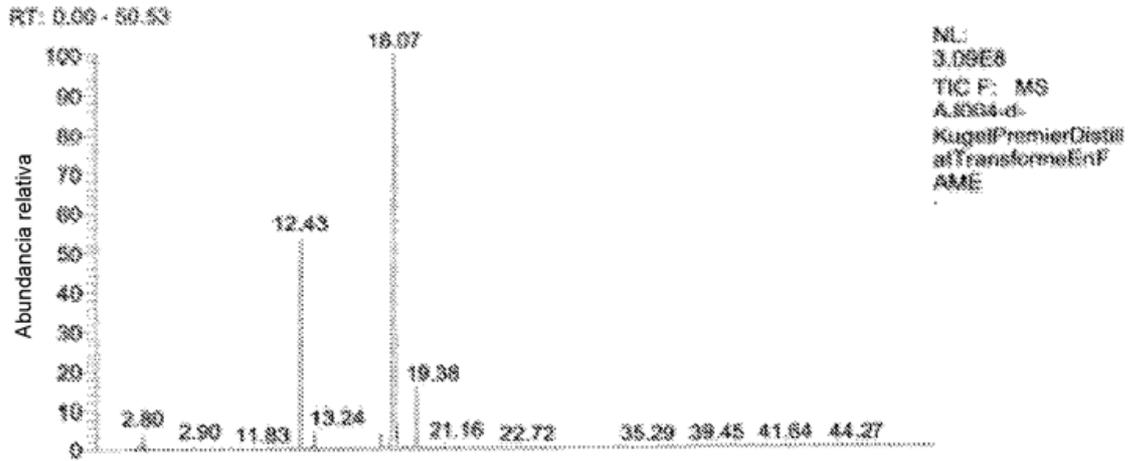


Fig. 7

