

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 421**

51 Int. Cl.:

**C07C 67/08** (2006.01)

**C07C 67/62** (2006.01)

**C07C 69/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2006 E 06714483 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.11.2014 EP 1853547**

54 Título: **Método de producción de capsinoide por condensación deshidratante y método de estabilización del capsinoide**

30 Prioridad:

**18.02.2005 JP 2005043154**

**27.07.2005 US 702606 P**

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

**22.12.2014**

73 Titular/es:

**AJINOMOTO CO., INC. (100.0%)  
15-1, Kyobashi 1-chome, Chuo-ku  
Tokyo 104-8315, JP**

72 Inventor/es:

**AMINO, YUSUKE;  
KUROSAWA, WATARU;  
NAKANO, TAKASHI y  
HIRASAWA, KAZUKO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 525 421 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

Método de producción de capsinoide por condensación deshidratante y método de estabilización del capsinoide

## Campo Técnico

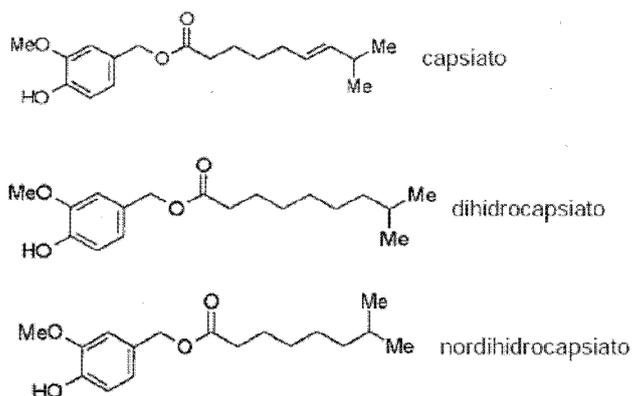
5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de capsinoide por condensación deshidratante y a un método de estabilización del capsinoide.

## Antecedentes

10 La capsaicina ((E)-N-(4-hidroxi-3-metoxibencil)-8-metil-6-nonenamida), el ingrediente picante de *Capsicum annuum* L., tiene actividades fisiológicas como la supresión de la obesidad, la promoción del metabolismo energético y similar. Debido a su gusto extremadamente picante, la capsaicina puede utilizarse únicamente en una cantidad limitada y no puede utilizarse como aditivo de alimentos, un producto farmacéutico y similar.

En los últimos años, Yazawa et al. han desarrollado e informado un cultivo no picante de *Capsicum annuum* L., pimiento dulce CH-19, al modificar una fruta no picante durante años, que se seleccionó de frutas de un cultivo altamente picante CH-19, originario de Tailandia (por ejemplo, Yazawa, S.; Suetome, N.; Okamoto, K.; Namiki, T. J. Japan Soc. Hort. Sci. 1989, 58, 601-607).

15 El pimiento dulce CH-19 contiene una gran cantidad de capsinoide, que carece de un gusto picante. El capsinoide incluye capsiato, dihidrocapsiato y norhidrocapsiato, en el orden del contenido, el primero es el más alto, que tiene las siguientes estructuras.



Los capsinoides tienen las mismas actividades fisiológicas que la capsaicina y no tienen gusto picante. Por lo tanto, pueden utilizarse como aditivos de alimentos o productos farmacéuticos. Sin embargo, la producción de capsinoide con alta pureza en gran cantidad de fuentes naturales es limitada y se ha deseado desarrollar un procedimiento nuevo sintético para producir capsinoide convenientemente en grandes cantidades.

30 Para formar un enlace éster de capsinoide, es práctica general condensar alcohol vanilílico y un derivado de ácido graso.

El alcohol vanilílico tiene dos sitios de reacción de un grupo hidroxilo primario y un grupo hidroxilo fenólico. Dado que los procedimientos convencionales de esterificación como un procedimiento de condensación de alcohol vanilílico y un cloruro ácido de ácido graso en presencia de una base (por ejemplo, Kobata, K.; Todo, T.; Yazawa, S.; Iwai, K.; Watanabe, T. J. Agric. Food Chem. 1998, 46, 1695-1697), permiten la reacción del cloruro ácido con el grupo hidroxilo principal y el grupo hidroxilo fenólico, el rendimiento del capsinoide objeto se reduce.

35

Para la síntesis del capsinoide mediante un procedimiento de esterificación convencional, el grupo hidroxilo fenólico del alcohol vanilílico puede protegerse selectivamente. Sin embargo, esto requiere protección y desprotección antes y después de la esterificación, lo que aumenta de manera no preferente el número de pasos necesarios para la producción. Además el capsinoide está asociado con un problema: es inestable y se descompone fácilmente durante la desprotección.

40

Como un procedimiento para reaccionar selectivamente el grupo hidroxilo principal únicamente, se puede mencionar la reacción de Mitsunobu (por ejemplo, Appendino, G.; Minassi, A.; Daddario, N.; Bianchi, F.; Tron, G. C. Organic

Letters 2002, 4, 3839-3841) y un procedimiento de uso de LiC1O4 (por ejemplo, Bandgar, B. P.; Kamble, V. T.; Sadavarte, V. S.; Uppalla, L. S. Synlett 2002, 735-738). El primero es defectuoso porque el óxido de trifenilfosfina y la menor cantidad de azodicarboxilato dietílico se generan como co-producto después de la reacción, lo cual complica la purificación, y el último no permitió la reproducción del rendimiento descrito en la publicación aunque el experimento fue repetido por los inventores de la presente. Por lo tanto, ninguno de ellos es adecuado para la práctica industrial.

Mientras tanto, el grupo hidroxilo principal por sí solo puede reaccionar selectivamente mediante un procedimiento de esterificación utilizando una enzima. Este procedimiento se considera adecuado para la práctica industrial habida cuenta de los aspectos de reactivos fácilmente disponibles y las etapas convenientes. Los ejemplos específicos del procedimiento que utiliza una enzima incluye un procedimiento de condensación de alcohol vanilílico y un ácido graso utilizando una enzima inmovilizada Novozym 435 (fabricada por Novozymes), que es una especie de lipasa, en disolvente de acetona (por ejemplo, JP-A-2000-312598). Sin embargo, como la reacción que utiliza la enzima es una reacción de equilibrio con agua producida durante la esterificación, la reacción lleva tiempo y el rendimiento es llega a ser tan bajo que ronda el 60%. Para aumentar el rendimiento, uno de los materiales de partida puede utilizarse en exceso para cambiar el equilibrio hacia la esterificación. Sin embargo, requiere una etapa para separar el material de partida que queda después de la reacción del producto resultante, lo cual complica la etapa. Cuando se agregan tamices moleculares como un agente deshidratante, el rendimiento aumenta, pero solo hasta un 80%, y el agente deshidratante necesita separarse por filtración. Para volver a utilizar la enzima, la enzima y el agente deshidratante deben separarse de la torta después de la reacción.

Además, el capsinoide es inestable y se sabe que se descompone por mera disolución en un disolvente orgánico (por ejemplo, Sutoh, K.; Kobata, K.; Watanabe, T. J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 4026-4030). Por lo tanto, las técnicas para la separación y conservación estables del capsinoide después de su producción son necesarias.

Kobata, Kenji et al.: "Enzymatic synthesis of a capsinoid by the acylation of vanillyl alcohol with fatty acid derivatives catalyzed by lipases" BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY, AND BIOCHEMISTRY, 66(2), 319-327; Ikeda, Ryohei et al.: "Preparation of artificial urushi via an environmentally benign process" BULLETIN OF THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN, 74(6), 1067-1073; Ikeda, Ryohei et al.: "Man-made urushi Preparation of crosslinked polymeric films from renewable resources via air-oxidation processes" PROCEEDINGS OF THE JAPAN ACADEMY, SERIES B: PHYSICAL AND BIOLOGICAL SCIENCES, 76B(10), 155-160; Buismann, G.J.H. et al.: "Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants" BIOTECHNOLOGY LETTERS, 20(2), 131136; Chemistry Letters 2000, pp. 1214-1215; y Chemistry Letters 2000, pp. 1122-1123 divulgan la esterificación de hidroximetilfenoles con ácido graso utilizando una enzima como catalizador en presencia de un disolvente.

Tricand de la Goutte, Jerome et al.: "Identification of novel polyphenol oxidase inhibitors by enzymatic one-pot synthesis and deconvolution of combinatorial libraries" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, 75(1), 93-99; EP-A-1 069 105; Macho, Antonio et al.: "Non-pungent capsaicinoids from sweet pepper: Synthesis and evaluation of the chemopreventive and anticancer potential" EUROPEAN JOURNAL OF NUTRITION, 42(1), 2-9; FR-A-2 721 213; Antonella Rosa et al.: "Antioxidant Activity of Capsinoids" J. AGRIC. FOOD CHEM., vol. 50, 2002, pp. 7396-7401; Giovanni Appendino et al.: "Chenoselective Esterification of Phenolic Acids and Alcohols" ORGANIC LETTERS, vol. 4, no. 22, 2002, pp. 3839-3841; y Yukinori Kawaguchi et al.: "Method of Acid Value Determination for Oils Containing Alkali-Labile Esters" JOURNAL OF OLEO SCIENCE, vol. 53, 2004, pp. 329-336 divulgan una composición que contiene ácido graso y un éster de un hidroximetilfenol con ácido graso.

Kouzou Sutoh et al.: "Stability of Capsinoid in Various Solvents" J. AGRIC. FOOD CHEM, vol. 49, 2001, pp. 4026-4030 se relaciona generalmente con la estabilidad de los ésteres de hidroximetilfenoles con ácido graso en disolventes.

### Descripción de la invención

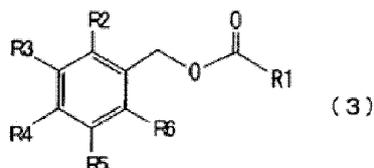
Por lo tanto, un objeto de la presente invención consiste en proporcionar un procedimiento para producir capsinoide mediante la esterificación, utilizando una enzima que convenientemente genera capsinoide en un rendimiento alto en poco tiempo sin utilizar un agente deshidratante. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para conservar establemente el capsinoide producido, separando el capsinoide resultante en condiciones estables.

Los inventores de la presente han realizado estudios exhaustivos para intentar resolver los problemas mencionados y descubrieron que, en una reacción de condensación que utiliza una enzima, una reacción de condensación sin un

disolvente genera convenientemente capsinoide en poco tiempo y en un rendimiento alto, porque el agua producida se separa rápidamente de la mezcla de reacción para acelerar la reacción aún sin utilizar un agente deshidratante. Además, los inventores han descubierto que la coexistencia de un porcentaje de un ácido graso con capsinoide permite la separación estable del capsinoide, así como también la conservación prolongada del capsinoide que resultó en la conclusión de la presente invención.

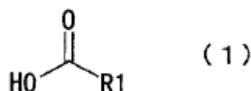
Por lo tanto, la presente invención proporciona lo siguiente.

[1] Un procedimiento para producir un compuesto de éster representado por la fórmula (3):



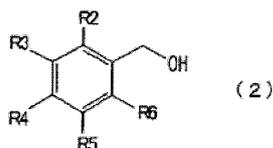
15 donde R1 es un grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono o un grupo alqueno sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono, y R2 a R6 son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo que tiene de 1 a 25 átomos de carbono, un grupo alqueno que tiene de 1 a 25 átomos de carbono, un grupo alquilo que tiene de 1 a 25 átomos de carbono, un grupo alqueno que tiene de 1 a 25 átomos de carbono, un grupo alquilo que tiene de 1 a 25 átomos de carbono, un grupo alqueno que tiene de 1 a 25 átomos de carbono o un grupo alquilo que tiene de 1 a 25 átomos de carbono, donde al menos uno de R2 a R6 es un grupo hidroxilo (en adelante denominado compuesto de éster (3)),

que comprende condensar un ácido graso representado por la fórmula (1):



donde R1 es como se definió anteriormente (en adelante denominado ácido graso (1)),

y un hidroximetilfenol representado por la fórmula (2):



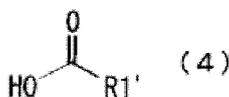
donde R2 a R6 son como se definió anteriormente (en adelante denominado hidroximetilfenol (2)),

utilizando una enzima como catalizador sin disolvente.

30 [ 2 ] El procedimiento del punto [1] anterior, donde el hidroximetilfenol (2) es alcohol vanilílico.

[ 3 ] El procedimiento de los puntos [1] o [2] anteriormente mencionados, en el cual se utiliza un ácido graso (1) en exceso de hidroximetilfenol (2) para contener ácido graso (1) en la mezcla de reacción después de la condensación.

[ 4 ] El procedimiento de los puntos [1] y [2] anteriormente mencionados, que comprende además agregar ácido graso representado por la fórmula (4):



donde R1' es un grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono o un grupo alquenilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono (en adelante también denominado ácido graso (4)),

después de la condensación de ácido graso (1) e hidroximetilfenol (2).

5 [5] El procedimiento del punto [3] anteriormente mencionado que comprende, después de la condensación, una etapa de purificación para separar de manera preparativa el compuesto de éster obtenido (3) como una mezcla con ácido graso (1).

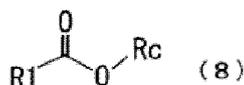
[6] El procedimiento del punto [4] anteriormente mencionado que comprende, después de la condensación, una etapa de purificación para separar de manera preparativa el compuesto de éster obtenido (3) como una mezcla con ácido graso (4).

10 [7] El procedimiento de cualquiera de los puntos [1] a [6] anteriores, donde R1 es un grupo seleccionado del grupo que consiste de un grupo hexilo, de un grupo 5-metilhexilo, un grupo trans-5-metil-3-hexenilo, un grupo heptilo, un grupo 6-metilheptilo, un grupo 5-metilheptilo, un grupo trans-6-metil-4-heptenilo, un grupo octilo, un grupo 7-metiloctilo, un grupo trans-7-metil-5-octenilo, un grupo nonilo, un grupo 8-metilnonilo, un grupo 7-metilnonilo, un grupo trans-8-metil-6-nonenilo, un grupo trans-8-metil-5-nonenilo, un grupo trans-7-metil-5-nonenilo, un grupo decilo, un grupo 9-metildecilo, un grupo trans-9-metil-7-decenilo, un grupo trans-9-metil-6-decenilo, un grupo undecilo y un grupo dodecilo.

[8] El procedimiento de cualquiera de los puntos [1] a [7] anteriores, donde la enzima es lipasa.

[9] El procedimiento de cualquiera de los puntos anteriores [1] a [8], donde la condensación se realiza a una temperatura de 15°C a 90°C.

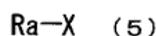
20 [10] El procedimiento de cualquiera de los puntos anteriores [1] a [9], donde el ácido graso (1) se obtiene por hidrólisis de un compuesto de éster representado por la fórmula (8):



25 donde R1 es como se definió anteriormente y Rc es un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo isopropilo, un grupo terc-butilo, un grupo alilo, o un grupo bencilo (en adelante también denominado compuesto de éster (8)),

y someter el compuesto resultante (A) a una etapa de reacción del compuesto con una base para formar un cristal de sal y convertir el cristal en una forma libre y/o (8) una etapa de destilación.

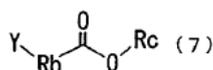
30 [11] El procedimiento del punto [10] anterior, en el cual el compuesto de éster (8) se obtiene convirtiendo un compuesto representado por la fórmula (5):



35 en la cual Ra es un grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 24 átomos de carbono o un grupo alquenilo sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 24 átomos de carbono y X es un átomo de halógeno (en adelante también denominado compuesto (5)), a un reactivo de Grignard representado por la fórmula (6):



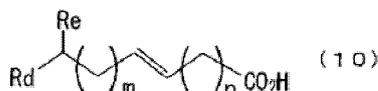
40 en la cual Ra y X son como se definió anteriormente (en adelante también denominado reactivo de Grignard (6)), y someter el reactivo de Grignard (6) a una reacción de acoplamiento cruzado con un compuesto representado por la fórmula (7):



5 en la cual Rb es un grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 24 átomos de carbono o un grupo alqueno sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 24 átomos de carbono (siempre que el total de átomos de carbono de Ra y Rb esté de 5 a 25), Rc es como se definió anteriormente e Y es un átomo de halógeno, un grupo metanosulfonilo, un grupo p-toluenosulfonilo, o un grupo trifluorometanosulfonilo (en adelante también denominado compuesto (7)).

[12] El procedimiento de cualquiera de los puntos [1] a [9] anteriores, en el cual el ácido graso (1) se obtiene por reacción de una mezcla de un ácido graso representado por la fórmula (10):

10



15

en la cual Rd y Re son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, m es 0 o 1, y n es un número entero de 1 a 5 (en adelante también denominado ácido graso (10)),

y un isómero cis de este con una base para formar sales de este, purificando, en base a la diferencia en la cristalinidad o solubilidad de las sales formadas, la sal de ácido graso (10) y convirtiendo la sal en una forma libre de esta.

20

De conformidad con la presente invención, se puede producir una gran cantidad de capsinoide convenientemente en un rendimiento alto a corto plazo utilizando una enzima. Además, como no se necesita un agente deshidratante (por ejemplo, un tamiz molecular y similar), la enzima puede reutilizarse con la simple recuperación por filtración. De conformidad con la presente invención, la reacción continúa en un alto rendimiento con una pequeña cantidad de enzima. Por lo tanto, la cantidad de enzima puede reducirse y la enzima puede recuperarse fácilmente. Además, el capsinoide resultante puede obtenerse establemente por separación en la coexistencia de un ácido graso. De esta

25

manera, la presente invención permite la producción industrialmente ventajosa del capsinoide.

De conformidad con el procedimiento estabilizante de la presente invención, el capsinoide puede conservarse establemente por coexistencia de ácido graso con capsinoide.

### La mejor forma de realizar la invención

La realización de la presente invención se explica a continuación.

30

Los términos utilizados en la presente invención se explican a continuación.

35

El "grupo alquilo que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" del "grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" representado por R1 puede ser lineal o ramificado. Los ejemplos específicos incluyen un grupo n-pentilo, un grupo sec-pentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo isopentilo, un grupo n-hexilo, un grupo isohexilo, un grupo 5-metilhexilo, un grupo heptilo, un grupo 6-metilheptilo, un grupo 5-metilheptilo, un grupo 4,4-dimetilpentilo, un grupo octilo, un grupo 2,2,4-trimetilpentilo, un grupo 7-metiloctilo, un grupo nonilo, un grupo 8-metilnonilo, un grupo 7-metilnonilo, un grupo decilo, un grupo 9-metildecilo, un grupo undecilo, un grupo dodecilo, un grupo tetradecilo, un grupo hexadecilo, un grupo octadecilo, un grupo icosilo, un grupo docosilo, un grupo pentacosilo y similar. Además de estos, incluye varios isómeros de cadena ramificada. Se prefiere un grupo alquilo que tiene de 6 y 12 átomos de carbono.

40

El "grupo alqueno que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" del "grupo alqueno no sustituido o sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" representado por R1 puede ser lineal o ramificado, y el número de enlaces dobles puede ser uno o más. Los ejemplos específicos incluyen un grupo penteno (por ejemplo, un grupo 4-pentenilo, un grupo 3-pentenilo, etc.), un grupo hexeno (por ejemplo, un grupo 2-hexenilo, un grupo 4-hexenilo, etc.), un grupo 5-metil-3-hexenilo, un grupo 5-metil-4-hexenilo, un grupo hepteno (por ejemplo, un grupo 2-heptenilo, un grupo 3-heptenilo, un grupo 5-heptenilo, etc.), un grupo 6-metil-4-heptenilo, un grupo octeno (por ejemplo, un grupo 3-octenilo, un grupo 6-octenilo, etc.), un grupo 7-metil-5-octenilo, un grupo noneno (por ejemplo, un grupo 3-nonenilo,

45

un grupo 7-nonenilo, etc.), un grupo 8-metil-6-nonenilo, un grupo 8-metil-5-nonenilo, un grupo 7-metil-5-nonenilo, un grupo decenilo (por ejemplo, un grupo 8- decenilo, etc.), un grupo dodecenilo (por ejemplo, un grupo 10-dodecenilo, etc.), un grupo tetradecenilo, un grupo 4,8,12-tetradecatrienilo, un grupo pentadecenilo (por ejemplo, un grupo 13-pentadecenilo, etc.), un grupo hexadecenilo, un grupo heptadecenilo (por ejemplo, un grupo 15-heptadecenilo, etc.), un grupo octadecenilo (por ejemplo, un grupo 16-octadecenilo, etc.), un grupo 17-nonadecenilo, un grupo icosenilo (por ejemplo, un grupo 18-icosenilo, etc.), un grupo henicosenilo (por ejemplo, un grupo 19-henicosenilo, etc.), un grupo docosenilo (por ejemplo, un grupo 20-docosenilo, etc.), un grupo pentacosenilo, y similar. Además de estos, incluye varios isómeros de cadena ramificada. Se prefiere un grupo alqueno que tiene de 6 y 12 átomos de carbono. La estructura estérica del enlace doble puede ser una forma trans o una forma cis, con preferencia por la forma trans.

El "grupo alquilo que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" del "grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" representado por R1 y el "grupo alqueno que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" del "grupo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" representado por R1 pueden tener opcionalmente de 1 a 4 sustituyentes. Como sustituyente, se pueden mencionar el grupo alquilo, un átomo de halógeno, un grupo haloalquilo, un grupo amino, un grupo hidroxilo, un grupo acilo, un grupo nitro, un grupo ciano, un grupo mercapto, y similar. De estos, se prefiere un grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono. Como el grupo alquilo que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, se pueden mencionar un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo, un grupo terc-butilo, un grupo isobutilo, y similar.

Como R1, se prefieren un grupo hexilo, un grupo 5-metilhexilo, un grupo trans-5-metilo-3-hexenilo, un grupo heptilo, un grupo 6-metilheptilo, un grupo 5-metilheptilo, un grupo trans-6-metil-4-heptenilo, un grupo octilo, un grupo 7-metiloctilo, un grupo trans-7-metil-5-octenilo, un grupo nonilo, un grupo 8-metilnonilo, un grupo 7-metilnonilo, un grupo trans-8-metil-6-nonenilo, un grupo trans-8-metil-5-nonenilo, un grupo trans-7-metil-5-nonenilo, un grupo decilo, un grupo 9-metildecilo, un grupo trans-9-metil-7-decenilo, un grupo trans-9-metil-6-decenilo, un grupo undecilo, un grupo dodecilo desde el aspecto de utilidad del compuesto de éster (3) objeto como capsinoide.

Mientras que el ácido graso (1) puede ser un compuesto único o una mezcla de dos o más tipos de compuestos donde R1 varía entre las definiciones anteriormente mencionadas, se prefiere un compuesto único. Cuando se utiliza un ácido graso obtenido por hidrólisis de capsinoide natural para la síntesis del capsinoide por condensación del ácido graso con alcohol vanilílico, dicho ácido graso (1) es una mezcla de ácido trans-8-metil-6-nonenico, ácido 8-metilnonanoico, ácido 7-metiloctanoico y similar. Para la reproducción de una composición de capsinoide que tiene una relación de abundancia natural por el uso de sustancias sintéticas, y similar, los capsinoides respectivos sintetizados independientemente mediante el presente procedimiento pueden mezclarse a la misma relación de abundancia como se mencionó anteriormente. El objeto también puede alcanzarse poniendo en práctica el presente procedimiento utilizando una mezcla de los ácidos grasos correspondientes (1) en la misma relación de abundancia que se mencionó anteriormente.