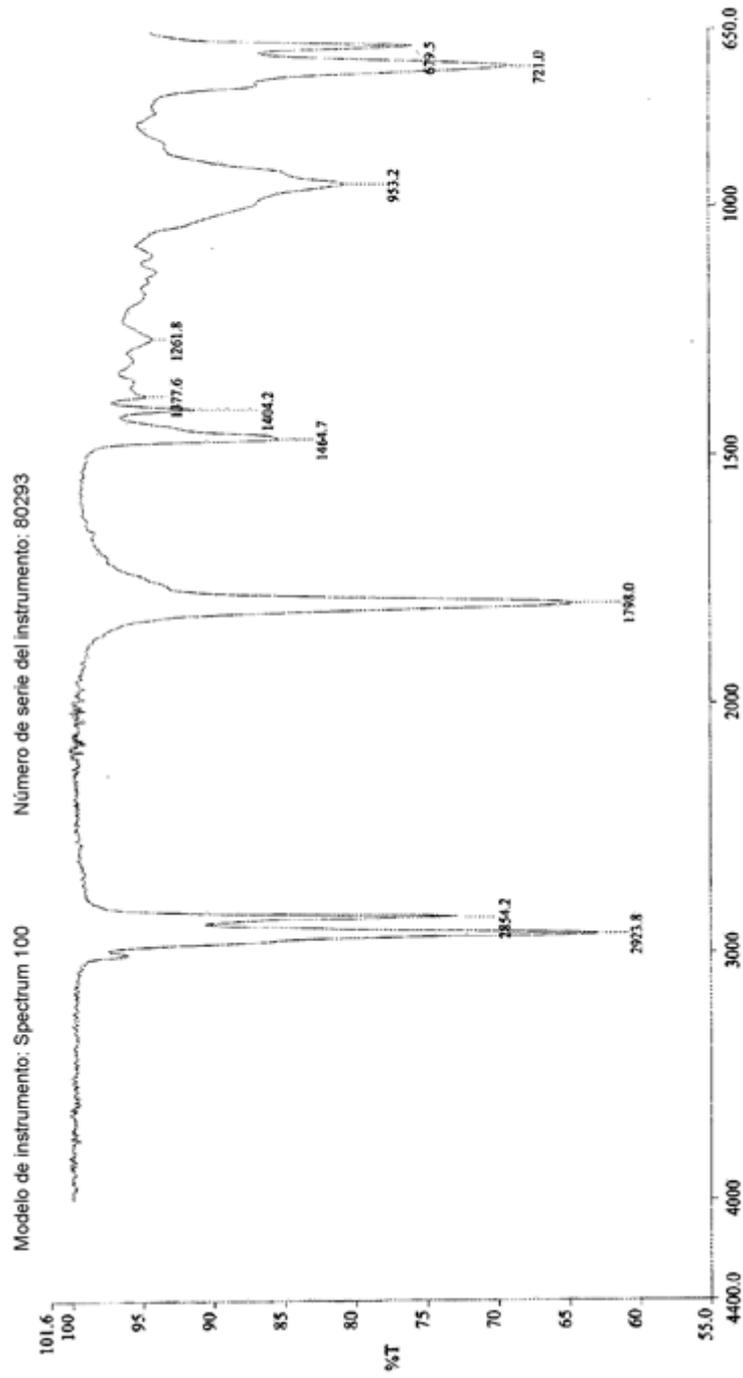


Fig. 8

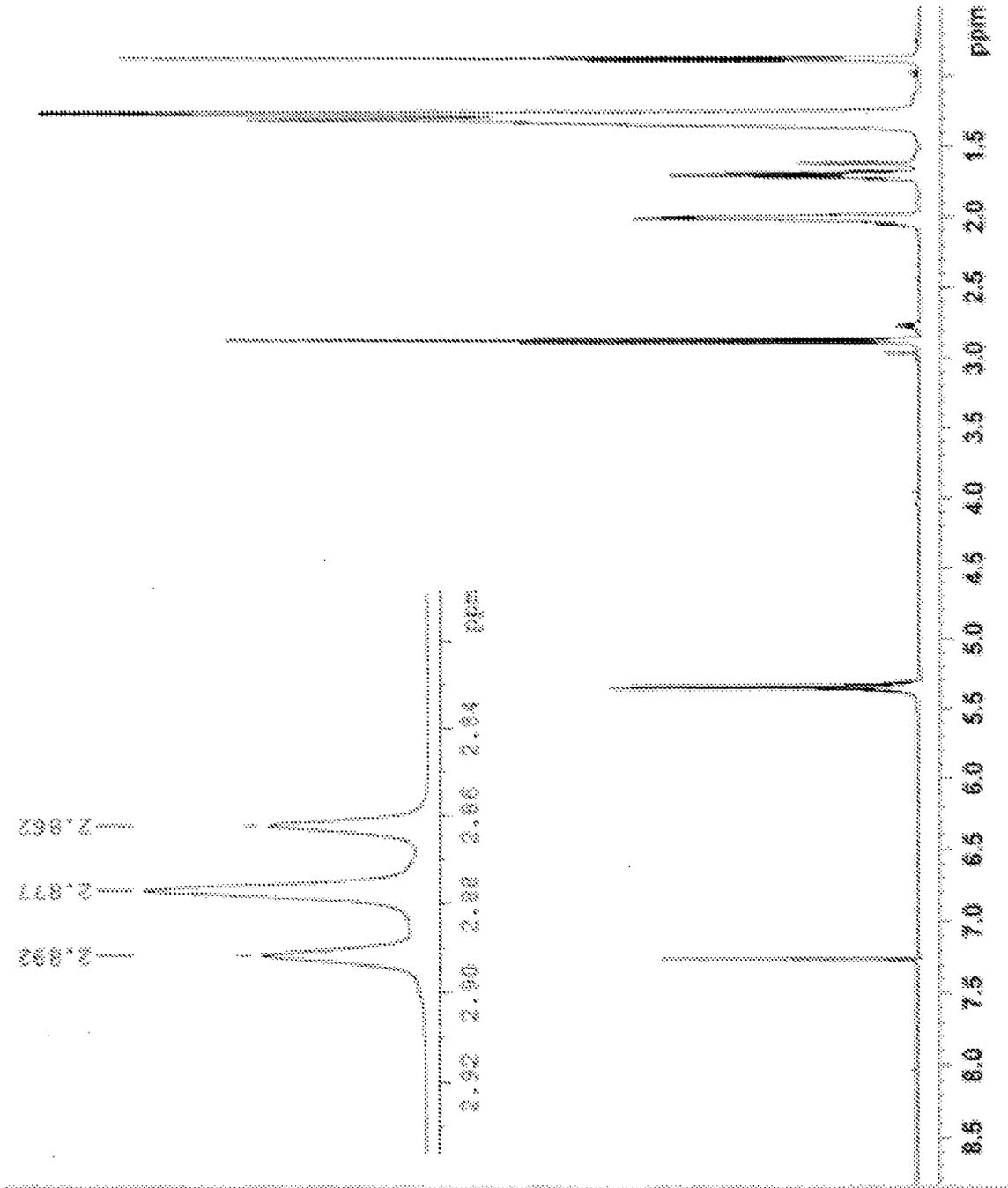