El "grupo alquilo que tiene de 1 a 25 átomos de carbono" representado por R2 a R6 puede ser lineal o ramificado. Los ejemplos específicos incluyen un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo isopropilo, un grupo n-butilo, un grupo terc-butilo, y similar y aquellos similares al "grupo alquilo que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" del "grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" representado por R1. Se prefiere un grupo alquilo que tiene de 1 a 12 átomos de carbono.

El "grupo alqueno que tiene de 1 a 25 átomos de carbono" representado por R2 a R6 puede ser lineal o ramificado y el número de enlaces dobles puede ser uno o más. Los ejemplos específicos incluyen un grupo vinilo, un grupo alilo, un grupo propenilo, un grupo isopropenilo, un grupo butenilo y similar y aquellos similares al "grupo alqueno que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" del "grupo alqueno sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" representado por R1. Se prefiere un grupo alqueno que tiene de 1 a 12 átomos de carbono.

El "grupo alquino que tiene de 1 a 25 átomos de carbono" representado por R2 a R6 puede ser lineal o ramificado, y el número de enlaces triples puede ser uno o más. Los ejemplos específicos incluyen un grupo etinilo, un grupo propinilo, un grupo pentinilo, un grupo hexinilo, un grupo octinilo, un grupo noninilo, y similar. Se prefiere un grupo alquino que tiene de 1 a 12 átomos de carbono.

El "grupo alcoxi que tiene de 1 a 25 átomos de carbono" representado por R2 a R6 puede ser lineal o ramificado, y se ejemplifica con un grupo alcoxi donde la porción alquilo es igual que el "grupo alquilo que tiene de 1 a 25 átomos de carbono" representado por R2 a R6. Se prefiere un grupo alcoxi que tiene de 1 a 12 átomos de carbono.

El "grupo alqueniloxi que tiene de 1 a 25 átomos de carbono" representado por R2 a R6 puede ser lineal o ramificado y el número de enlaces dobles puede ser uno o más. Un ejemplo incluye un grupo alqueniloxi donde la porción alquenilo es igual al "grupo alquenilo que tiene de 1 a 25 átomos de carbono" representado por R2 a R6. Se prefiere un grupo alqueniloxi que tiene de 1 a 12 átomos de carbono.

5 El "grupo alquiniloxi que tiene de 1 a 25 átomos de carbono" representado por R2 a R6 puede ser lineal o ramificado y el número de enlaces triples puede ser uno o más. Un ejemplo incluye un grupo alquiniloxi donde la porción alquinilo es similar al "grupo alquinilo que tiene de 1 a 25 átomos de carbono" representado por R2 a R6. Se prefiere un grupo alquiniloxi que tiene de 1 a 12 átomos de carbono.

10 Como R2 a R6, se prefieren un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo alilo, un grupo vinilo y un grupo viniloxi.

De R2 a R6, al menos uno de ellos es un grupo hidroxilo, y R4 es preferentemente un grupo hidroxilo. Además, se prefiere que únicamente uno de R2 a R6 sea un grupo hidroxilo.

15 Una combinación preferida de R2 a R6 es una combinación de R2, R5 y R6 que son átomos de hidrógeno, R3 que es un grupo metoxi, un grupo etoxi, un grupo alilo, un grupo vinilo o un grupo viniloxi y R4 que es un grupo hidroxilo. Particularmente, se prefiere que R3 sea un grupo metoxi (es decir, hidroximetilfenol (2) es alcohol vanilílico) desde el aspecto de utilidad del compuesto de éster objeto (3) como capsinoide.

Mientras que el hidroximetilfenol (2) puede ser un compuesto único o una mezcla de dos o más tipos de compuestos que tienen las definiciones anteriormente mencionadas, se prefiere un compuesto único.

20 El "grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" representado por R1' se ejemplifica mediante aquellos similares al "grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" representado por R1.

El "grupo alquenilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" representado por R1' se ejemplifica mediante aquellos similares al "grupo alquenilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" representado por R1.

25 Como R1', se prefiere un grupo hexilo, un grupo 5-metilhexilo, un grupo trans-5-metil-3-hexenilo, un grupo heptilo, un grupo 6-metilheptilo, un grupo 5-metilheptilo, un grupo trans-6-metil-4-heptenilo, un grupo octilo, un grupo 7-metiloctilo, un grupo trans-7-metil-5-octenilo, un grupo nonilo, un grupo 8-metilnonilo, un grupo 7-metilnonilo, un grupo trans-8-metil-6-nonenilo, un grupo trans-8-metil-5-nonenilo, un grupo trans-7-metil-5-nonenilo, un grupo decilo, un grupo 9-metildecilo, un grupo trans-9-metil-7-decenilo, un grupo trans-9-metil-6-decenilo, un grupo undecilo, y un grupo dodecilo y R1' es más preferentemente el mismo que el grupo seleccionado como R1. Es decir, R1 de ácido graso (1) y R1' de ácido graso (4) son preferentemente el mismo grupo.

30

El "grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" representado por R" se ejemplifica mediante aquellos similares al "grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" representado por R1.

35 El "grupo alquenilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" representado por R" se ejemplifica mediante aquellos similares al "grupo alquenilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" representado por R1.

40 La presente invención proporciona un procedimiento de producción de compuesto de éster (3) que comprende característicamente condensar ácido graso (1) e hidroximetilfenol (2) utilizando una enzima como un catalizador sin disolvente.

45 De conformidad con el procedimiento de la presente invención que se realiza sin disolvente, a diferencia de los procedimientos para acelerar una reacción de condensación que requiere esencialmente el uso de un disolvente polar alto (miscible con agua, por ejemplo, acetona, dioxano, etc.) que puede disolver completamente hidroximetilfenol (2) (por ejemplo, alcohol vanilílico), la reacción se acelera aún después de utilizar un agente deshidratante porque el agua producida se separa rápidamente de la mezcla de reacción. Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención es superior a los procedimientos conocidos en los siguientes aspectos.

(i) Como el agua producida por la reacción de condensación se separa rápidamente de la mezcla de reacción y se remueve del sistema de reacción, el equilibrio cambia hacia la producción de éster y la relación de



Como "grupo alquilo que tiene de 1 a 24 átomos de carbono" del "grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 24 átomos de carbono" representado por Ra o Rb, se puede mencionar un "grupo alquilo que tiene de 1 a 25 átomos de carbono" para R2 a R6, donde el número de átomos de carbono es de 1 a 24.

5 Como "grupo alqueno que tiene de 1 a 24 átomos de carbono" del "grupo alqueno sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 24 átomos de carbono" representado por Ra o Rb, se puede mencionar un "grupo alqueno que tiene de 1 a 25 átomos de carbono para R2 a R6, donde el número de carbono es de 2 a 24.

10 El "grupo alquilo que tiene de 1 a 24 átomos de carbono" del "grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 24 átomos de carbono" representado por Ra o Rb y el "grupo alqueno que tiene de 1 a 24 átomos de carbono" del "grupo alqueno sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 24 átomos de carbono representado por Ra o Rb puede tener de 1 a 4 sustituyentes. Como sustituyente, se pueden mencionar los sustituyentes similares a aquellos que puede tener el "grupo alquilo que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" del "grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono" representado por R1 puede tener.

15 El grupo representado por Ra y el grupo representado por Rb están unidos por una reacción de acoplamiento cruzado para ser un grupo representado por R1 (es decir, un grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono, o un grupo alqueno sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono). Por lo tanto, Ra y Rb se determinan adecuadamente por la estructura de R1.

Como el átomo de halógeno representado por X o Y, se puede mencionar un átomo de flúor, un átomo de cloro, un átomo de bromo y un átomo de yodo con preferencia por un átomo de bromo.

20 En el procedimiento de acoplamiento cruzado, el compuesto (5) se convierte en primer lugar en un reactivo de Grignard (6), que se somete posteriormente a una reacción de acoplamiento cruzado con un compuesto (7) para producir un compuesto de éster (8), que se hidroliza posteriormente para generar un ácido graso (1).

El compuesto (5) y el compuesto (7) pueden obtenerse mediante síntesis de conformidad con un procedimiento conocido y similar, y cuando están comercialmente disponibles, los productos comerciales pueden utilizarse como se encuentran.

25 El compuesto (5) puede convertirse en un reactivo de Grignard (6) mediante la reacción de un compuesto (5) con magnesio de conformidad con un procedimiento convencional.

30 La reacción de acoplamiento cruzado entre el reactivo de Grignard (6) y el compuesto (7) puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la reacción del reactivo de Grignard (6) y el compuesto (7) en una cantidad de 1 a 3 equivalentes en relación con el reactivo de Grignard (6) en un disolvente en presencia de un catalizador de cobre a una baja temperatura (preferentemente a una temperatura de mezcla de reacción de -20°C a 15°C, más preferentemente de -5°C a 10°C, particularmente preferentemente de -3°C a 5°C) durante 15 minutos a 3 horas.

Como el disolvente, se pueden utilizar ésteres como tetrahidrofurano (THF), dietiléter, metil terc-butil éter, 1,2-dimetoxietano, y similar; N-metilpirrolidona (NMP), 1,3-dimetil-3,4,5,6-tetrahidro-2-(1H)-pirimidina (DMPU), etc. y disolventes mezclados de estos.

35 Como el catalizador de cobre, se pueden mencionar  $\text{Li}_2\text{CuCl}_4$ , CuI, CuBr, CuCl, CuBr•  $\text{Me}_2\text{S}$  y similares. El catalizador de cobre se utiliza en una cantidad de 0,5% a 20% en moles, preferentemente de 1 a 3% en moles, en relación con el compuesto (7). Se prefiere CuBr como catalizador porque produce menos subproductos.

Para lograr un progreso regular de la reacción, se pueden utilizar aditivos como trimetilclorosilano y similares en una cantidad de 0,5 a 4 equivalentes (preferentemente 1 a 2 equivalentes) en relación con el compuesto (7).

40 La hidrólisis del compuesto de éster (8) obtenido mediante la reacción de acoplamiento arriba mencionada puede realizarse mediante un procedimiento conocido (procedimiento que utiliza un ácido, procedimiento que utiliza un álcali, etc.).

45 El ácido graso (1) obtenido por hidrólisis del compuesto de éster (8) se disuelve en una solución acuosa básica y se extrae con un disolvente orgánico como éter, éter metil t-butílico, hexano, heptano y similares para separar eficientemente los subproductos como cetona, alcohol y similar.

A continuación se explica un procedimiento para purificar un ácido graso obteniendo de una vez un ácido graso como un cristal de sal y convirtiendo el cristal de sal en su forma libre.

Las impurezas pueden separarse de un ácido graso obtenido por un procedimiento conocido y similar, o un ácido graso (1) obtenido por la hidrólisis anteriormente mencionada, formando un cristal de sal con una base. Mientras que se explica el procedimiento de purificación de un ácido graso (1) a los fines de la conveniencia de la explicación, el procedimiento explicado a continuación se aplica de manera similar al ácido graso obtenido por un procedimiento conocido y similar.

El cristal de sal puede formarse, por ejemplo, agitando ácido graso (1) y una base en un disolvente.

Como base, se pueden mencionar bases inorgánicas (por ejemplo, hidróxidos, carbonatos, hidrogenocarbonatos, etc. de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio, bario, etc.), aminas orgánicas (por ejemplo, etilendiamina, 1,3-diaminopropano, 1,3-diamino-2-propanol, ciclohexilamina, 4-metoxibencilamina, etanolamina, (S)- o (R)-fenilglicinol, o (R)-fenilalaninol, cis-2aminociclohexanol, trans-4-aminociclohexanol, (1S,2R)-cis-1-amino-2-indanol, L-lisina, L-arginina, etc.), amoníaco y similar. La cantidad de la base que puede utilizarse varía de 0,8 a 1,2 equivalentes, preferentemente de 0,9 a 1,1 equivalentes, en relación con el ácido graso (1).

Como el disolvente, por ejemplo, se pueden utilizar agua; alcoholes como metanol, etanol, isopropanol y similar; acetatos como acetato de etilo, acetato de isopropilo y similar; éteres como dietiléter, metil terc-butil éter, THF y similar; hidrocarburos como hexano, heptano y similar; cetonas como acetona y similar; hidrocarburos halogenados como cloroformo y similar y disolventes mezclados de estos.

Al formar un cristal de sal de ácido graso (1) con una base como se mencionó anteriormente y, cuando fuere necesario, la recrystalización, el subproducto de la reacción diferente al ácido graso (1), como alcohol, cetona y similar puede separarse eficientemente con facilidad.

Posteriormente, el cristal de sal obtenido se agrega a una solución acuosa ácida (por ejemplo, ácido clorhídrico, solución de ácido cítrico acuoso), la mezcla se extrae con un disolvente orgánico (por ejemplo, hexano, heptano, etc.) y el disolvente orgánico se evapora para producir el ácido graso objeto (1) con una pureza alta.

Cuando el ácido graso (1) es una mezcla de un compuesto representado por la fórmula (10):



donde Rd y Re son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, m es 0 o 1 y n es un número entero de 1 a 5,

y un isómero cis de este, la mezcla puede reaccionar con una base para formar sales de estos, y la sal de ácido graso (10) puede separarse de la sal de su isómero cis en base a la diferencia en la cristalinidad o solubilidad de las sales formadas.

Los ejemplos del "grupo alquilo que tiene de 1 a 6 átomos de carbono" representado por Rd o Re incluyen un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo isopropilo, un grupo butilo, un grupo isobutilo, un grupo sec-butilo, un grupo terc-butilo, un grupo pentilo, un grupo isopentilo, un grupo neopentilo, un grupo terc-pentilo, un grupo hexilo y similar, con preferencia por un grupo metilo para ambos Rd y Re.

m es 0 o 1, preferentemente 0.

n es un número entero de 1 a 5, preferentemente 3 o 4, más preferentemente 4.

Para la separación del ácido graso (10) de su isómero cis, las sales de este pueden formarse de la misma manera que en la formación de un cristal de sal de ácido graso (1) con una base.

Como un procedimiento para la separación de la sal de ácido graso (10) de la sal de su isómero cis en base a la diferencia en la cristalinidad o solubilidad de sales formadas, se pueden mencionar precipitación de cristal, lavado de suspensión, recrystalización y similar.

Se muestra a continuación un ejemplo de la separación de ácido graso (10) de su isómero cis. En el caso de una mezcla (88% de forma trans, 12% de forma cis) de ácido trans-8-metil-6-nonenoico y su isómero cis (ácido cis-8-metil-6-nonenoico), se forman sales de los isómeros utilizando cis-2-aminociclohexanol como una base y la sal del

isómero cis se remueve mediante una precipitación de cristal de las sales de los isómeros dos o tres veces, donde la relación del ácido trans-8-metil-6-nonenoico puede aumentar a no menos del 97%.

5 El cristal de sal obtenido se agrega a una solución acuosa ácida (por ejemplo, ácido clorhídrico, solución de ácido cítrico acuoso, etc.), la mezcla se extrae con un disolvente orgánico (por ejemplo, hexano, etc.) y el disolvente orgánico se evapora para producir un ácido graso (10).

Mediante la aplicación de dicho procedimiento de purificación por formación de un cristal de sal de ácido graso (1) con una base, las sustancias neutrales como cetona, alcohol y similar, así como también ácido graso (sustancia ácida) diferente al producto objeto, que se produce como subproducto, pueden separarse de manera simultánea.

10 La separación anteriormente mencionada y el procedimiento de purificación de ácido graso (10) y su isómero cis no se limitan al ácido graso obtenido mediante la reacción de acoplamiento anteriormente mencionada, pero similarmente aplicable como un procedimiento de purificación de ácido graso (10) obtenido por un procedimiento conocido.

El hidroximetilfenol (2) a utilizarse en la presente invención puede obtenerse mediante síntesis de conformidad con el procedimiento conocido y cuando está comercialmente disponible, se puede utilizar un producto comercial.

15 La operación de la condensación no se limita particularmente en la medida en que la reacción de condensación de ácido graso (1) e hidroximetilfenol (2) proceda. Por ejemplo, se agregan ácido graso (1), hidroximetilfenol (2) y enzima a un recipiente de reacción y la mezcla se calienta.

20 Como la enzima a utilizar en la presente invención, cualquiera puede utilizarse sin limitación particular en la medida en que pueda mediar la reacción de condensación de ácido graso (1) e hidroximetilfenol (2) y se puede utilizar una esterasa representativamente. Como la esterasa, se utiliza generalmente lipasa, y se puede utilizar uno originado de microorganismo, uno originado de animal, o uno originado de una planta. De ellos, se prefiere lipasa originado de microorganismos. Específicamente, se pueden mencionar lipasas originados del género *Candida* (por ejemplo, *Candida antarctica*, *Candida cylindracea* etc.), el género *Pseudomonas* (por ejemplo, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas sp.*, *Pseudomonas cepacia* etc.), el género *Alcaligenes* (por ejemplo, *Alcaligenes* etc.), el género *Aspergillus* (por ejemplo *Aspergillus niger* etc.), y el género *Rhizopus* (por ejemplo *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae* etc.). Mientras que se pueden obtener lipasas mediante cultivo de los microorganismos capaces de producirlos, los productos comerciales también pueden utilizarse. Como lipasa comercialmente disponible, se pueden mencionar lipasa PS "Amano", lipasa AK "Amano", lipasa AS "Amano", lipasa AYS "Amano" (todos fabricados por Amano Enzyme Inc.), Lipozyme CALB L (Novozymes) y similar.

30 Cada una de estas enzimas puede utilizarse por sí solas o como una mezcla de estas.

35 Mientras que se pueden utilizar enzimas en cualquier forma en la medida en que puedan agregarse a una solución de reacción, el uso de una enzima inmovilizada es preferible dado que se facilita la recuperación de la enzima y similar. Como enzima inmovilizada, se pueden utilizar las enzimas inmovilizadas de lipasa, como lipasa PS-C "Amano" I (inmovilizada en cerámica), lipasa PS-C "Amano" II (inmovilizada en cerámica) y lipasa PS-D "Amano" I (inmovilizada en tierra diatomea) (todas producidas por Amano Enzyme Inc.), Novozym 435, Lipozyme RM IM y Lipozyme TL IM (todas producidas por Novozymes A/S) y similares. De estas, se desean lipasa PS "Amano" y Lipozyme CALB L ante su bajo costo y se desean las enzimas inmovilizadas de lipasa como PS-C "Amano" y similares por ser susceptibles de reciclaje. El uso de lipasa PS-C "Amano" o lipasa PS-D "Amano" I pueden resultar en una coloración suave de la mezcla de reacción. Ante la ausencia de coloración, se desea Novozym 435.

40 Aunque la cantidad de enzima a agregar varía en función de la actividad de la enzima y de la cantidad de disolvente y materiales de partida a agregar, se puede seleccionar en un intervalo de 0,01% a 60% en peso, deseablemente de 0,1% a 30% en peso de ácido graso (1). Además, la enzima puede agregarse durante la reacción para uso en exceso.

45 La reacción se realiza sin disolvente desde los aspectos de plazo corto de reacción, operación conveniente y reducción de costo.

Cuando la reacción se lleva a cabo sin disolvente, el hidroximetilfenol (2) (por ejemplo, alcohol vanilílico) no se disuelve suficientemente en ácido graso aceitoso (1) y el sistema de reacción no es uniforme. Sin embargo, la operación de agitación no se ve afectada y el sistema de reacción se torna homogéneo a medida que se realiza la reacción.

El sistema de reacción puede colocarse en una presión reducida o un gas inerte puede fluir en la superficie de la mezcla de reacción; donde el agua producida puede separarse eficientemente y la reacción puede acelerarse.

5 El ácido graso (1) y el hidroximetilfenol (2) (por ejemplo, alcohol vanilílico, etc.) utilizados para la reacción pueden utilizarse a una relación molar que produce compuesto de éster (3) (por ejemplo, capsinoide, etc.) en su mayor rendimiento. Los entendidos en la técnica pueden determinar la relación de ácido graso (1) e hidroximetilfenol (2) que corresponde al compuesto de éster objeto (3) mediante un ensayo preliminar simple. Por ejemplo, la relación de ácido graso (1):alcohol vanilílico puede seleccionarse adecuadamente del intervalo de 0,8:1 a 1,2:1, más deseablemente el intervalo de 1:1 a 1:1:1. En dicha condición de reacción, el compuesto de éster (3) (es decir, capsinoide) que contiene un subproducto a dicho nivel bajo que destruye la purificación por cromatografía puede producirse con el uso de ácido graso en bajo exceso.

Es posible agregar uno de los materiales de partida mientras se monitorea el progreso de la reacción.

15 Como temperatura de reacción, una temperatura a la cual la enzima a utilizar reaccionaría más eficientemente podría seleccionarse y los entendidos en la técnica pueden fijar la temperatura mediante un ensayo preliminar simple. Como la temperatura óptima varía en función de la enzima a utilizar, no puede decirse completamente pero la temperatura oscila generalmente de 15°C a 90°C, más deseosamente 35°C a 65°C. Por ejemplo, cuando se utiliza Novozym 435 o lipasa PS "Amano" como lipasa, la reacción se acelera calentando a aproximadamente 50°C. Se desea también calentar a aproximadamente 50°C para promover la separación de agua y fusionar suficientemente el ácido graso.

20 El tiempo de reacción se determina adecuadamente en consideración de la actividad de la enzima a utilizar, la cantidad de materiales de partida, la concentración de cada reactivo y similar y en consideración del rendimiento y similar. Generalmente el tiempo varía de 3 a 90 horas, preferentemente de 10 a 30 horas.

25 Después de completar la reacción, el compuesto de éster (3) puede separarse de conformidad con un procedimiento convencional. Por ejemplo, un disolvente orgánico (por ejemplo, hexano, heptano, etc., cuando hidroximetilfenol (2) es alcohol vanilílico), donde hidroximetilfenol (2) es insoluble, se agrega para permitir la precipitación del hidroximetilfenol no reactivo (2), filtrando hidroximetilfenol (2) y la enzima. Por ende, por ejemplo, se agrega de 5% a 10% de solución de ácido cítrico acuoso para partir el filtrado, y la capa orgánica se concentra bajo presión reducida para producir un compuesto de éster (3) (compuesto de éster (3) que tiene una pureza no menor a un 99% del área mediante análisis HPLC puede obtenerse en un rendimiento alto no menor de 90%). Para obtener compuesto de éster (3) que tiene aún mayor pureza, se puede realizar la separación y la purificación mediante cromatografía de gel de sílice.

30 Cuando la enzima ha de reutilizarse, la enzima por sí sola necesita filtrarse. Cuando la enzima está contaminada con hidroximetilfenol (2) en ese momento, la mezcla puede utilizarse para la siguiente reacción. Es posible separar el hidroximetilfenol (2) por sí solo disolviéndolo en un disolvente orgánico y la enzima por sí sola puede utilizarse para la siguiente reacción.

35 El compuesto de éster obtenido (3) puede estabilizarse por coexistencia con ácido graso (4).

40 Cuando el compuesto de éster (3) se separa y purifica por cromatografía de columna, el ácido graso (1) presente en exceso en la mezcla de reacción tiene un valor Rf similar al del compuesto de éster (3); por lo tanto, la separación y purificación del compuesto de éster (3) se asocia con dificultad. Los inventores de la presente trataron la separación y la purificación del ácido graso (1) restante en la mezcla de reacción cuando se agregó en exceso y el compuesto de éster (3) por cromatografía de columna y el compuesto de éster (3) puro obtenido fue fácil de descomponer. Por ejemplo, cuando se sintetizó el decanoato vanilílico de ácido decanoico y alcohol vanilílico, se separó y purificó de ácido decanoico por cromatografía en columna de gel de sílice para generar decanoato vanilílico puro, que se disolvió en acetonitrilo y se analizó por HPLC. Como resultado, la pureza del decanoato vanilílico fue de un 95,6% del área. Sin embargo, cuando la muestra se volvió a analizar 62 horas después, la pureza cayó a un 82,0% del área. Este resultado significa que el decanoato vanilílico se descompuso. Se considera que el decanoato vanilílico se ha tornado inestable al separarse del ácido decanoico. Por lo tanto, el ácido graso (1), difícil de separar del compuesto de éster (3) se deja preferentemente junto en vez de separado, desde el aspecto de la estabilidad del compuesto de éster (3).