Fig. 9

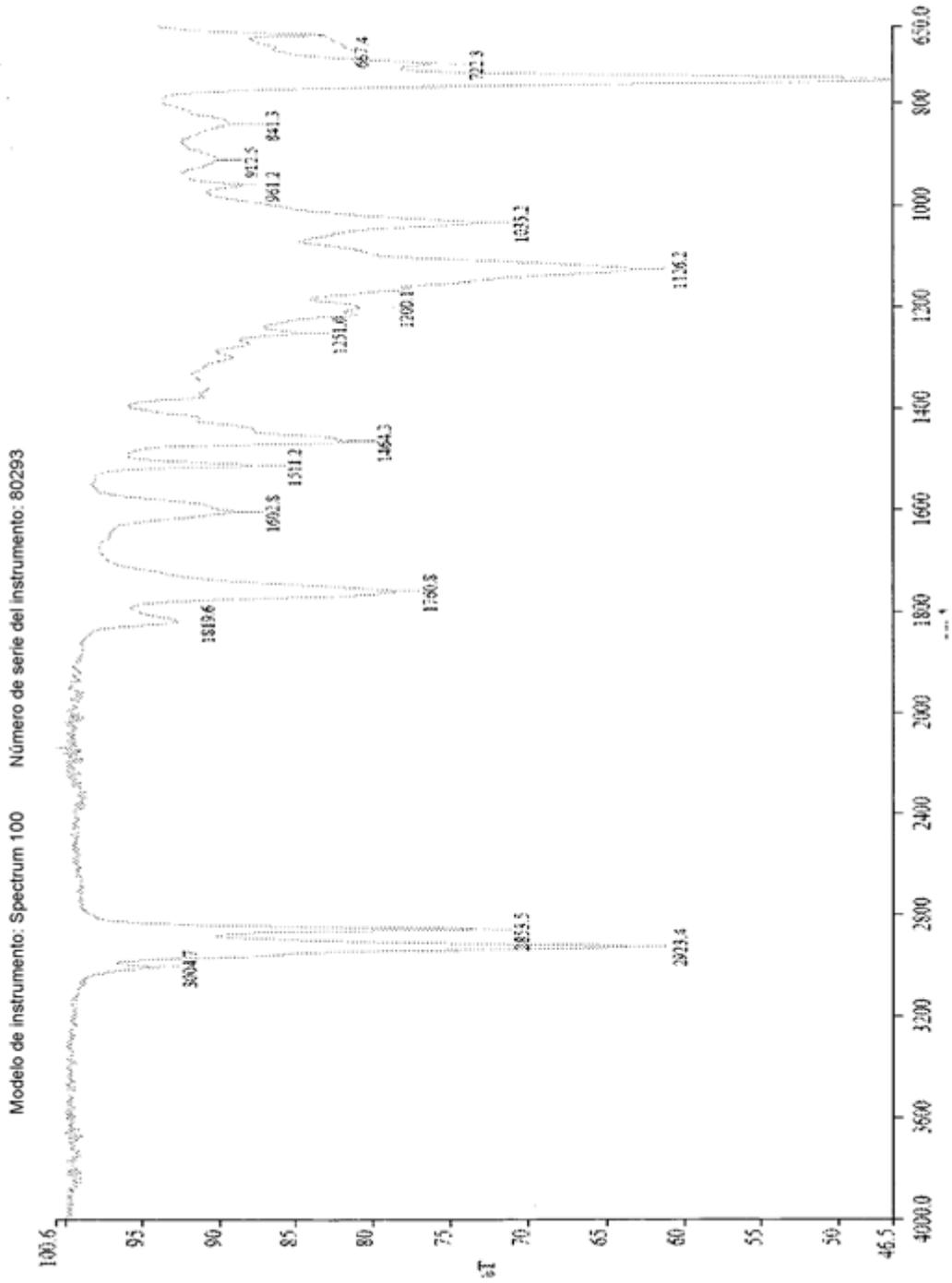


Fig. 10