El capsinoide obtenido por extracción de una planta que contiene capsinoide se considera comparativamente estable en una base de aceite utilizada para la extracción, pero no se conoce un procedimiento para estabilizar el capsinoide obtenido por síntesis.

5 Los inventores de la presente han descubierto que el compuesto de éster (3) obtenido por separación preparativa junto con el ácido graso, en lugar de la separación sin ácido graso, cuando se purifica compuesto de éster (3) mediante cromatografía de gel de sílice, es estable, a saber, la coexistencia del ácido graso contribuye a estabilizar el compuesto de éster (3) y completó el procedimiento de estabilización de la presente invención. Por ejemplo, el dihidrocapsiato se sintetizó utilizando un pequeño exceso de ácido graso y el dihidrocapsiato obtenido mediante separación preparativa junto con el exceso de ácido graso restante en aproximadamente 2% en peso en relación con dihidrocapsiato se analizó por HPLC. Como resultado, la pureza no fue menor de 99% del área y se descubrió que el dihidrocapsiato podría preservarse establemente en hexano a 5°C durante al menos 30 días sin descomposición.

10 Por lo tanto, el compuesto de éster (3) puede obtenerse en un estado estable utilizando ácido graso (1) en más exceso que hidroximetilfenol (2) para la reacción de condensación y durante la etapa de purificación después de la condensación, separando preparativamente el compuesto de éster (3) como una mezcla con ácido graso (1) contenido en la mezcla de reacción.

15 Alternativamente, el compuesto de éster (3) puede obtenerse en un estado estable condensando ácido graso (1) e hidroximetilfenol (2), agregando ácido graso (4), y durante la etapa de purificación, separar preparativamente el compuesto de éster (3) como una mezcla de ácido graso (4). El ácido graso (4) puede agregarse después de la condensación de ácido graso (1) e hidroximetilfenol (2) y antes de la etapa de purificación.

20 Como procedimiento para obtener ácido graso (4), se prefieren un procedimiento de síntesis a base del procedimiento de acoplamiento cruzado arriba mencionado y un procedimiento de purificación en base a la destilación o cristalización de la sal de ácido graso.

25 El procedimiento de separación preparativa no se limita particularmente en la medida en que se pueda obtener una mezcla de compuesto de éster (3) y ácido graso (ácido graso (1) o ácido graso (4)) por separación de otro componente, y por ejemplo, se pueda realizar cromatografía de gel de sílice utilizando gel de sílice como fase estacionaria

30 En un ejemplo, cuando se realiza la separación preparativa por cromatografía de gel de sílice, las condiciones de esta incluyen una columna con 10 g de gel de sílice por 1 g de un producto crudo y un disolvente mezclado de dietiléter:hexano=15:85 como un eluyente, donde el compuesto de éster (3) y el ácido graso se eluyen casi simultáneamente. Las fracciones eluidas se recolectan y concentran bajo presión reducida para producir una mezcla de compuesto de éster (3) y una pequeña cantidad de ácido graso.

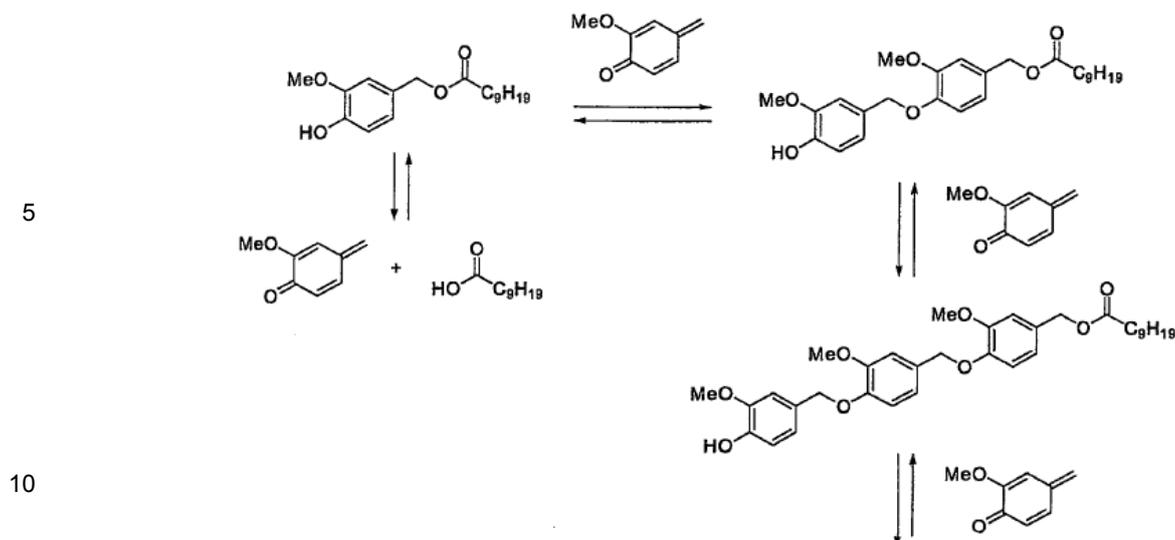
35 Mediante separación preparativa del compuesto de éster (3) como una mezcla del ácido graso de esta manera, la cantidad de gel de sílice a utilizar para la purificación puede ser pequeña y el compuesto de éster obtenido (3) puede tener una estabilidad mayor en comparación con el aislamiento del compuesto de éster (3) por sí solo.

Cuando un compuesto de éster (3) se aísla individualmente o se separa preparativamente como una mezcla con el ácido graso en una cantidad insuficiente para la estabilización, el compuesto de éster (3) puede estabilizarse agregando ácido graso (4) al compuesto de éster (3).

40 Por ejemplo, cuando se agrega un 9,1% en peso de ácido decanoico, en acetonitrilo, a decanoato vanilílico separado de ácido decanoico, la pureza del decanoato vanilílico es de 97,6% en área aún después de 19,5 horas y la pureza se mantiene.

El decanoato vanilílico se considera por ejemplo, en el siguiente estado de equilibrio.

45



15

Como se mencionó anteriormente, los presentes inventores han descubierto que el compuesto de éster (3) es extremadamente estable cuando coexiste con una cantidad en exceso pequeña de ácido graso, pero el compuesto de éster (3) muestra menor pureza con el tiempo una vez que se separa del ácido graso. Esto se considera atribuible al hecho de que la quinonematida producida por la descomposición del compuesto de éster (3) reacciona secuencialmente no solo con ácido graso sino que también con un grupo hidroxil fenólico de decanoato vanilílico como se mencionó anteriormente. Por ende, se considera que, debido a la coexistencia con ácido graso, el equilibrio cambia hacia el lado de producción de compuesto de éster (3), la descomposición de compuesto de éster (3) se evita y se puede realizar la estabilización.

20

Los presentes inventores han descubierto también que la adición de un pequeño exceso del ácido graso correspondiente (4) en compuesto de éster (3) parcialmente descompuesto por separación del ácido graso y similar evita la descomposición del compuesto de éster (3) y deriva en la estabilización de éste, que a su vez aumenta (recupera) la pureza. Se considera atribuible a la adición del ácido graso correspondiente (4), que resulta en el equilibrio entre el compuesto de éster (3) y los productos descompuestos que han cambiado hacia el lado de producción del compuesto de éster (3), debido al mismo mecanismo anteriormente mencionado.

25

Mientras que el ácido graso (4) a agregar se selecciona adecuadamente en función del uso de la composición que contiene el compuesto de éster (3) y ácido graso (4), R1' de ácido graso (4) es el mismo grupo que R1 del compuesto de éster (3), particularmente se prefiere ácido graso (1).

30

El ácido graso solo necesita coexistir en un intervalo del 0,1% en peso al 30% en peso, preferentemente del 1% en peso al 5% en peso, en relación con el compuesto de éster (3). Cuando se utiliza un exceso de ácido graso (1) para condensación, por ende la cantidad de ácido graso (1) a utilizar debería ser controlada de forma tal que el ácido graso en exceso se contiene en la mezcla de reacción en los intervalos arriba mencionados. Cuando se agrega ácido graso (4) después de la condensación y cuando se agrega ácido graso (4) después del aislamiento del compuesto de éster (3), para estabilización, se agrega preferentemente ácido graso de forma tal que está presente en el rango arriba mencionado.

### Ejemplos

35

La presente invención se explica detalladamente a continuación mediante referencia a Ejemplos. En los siguientes Ejemplos, las estructuras de los compuestos sintetizados se identificaron mediante espectro de resonancia magnética nuclear (Bruker AVANCE400 (400MHz)). Se midió GC-MS utilizando 5890SERIESII, 5972SERIES, 7673CONTROLLER, todos HEWLETT PACKARD. El contenido de ácidos grasos se calculó a partir del valor integral pico del espectro de resonancia magnética nuclear, o se analizó utilizando un kit de análisis de ácido graso (YMC).

Las condiciones de medición HPLC de capsinoide son como se describen a continuación.

Condiciones de HPLC:

columna: Inertsil C8 3u pm (diámetro 4,0 mm x 100 mm) eluyente: Una mezcla disolvente de eluyentes A, B, que se muestran a continuación, y un tampón se eluyó mediante el procedimiento de gradiente de elución.

5 tampón: 30mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH=2,0,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ )

eluyente A:  $\text{CH}_3\text{CN}$ :tampón=80:20

eluyente B:  $\text{CH}_3\text{CN}$ :tampón=0:100

condiciones de gradiente: 0 min:A/B=(20/80); 15 min:A/B=(70/30); 30 min:A/B=(100/0); 45 min:A/B=(100/0); 45,1 min:A/B=(20/80); 50 min:A/B=(20/80)

10 detección: UV210 nm

temperatura: temperatura ambiente

[Ejemplo 1] Síntesis de ácido 8-metilnonanoico (Ejemplo de procedimiento de acoplamiento cruzado)

15 Bajo una atmósfera de argón, se suspendieron virutas de Mg (6,12 g, 252 mmol) en THF (10 ml). Se agregaron a temperatura ambiente 200 mg de bromuro de isopentilo (34,6 g, 229 mmol), y se confirmaron calor exotérmico y generación de espuma. Se agregó THF (50 ml), y se agregó lentamente por goteo una solución de todo el bromuro de isopentilo restante en THF (65 ml) a temperatura ambiente durante 1 h y la mezcla se agitó durante 2 h. En ese momento, se alcanzó un estado de reflujo moderado. La reacción solución se filtró a través de un tapón de algodón mientras se lavaba con THF para proporcionar una solución (cantidad total 180 ml) de bromuro de isopentilmagnesio en THF.

20 Bajo una atmósfera de argón, se disolvieron cloruro de cobre (I) (426 mg, 4,30 mmol) en NMP (55,2 ml, 575 mmol). El recipiente de reacción se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  (baño de hielo), y se agregó por goteo una solución de 5-bromoalcanoato de etilo (30,0 g, 144 mmol) en THF (35 ml) durante 10 min. La solución THF de bromuro de isopentilmagnesio, que se preparó por adelantado, se agregó lentamente por goteo a  $0^\circ\text{C}$  (baño de hielo) durante 1,5 h. Después de agitación adicional a la misma temperatura durante 45 min, la reacción se inactivó cuidadosamente con solución de cloruro de amonio acuoso saturado (200 ml), y la mezcla se extrajo dos veces con heptano (200 ml). Las capas de heptano combinadas se lavaron con solución de cloruro de amonio acuoso saturado (100 ml), agua (100 ml) y salmuera saturada (100 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y concentraron bajo presión reducida para proporcionar un aceite amarillo claro (30,8 g). Se destilaron 29,6 g bajo presión reducida (1,2 mmHg,  $69-71^\circ\text{C}$ ) para proporcionar 8-metilnonanoato de etilo (20,6 g, Rendimiento 74,7%) como un aceite transparente incoloro.

30  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,860 (d, 6H,  $J=6,63\text{Hz}$ ), 1,13-1,33 (m, 11H), 1,48-1,64 (m, 3H), 2,28 (t, 2H,  $J=7,55\text{Hz}$ ), 4,12 (q, 2H,  $J=7,13\text{Hz}$ ).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 14,60, 22,98, 25,36, 27,56, 28,30, 29,54, 29,89, 34,75, 39,31, 60,47, 174,2.

35 A partir del 8-metilnonanoato de etilo obtenido, 19,20 g se disolvió en etanol (72,0 ml) y se agregó lentamente una solución acuosa de NaOH 2M (72,0 ml) a  $0^\circ\text{C}$  (baño de hielo). La mezcla se calentó, agitándose utilizando un baño de aceite a  $60^\circ\text{C}$  durante 1 h. El recipiente de reacción se volvió a llevar a temperatura ambiente y el etanol se evaporó bajo presión reducida. Se agregaron NaOH 2M (30 ml) y agua (30 ml) a la solución y la solución se lavó con éter terc-butil metílico (100 ml). La capa acuosa se lavó con éter terc-butil metílico (100 ml) una vez más. La capa acuosa se acidificó cuidadosamente con solución acuosa HCl 2M (150 ml), y la mezcla se extrajo dos veces con heptano (150 ml). Las capas de heptano combinadas se lavaron con agua (100 ml) y posteriormente salmuera saturada (100 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y concentraron bajo presión reducida para proporcionar ácido 8-metilnonanoico (15,9 g, rendimiento bruto 96,6%) como un producto en bruto de un aceite amarillo claro. Como resultado del análisis GCMS, contenía impurezas no identificadas estructuralmente A (0,01%), B (0,03%), C (0,04%) y D (0,07%) y la pureza del ácido 8-metilnonanoico fue de 99,6%.

45  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,862 (d, 6H,  $J=6,64\text{Hz}$ ), 1,14-1,17 (m, 2H), 1,26-1,35 (m, 6H), 1,48-1,65 (m, 3H), 2,35 (t, 2H,  $J=7,52\text{Hz}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 22,95, 25,04, 27,55, 28,12, 29,47, 29,88, 34,51, 39,31, 181,0.

GC-MS: M=172.

[Ejemplo 2] Purificación de ácido 8-metilnonanoico mediante formación de su sal ciclohexilamina (Ejemplo de purificación mediante cristal de sal del ácido graso)

5 A partir del ácido 8-metilnonanoico, producto en bruto que se obtuvo en el Ejemplo 1, se disolvió 8,00 g en heptano (30 ml). Se agregó lentamente por goteo ciclohexilamina (6,91 ml, 60,4 mmol) a 0°C (baño de hielo) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 min. La mezcla de reacción se filtró para proporcionar sal ciclohexilamina del ácido 8-metilnonanoico (15,7 g).

10  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,81-0,85 (m, 6H), 1,11-1,20 (m, 3H), 1,241,35 (m, 10H), 1,46-1,68 (m, 4H), 1,73-1,81 (m, 2H), 1,96-2,02 (m, 2H), 2,15-2,19 (t, 2H), 2,77-2,88 (m, 1H).

Punto de fusión: 70,1-70,6°C

15 Se agregaron una solución al 10% de ácido cítrico acuoso (50 ml) y heptano (50 ml) a la sal (15,6 g del mismo) para permitir la partición. La capa acuosa se extrajo con heptano (50 ml) y las capas de heptano combinadas se lavaron con solución al 10% de ácido cítrico acuoso (50 ml), agua (50 ml) y salmuera saturada (50 ml). La capa de heptano se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar ácido 8-metilnonanoico (7,69 g) como un aceite transparente incoloro.

20 Se destilaron 7,18 g del mismo bajo presión reducida (1,1 mmHg, 103°C) para proporcionar producto destilado de ácido 8-metilnonanoico (6,80 g, rendimiento a partir de producto bruto de ácido 8-metilnonanoico, 91,0%). Como resultado del análisis GCMS, las impurezas mencionadas anteriormente A, B, C y D resultaron por debajo del límite de detección, y la pureza del ácido 8-metilnonanoico fue de un 99,7%.

[Ejemplo 3] Resolución de trans de y cis de ácido 8-metil-6-nonanoico mediante sal de -cis-2-aminociclohexanol de este (Ejemplo de procedimiento de purificación mediante formación de cristal de sal del ácido graso)

25 Se disolvió ácido 8-metil-6-nonanoico (Relación isómero trans:cis=88:12, 800 mg, 4,70 mmol), que se obtuvo mediante un procedimiento conocido (J. Org. Chem. 1989, 54, 3477-3478), en cloroformo (10 ml), y se agregó por goteo una solución de cis-2-aminociclohexanol (460 mg, 4,00 mmol) en cloroformo (5 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida, el residuo se disolvió nuevamente en cloroformo (4 ml), y hexano (12 ml) se agregó por goteo. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días, y los cristales precipitados se recogieron por filtración. Se agregó hexano (10 ml) a los cristales obtenidos y la mezcla se lavó tres veces con solución al 10% de ácido cítrico acuoso (8 ml) y una vez con salmuera saturada (10 ml), y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró el sulfato de magnesio y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar ácido 8-metil-6-nonanoico (relación isómero trans:cis=29:1, 408 mg, 2,40 mmol).

35 El ácido 8-metil-6-nonanoico obtenido (relación isómero trans:cis=29:1, 408 mg, 2,40 mmol) se disolvió nuevamente en cloroformo (10 ml) y se agregó por goteo una solución de cis-2-aminociclohexanol (249 mg, 2,16 mmol) en cloroformo (5 ml) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida, el residuo se disolvió nuevamente en cloroformo (3 ml) y se agregó hexano (12 ml) por goteo. La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente, y los cristales precipitados se recogieron por filtración. Se agregó hexano (15 ml) al cristal obtenido y la mezcla se lavó tres veces con solución al 10% de ácido cítrico acuoso (10 ml) y una vez con salmuera saturada (10 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró el sulfato de magnesio y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar trans-ácido 8-metil-6-nonanoico (250 mg, 1,47 mmol, de pureza 98,8%, Rendimiento 35,1%).

40  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,96 (d, 6H, J=6,8Hz), 1,38-1,46 (m, 2H), 1,60-1,70 (m, 2H), 1,95-2,05 (m, 2H), 2,18-2,38 (m, 1H), 2,35 (t, 2H, J=7,4Hz), 5,28-5,42 (m, 2H).

[Ejemplo 4] Síntesis de ácido 8-metilnonanoico (Procedimiento para sintetizar a alta pureza utilizando CuBr como catalizador)

45 Un recipiente de tres bocas de 500 ml equipado con un termómetro se sustituyó con argón y se agregó CuBr (481 mg, 3,36 mmol). Se agregó NMP (43,1 ml, 449 mmol) y se disolvió a temperatura ambiente, y el recipiente de reacción se enfrió a -20°C. Se agregó THF (10 ml) y 6-bromo-n-hexanoato de etilo (25,0 g, 112 mmol) se agregó por

goteo (temperatura interna  $-8^{\circ}\text{C}$ ). Después de agitarse durante 10 min, una solución (160 ml) de bromuro de isobutilmagnesio en THF, que se preparó aparte, se agregó lentamente por goteo durante 60 min.

90 min después de haberse completado la adición por goteo, se agregó lentamente por goteo solución acuosa al 10% de cloruro de amonio (120 ml) lo que inactivó la reacción, y la mezcla se extrajo con n-hexano (120 ml). La capa de n-hexano se lavó con solución acuosa al 10% de cloruro de amonio (100 ml), agua (100 ml) y salmuera saturada (50 ml), se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró, y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar un producto en bruto (24,2 g de 8-metilnonanoato de etilo) como un aceite amarillo claro. La pureza medida mediante GC-MS resultó de 97,5%.

A partir del 8-metilnonanoato de etilo obtenido, se colocaron 22,2 g en un recipiente berenjeniforme de 500 ml, y se disolvió en etanol (77 ml). Se agregó por goteo un solución acuosa 2M de NaOH (77 ml, 154 mmol) a temperatura ambiente durante 5 min. Después de haberse completado la adición por goteo, la mezcla se calentó, agitándose en un baño de aceite a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 90 min. Después de la confirmación de la desaparición del material de partida mediante TLC, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente.

Se evaporó el etanol bajo presión reducida. Se agregó agua (40 ml) a la solución y la solución se lavó con éter t-Butil metílico (80 ml). La capa acuosa se lavó adicionalmente con éter t-Butil metílico (80 ml). Posteriormente, la capa acuosa se acidificó con solución 2M de HCl acuoso (120 ml), y la mezcla se extrajo con n-hexano (80 ml). La capa n-hexano se lavó con agua (80 ml), agua (40 ml) y salmuera saturada (40 ml), se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró, y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar 17,3 g of ácido 8-metilnonanoico como un aceite amarillo claro. 15,3 g del mismo se destiló bajo presión reducida para proporcionar 12,7 g de ácido 8-metilnonanoico como un aceite amarillo claro. La pureza medida mediante GC-MS resultó no menor de 99,9%. Rendimiento total a partir de 6-bromo-n-hexanoato de etilo, 81%.

#### [Ejemplo 5] Síntesis de dihidrocapsiato - 1

Se midieron ácido 8-metilnonanoico (1,00 g, 5,80 mmol), alcohol vanilílico (851 mg, 5,52 mmol) y Novozym 435 (50 mg) y se colocaron en un matraz (25 ml). La mezcla en el recipiente destapado se calentó, agitándose en un baño de aceite a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 20 h. Después de 2 a 3 h de agitación con calentamiento, se observó prendimiento de agua en la pared de la parte superior del recipiente. La mezcla de reacción se volvió a llevar a temperatura ambiente, se agregó hexano (25 ml), y Se filtraron Novozym 435 y una pequeña cantidad del alcohol vanilílico precipitado. Se agregó hexano (25 ml) al filtrado y la mezcla se lavó con una solución de ácido cítrico acuoso al 5% (25 ml) y salmuera saturada (25 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró el sulfato de magnesio y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar una mezcla (1,66 g) de dihidrocapsiato y ácido 8-metilnonanoico como un aceite incoloro. Como resultado del análisis, el rendimiento de dihidrocapsiato fue 89,7%, y la pureza resultó en un 99,5% en área mediante HPLC. La mezcla contenía 8,0% en peso de ácido 8-metilnonanoico con respecto a dihidrocapsiato.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,86 (d, 6H,  $J=6,60\text{Hz}$ ), 1,12-1,37 (m, 8H), 1,46-1,64 (m, 3H), 2,32 (t, 2H,  $J=7,56\text{Hz}$ ), 3,89 (s, 3H), 5,02 (s, 2H), 5,63 (br, 1H), 6,83-6,90 (m, 3H)

#### [Ejemplo 6] Síntesis de capsiato

Se midieron trans-ácido 8-metil-6-nonanoico (1,00 g, 5,87 mmol), alcohol vanilílico (1,085 g, 7,04 mmol) y Novozym 435 (100 mg) y se colocaron en un matraz (25 ml). La mezcla en el recipiente destapado se calentó, agitándose en un baño de aceite a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 16 h. Después de 2 a 3 h de agitación con calentamiento, se observó prendimiento de agua en la pared de la parte superior del recipiente. La mezcla de reacción se volvió a llevar a temperatura ambiente, se agregó hexano (25 ml) y Novozym 435 y se filtró el alcohol vanilílico precipitado. Se agregó hexano (25 ml) al filtrado y la mezcla se lavó con solución de ácido cítrico acuoso al 5% (25 ml) y salmuera saturada (25 ml), y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró el sulfato de magnesio y el filtrado se concentró bajo presión reducida. Debido a que se confirmó la producción de otras impurezas polares aparte de alcohol vanilílico mediante TLC, el residuo se disolvió en 50 mL de hexano, se pasó a través de una columna corta cargada con 1,5 g de gel de sílice y el gel de sílice se lavó suficientemente con una mezcla solvente de hexano y acetato de etilo (relación volumétrica 10:1). La impureza mencionada anteriormente no se detectó en el eluyente mediante TLC. El eluyente se concentró bajo presión reducida para proporcionar capsiato (1,56 g, Rendimiento 86,6%) como un aceite incoloro. Este capsiato contenía rastros de ácido trans-8-metil-6-nonanoico.

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,95 (d, 6H, J=6,74Hz) , 1,33-1,40 (m, 2H), 1,59-1,67 (m, 2H), 1,94-1,99 (m, 2H), 2,18-2,23 (m, 1H), 2,33 (t, 2H, J=7,52Hz), 3,89 (s, 3H), 5,02 (s, 2H), 5,26-5,39 (m, 2H), 5,63 (br, 1H), 6,83-6,90 (m, 3H)

[Ejemplo de referencia 7] Síntesis de decanoato vanilílico - 1

5 Se midieron ácido decanoico (1,00 g, 5,80 mmol), alcohol vanilílico (880 mg, 5,71 mmol) y Novozym 435 (25 mg) y se colocaron en un matraz (25 ml) y se agregó hexano (0,5 ml). La mezcla en el recipiente destapado se calentó, agitándose en un baño de aceite a 50 °C durante 48 h. Después de 2 a 3 h de agitación con calentamiento, se observó prendimiento de agua en la pared de la parte superior del recipiente. El recipiente se volvió a llevar a temperatura ambiente, se agregó hexano (25 ml) a la mezcla de reacción, se filtraron Novozym 435 y una pequeña cantidad del alcohol vanilílico precipitado. Se agregó hexano (25 ml) al filtrado, y la mezcla se lavó con solución de ácido cítrico acuoso al 5% (25 ml) y salmuera saturada (25 ml) y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró el sulfato de magnesio, y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar una mezcla (1,69 g) de decanoato vanilílico y ácido decanoico como un aceite incoloro. Como resultado del análisis, el rendimiento de decanoato vanilílico fue de un 93,1%. La mezcla contenía 2,9% en peso de ácido decanoico con respecto a decanoato vanilílico.

15 <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,87 (t, 3H, J=7,1Hz), 1,18-1,30 (m, 12H), 1,55-1,65 (m, 2H), 2,33 (t, 2H, J=7,7Hz), 3,90 (s, 3H), 5,03 (s, 2H), 5,64 (br, 1H), 6,80-6,90 (m, 3H)

[Ejemplo 8] Síntesis de decanoato vanilílico - 2 (se repitió el uso de encima)

20 Se midieron ácido decanoico (2,00 g, 11,61 mmol), alcohol vanilílico (1,74 g, 11,27 mmol) y Novozym 435 (100 mg) y se colocaron en un matraz (25 ml). La mezcla en el recipiente destapado se calentó, agitándose en un baño de aceite a 50°C durante 20 h. Después de 2 a 3 h de agitación con calentamiento, se observó prendimiento de agua en la pared de la parte superior del recipiente. La mezcla de reacción se volvió a llevar a temperatura ambiente, se agregó hexano (50 ml), y Se filtraron Novozym 435 y una pequeña cantidad del alcohol vanilílico precipitado. El filtrado se lavó con solución de ácido cítrico acuoso al 5% (25 ml) y salmuera saturada (25 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró el sulfato de magnesio y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar una mezcla (3,41 g) de decanoato vanilílico y ácido decanoico como un aceite incoloro. Como resultado del análisis, el rendimiento de decanoato vanilílico fue de un 94,1%. La mezcla contenía 6,0% en peso de ácido decanoico con respecto a decanoato vanilílico.

30 La operación mencionada anteriormente se repitió utilizando, como un catalizador, una mezcla recuperada mediante la operación mencionada anteriormente, que contenía Novozym 435 y una pequeña cantidad de alcohol vanilílico. Una mezcla (3,42 g) de decanoato vanilílico y ácido decanoico se obtuvo como un aceite incoloro. Como resultado del análisis, el rendimiento de decanoato vanilílico fue de un 95,5%. La mezcla contenía 3,2% en peso de ácido decanoico con respecto a decanoato vanilílico.

35 La operación mencionada anteriormente se repitió utilizando como catalizador una mezcla recuperada mediante la operación mencionada anteriormente, que contenía Novozym 435 y una pequeña cantidad de alcohol vanilílico. Una mezcla (3,47 g) de decanoato vanilílico y ácido decanoico se obtuvo como un aceite incoloro. Como resultado del análisis, el rendimiento de decanoato vanilílico fue de un 94,8%. La mezcla contenía 5,1% en peso de ácido decanoico con respecto al decanoato vanilílico.

40 La operación mencionada anteriormente se repitió utilizando, como un catalizador, una mezcla recuperada mediante la operación mencionada anteriormente, que contenía Novozym 435 y una pequeña cantidad de alcohol vanilílico. Una mezcla (3,46 g) de decanoato vanilílico y ácido decanoico se obtuvo como un aceite incoloro. Como resultado del análisis, el rendimiento de decanoato vanilílico fue de un 95,4%. La mezcla contenía 4,1% en peso de ácido decanoico con respecto a decanoato vanilílico.

[Ejemplo 9] Síntesis de dihidrocapsiato - 2

45 Se midieron ácido 8-metilnonanoico (1,50 g, 8,70 mmol), alcohol vanilílico (1,34 g, 8,70 mmol) y lipasa PS "Amano" (375 mg) y se colocaron en un matraz (25 ml). La mezcla en el recipiente destapado se calentó, agitándose en un baño de aceite a 55°C durante 45 h. Después de 2 a 3 h de agitación con calentamiento, se observó prendimiento de agua en la pared de la parte superior del recipiente. El recipiente se volvió a llevar a temperatura ambiente, se agregó heptano (10 ml) a la mezcla de reacción y la mezcla se agitó durante 10 min. Se filtró lipasa PS "Amano" y una pequeña cantidad del alcohol vanilílico precipitado. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el aceite que se obtuvo (2,48 g) se analizó mediante HPLC para encontrar que dihidrocapsiato estaba contenido en un 94,0% en

50

área. La mezcla se repartió con heptano (15 ml) y solución de ácido cítrico acuoso al 10% (15 ml) y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con heptano (15 ml). Las capas de heptano combinadas se lavaron con salmuera saturada (15 ml) y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró el sulfato de magnesio, y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar una mezcla (2,45 g) de dihidrocapsiato y ácido 8-metilnonanoico como un aceite incoloro. Como resultado del análisis, el rendimiento de dihidrocapsiato fue del 80,9%, y la pureza resultó en un 97,4% en área mediante HPLC. La mezcla contenía 12,6% en peso de ácido 8-metilnonanoico con respecto a dihidrocapsiato.

[Ejemplo 10] Síntesis de dihidrocapsiato - 3

Se midieron ácido 8-metilnonanoico (1,50 g, 8,70 mmol), alcohol vanillílico (1,34 g, 8,70 mmol) y lipasa PS-C "Amano" I (enzima inmovilizada en cerámica: 375 mg) y se colocaron en un matraz (25 ml). La mezcla en el recipiente destapado se calentó, agitándose en un baño de aceite a 55°C durante 45 h. Después de 2 a 3 h de agitación con calentamiento, se observó prendimiento de agua en la pared de la parte superior del recipiente. El recipiente se volvió a llevar a temperatura ambiente, se agregó heptano (10 ml) a la mezcla de reacción y la mezcla se agitó durante 10 min. La enzima se inmovilizó y se filtró una pequeña cantidad del alcohol vanillílico precipitado. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el aceite que se obtuvo (2,68 g) se analizó mediante HPLC para encontrar que dihidrocapsiato estaba contenido en un 92,9% en área. La mezcla se repartió con heptano (15 ml) y solución de ácido cítrico acuoso al 10% (15 ml) y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con heptano (15 ml). Las capas de heptano combinadas se lavaron con salmuera saturada (15 ml) y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró el sulfato de magnesio y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar una mezcla (2,61 g) de dihidrocapsiato y ácido 8-metilnonanoico como un aceite incoloro. Como resultado del análisis, el rendimiento de dihidrocapsiato fue del 95,5%, y la pureza resultó en un 97,1% en área mediante HPLC. La mezcla contenía 1,97% en peso de ácido 8-metilnonanoico con respecto a dihidrocapsiato.

[Ejemplo 11] Síntesis de dihidrocapsiato-4

Se midieron ácido 8-metilnonanoico (1,65 g, 9,59 mmol), alcohol vanillílico (1,34 g, 8,70 mmol) y lipasa PS-C "Amano" I (enzima inmovilizada en cerámica: 335 mg) y se colocaron en un matraz (25 ml). La mezcla en el recipiente destapado se calentó, agitándose en un baño de aceite a 45°C durante 37,5 h. Después de 2 a 3 h de agitación con calentamiento, se observó prendimiento de agua en la pared de la parte superior del recipiente. El recipiente se volvió a llevar a temperatura ambiente, se agregó heptano (10 ml) a la mezcla de reacción y la mezcla se agitó durante 10 min. La enzima se inmovilizó y se filtró una pequeña cantidad del alcohol vanillílico precipitado. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el aceite que se obtuvo se analizó mediante HPLC para encontrar que dihidrocapsiato estaba contenido en un 95,7% en área. La mezcla se repartió con heptano (20 ml) y solución de ácido cítrico acuoso al 10% (20 ml) y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con heptano (20 ml). Las capas de heptano combinadas se lavaron con salmuera saturada (15 ml) y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró el sulfato de magnesio, y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar una mezcla (2,50 g) de dihidrocapsiato y ácido 8-metilnonanoico como un aceite incoloro. Como resultado del análisis, el rendimiento de dihidrocapsiato fue del 73,1%, y la pureza resultó en un 99,3% en área mediante HPLC. La mezcla contenía 27,4% en peso de ácido 8-metilnonanoico con respecto a dihidrocapsiato.

[Ejemplo de referencia 12] Síntesis de dihidrocapsiato - 5

Se midieron ácido 8-metilnonanoico (1-,54 g, 8,95 mmol) y alcohol vanillílico (1,34 g, 8,70 mmol), se colocaron en un matraz (25 ml) y se disolvió en heptano (0,5 ml). Se agregó Lipasa PS-C "Amano" I (enzima inmovilizada en cerámica: 335 mg) y la mezcla se calentó, agitándose en un baño de aceite a 55°C durante 13,5 h. Después de 2 a 3 h de agitación con calentamiento, se observó prendimiento de agua en la pared de la parte superior del recipiente. El recipiente se volvió a llevar a temperatura ambiente, se agregó heptano (5 ml) a la mezcla de reacción y la mezcla se agitó durante 10 min. La enzima se inmovilizó y se filtró una pequeña cantidad del alcohol vanillílico precipitado. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el aceite que se obtuvo (2,42 g) se analizó mediante HPLC para encontrar que dihidrocapsiato estaba contenido en un 97,2% en área. La mezcla se repartió con heptano (15 ml) y solución de ácido cítrico acuoso al 10% (15 ml) y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con heptano (15 ml). Las capas de heptano combinadas se lavaron con agua (10 ml) y salmuera saturada (10 ml) y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró el sulfato de magnesio, y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar una mezcla (2,42 g) de dihidrocapsiato y ácido 8-metilnonanoico como un aceite incoloro. Como resultado del análisis, el rendimiento de dihidrocapsiato fue del 72,3%, y la pureza resultó en un 99,6% en área mediante HPLC. La mezcla contenía 24,8% en peso de ácido 8-metilnonanoico con respecto a dihidrocapsiato.

## [Ejemplo 13] Síntesis de dihidrocapsiato - 6

Se midieron ácido 8-metilnonanoico (1,54 g, 8,95 mmol), alcohol vanilílico (1,34 g, 8,70 mmol) y lipasa PS-C "Amano" I (enzima inmovilizada en cerámica: 335 mg) y se colocaron en un matraz (25 ml). La mezcla en el recipiente destapado se calentó, agitándose en un baño de aceite a 55°C durante 13,5 h. Después de 2 a 3 h de agitación con calentamiento, se observó prendimiento de agua en la pared de la parte superior del recipiente. El recipiente se volvió a llevar a temperatura ambiente, se agregó heptano (5 ml) a la mezcla de reacción y la mezcla se agitó durante 15 min. La enzima se inmovilizó y se filtró una pequeña cantidad del alcohol vanilílico precipitado. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el aceite que se obtuvo (2,73 g) se analizó mediante HPLC para encontrar que dihidrocapsiato estaba contenido en un 96,3% en área. La mezcla se repartió con heptano (15 ml) y solución de ácido cítrico acuoso al 10% (15 ml) y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con heptano (15 ml). Las capas de heptano combinadas se lavaron con agua (10 ml) y salmuera saturada (10 ml) y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró el sulfato de magnesio y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar una mezcla (2,67 g) de dihidrocapsiato y ácido 8-metilnonanoico como un aceite incoloro. Como resultado del análisis, el rendimiento de dihidrocapsiato fue del 95,5%, y la pureza resultó en un 99,3% en área mediante HPLC. La mezcla contenía un 4,18% en peso de ácido 8-metilnonanoico con respecto a dihidrocapsiato.

## [Ejemplo 14] Síntesis de decanoato vanilílico - 3

Se midieron ácido decanoico (25,0 g, 145 mmol), alcohol vanilílico (21,7 g, 141 mmol) y Novozym 435 (723 mg) y se colocaron en un matraz (25 ml). La mezcla en el recipiente destapado se calentó, agitándose en un baño de aceite a 50°C durante 48 h. Después de 2 a 3 h de agitación con calentamiento, se observó prendimiento de agua en la pared de la parte superior del recipiente. El recipiente se volvió a llevar a temperatura ambiente, hexano (100 ml) se agregó a la mezcla de reacción y la mezcla se agitó durante 1 h. La enzima se inmovilizó y se filtró una pequeña cantidad del alcohol vanilílico precipitado. Se agregó hexano (100 ml) y solución de ácido cítrico acuoso al 10% (200 ml) al filtrado para permitir la partición. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con hexano (150 ml), las capas combinadas de hexano se lavaron con solución de ácido cítrico acuoso al 10% (100 ml), agua (100 ml) y salmuera saturada (100 ml). La capa de hexano se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró el sulfato de magnesio, y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar la mezcla (43,7 g) de decanoato vanilílico y ácido decanoico. Como resultado del análisis, el rendimiento de decanoato vanilílico fue de un 97,0% y la pureza resultó en un 98,6% en área mediante HPLC. La mezcla contenía un 3,94% en peso de ácido decanoico con respecto a decanoato vanilílico.

## [Ejemplo 15] Síntesis de dihidrocapsiato - 7

Se midieron ácido 8-metilnonanoico (1,54 g, 8,95 mmol), alcohol vanilílico (1,34 g, 8,70 mmol) y Novozym 435 (67,0 mg) y se colocaron en un matraz (25 ml). La mezcla en el recipiente destapado se calentó, agitándose en un baño de aceite a 55°C durante 16 h. Después de 2 a 3 h de agitación con calentamiento, se observó prendimiento de agua en la pared de la parte superior del recipiente. El recipiente se volvió a llevar a temperatura ambiente, se agregó heptano (5 ml) a la mezcla de reacción y la mezcla se agitó durante 10 min. Se filtraron Novozym 435 y una pequeña cantidad del alcohol vanilílico precipitado. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el aceite incoloro que se obtuvo (2,74 g) se analizó mediante HPLC para encontrar que dihidrocapsiato estaba contenido en un 96,0% en área. La mezcla se repartió con heptano (15 ml) y solución de ácido cítrico acuoso al 10% (15 ml) y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con heptano (15 ml). Las capas de heptano combinadas se lavaron con agua (10 ml) y salmuera saturada (10 ml) y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró el sulfato de magnesio y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar una mezcla (2,65 g) de dihidrocapsiato y ácido 8-metilnonanoico como un aceite incoloro. Como resultado del análisis, el rendimiento de dihidrocapsiato fue del 97,6%, y la pureza resultó en un 99,8% en área mediante HPLC. La mezcla contenía un 1,12% en peso de ácido 8-metilnonanoico con respecto a dihidrocapsiato.

## [Ejemplo 16] Síntesis de dihidrocapsiato - 8

Se midieron ácido 8-metilnonanoico (1,54 g, 8,95 mmol), alcohol vanilílico (1,34 g, 8,70 mmol) y Novozym 435 (8,90 mg) y se colocaron en un matraz: (25 ml). La mezcla en el recipiente destapado se calentó, agitándose en un baño de aceite a 55°C durante 45 h. Después de 2 a 3 h de agitación con calentamiento, se observó prendimiento de agua en la pared de la parte superior del recipiente. El recipiente se volvió a llevar a temperatura ambiente, se agregó heptano (10 ml) a la mezcla de reacción y la mezcla se agitó durante 30 min. Se filtraron Novozym 435 y una pequeña cantidad del alcohol vanilílico precipitado. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el aceite que se obtuvo incoloro (2,67 g) se analizó mediante HPLC para encontrar que dihidrocapsiato estaba contenido en un

97,2% en área. La mezcla se repartió con heptano (15 ml) y solución de ácido cítrico acuoso al 10% (15 ml) y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con heptano (15 ml). Las capas de heptano combinadas se lavaron con agua (15 ml) y salmuera saturada (15 ml) y se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró el sulfato de magnesio, y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar una mezcla (2,67 g) de dihidrocapsiato y ácido 8-metilnonanoico como un aceite incoloro. Como resultado del análisis, el rendimiento de dihidrocapsiato fue del 95,9%, y la pureza resultó en un 99,4% en área mediante HPLC. La mezcla contenía un 3,86% en peso de ácido 8-metilnonanoico con respecto a dihidrocapsiato.

[Ejemplo 17] Síntesis de dihidrocapsiato - 9

Se colocaron ácido 8-metilnonanoico (310 g, 1,80 mol) y Novozym 435 (9,0 g) en a un recipiente de 1L de cuatro bocas. La mezcla se calentó, agitándose en un baño de aceite a 50°C. Posteriormente, se agregó alcohol vanilílico (90 g, 0,58 mol) y la mezcla se agitó con calentamiento a la misma temperatura bajo presión reducida (74 mmHg) con una bomba enzima apretando el sifón. Se agregó alcohol vanilílico (90 g, 0,58 mol) 1 h después y 2 h después cada vez y la mezcla se hizo reaccionar con reacción de calentamiento de presión reducida. La presión reducida se detuvo luego de 45 h a partir del comienzo de la reacción y la agitación con calentamiento se detuvo. En ese momento, el sifón contenía agua. Después de confirmar que la mezcla de reacción había retornado a temperatura ambiente, se agregó por goteo n-hexano (465 ml) durante 1 h, y la mezcla se agitó a presión atmosférica y temperatura ambiente. La agitación se detuvo 20 h después y la mezcla se filtró mientras se lavaba con n-hexano (155 ml). Se agregó solución de ácido cítrico acuoso al 10% (775 ml) al filtrado para permitir la partición. La capa n-hexano se lavó con agua (775 ml), agua (310 ml) y salmuera al 15% (310 ml) y se secó sobre sulfato de magnesio anhidro. Se filtró el sulfato de magnesio y el filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar una mezcla (532 g) de dihidrocapsiato y ácido 8-metilnonanoico como un aceite incoloro. Como resultado del análisis, el rendimiento de dihidrocapsiato fue del 96% y la pureza resultó en un 99,2% en área mediante HPLC. La mezcla contenía un 3,1% en peso de ácido 8-metilnonanoico con respecto a dihidrocapsiato.

[Ejemplo de referencia 18] Síntesis de decanoato vanilílico - 4

Se midieron ácido decanoico (10,0 g, 58.1 mmol), alcohol vanilílico (8,05 g, 52,2 mmol) y lipasa PS-C "Amano" I (enzima inmovilizada en cerámica: 1,44 g) y se colocaron en un matraz (500 ml) y se agregó tolueno (200 ml). Bajo una atmósfera de argón, la mezcla se calentó, agitándose en un baño de aceite a 40°C durante 2 h. Esta mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y se promovió la deshidratación mediante efecto azeotrópico. Se agregó adicionalmente tolueno (150 ml) al concentrado y la mezcla se calentó, agitándose en un baño de aceite a 40°C durante 20 h. La mezcla de reacción se concentró nuevamente bajo presión reducida y se agregó heptano (200 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2,5 h. y se filtraron la enzima inmovilizada y el alcohol vanilílico precipitado. El filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar una mezcla (15,8 g) de decanoato vanilílico y ácido decanoico. Como resultado del análisis, el rendimiento de decanoato vanilílico fue de un 98% y la pureza resultó en un 97,9% en área mediante HPLC. La mezcla contenía un 8,6% en peso de ácido decanoico con respecto a decanoato vanilílico.

[Ejemplo 19] Síntesis de octanoato vanilílico

De la misma manera que el Ejemplo 5 y utilizando ácido octanoico disponible comercialmente, octanoato vanilílico se sintetizó con un rendimiento de 61% (que contenía 29,9% en peso de ácido octanoico).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,88 (d, 3H, J=7,10Hz), 1,20-1,35 (m, 8H), 1,60-1,70 (m, 2H), 2,35 (t, 2H, J=7,40Hz), 3,90 (s, 3H), 5,03 (s, 2H), 6,83-6,90 (m, 3H).

[Ejemplo 20] Síntesis de undecanoato vanilílico

De la misma manera que el Ejemplo 5 y utilizando ácido undecanoico disponible comercialmente, se sintetizó undecanoato vanilílico con un rendimiento del 98% (que contenía un 3,3% en peso de ácido undecanoico).

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ): 0,88 (d, 3H, J=6,76Hz) , 1,20-1,35 (m, 14H), 1,58-1,68 (m, 2H), 2,35 (t, 2H, J=7,68Hz), 3,90 (s, 3H), 5,03 (s, 2H), 6,83-6,90 (m, 3H).

[Ejemplo 21] Síntesis de 9-metildecanoato vanilílico

De la misma manera que el Ejemplo 1, se sintetizó ácido 9-metildecanoico a partir de bromuro de isopentilo y 6-bromohexanoato de etilo con un rendimiento del 78% (se purificó mediante destilación bajo presión reducida) y,

utilizando este compuesto, se sintetizó 9-metildecanoato vanilílico con un rendimiento del 91% (que contenía un 3,1% en peso de 9-metilácido decanoico) de la misma manera que el Ejemplo 5.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,86 (d, 6H,  $J=6,64\text{Hz}$ ) , 1,12-1,35 (m, 10H), 1,45-1,55 (m, 1H), 1,50-1,60 (m, 2H), 2,34 (t, 2H,  $J=7,44\text{Hz}$ ), 3,89 (s, 3H) , 5,03 (s, 2H) , 5,60 (brs, 1H), 6,83-6,90 (m, 3H).

5 [Ejemplo 22] Síntesis de 10-metilundecanoato vanilílico

De la misma manera que el Ejemplo 1, se sintetizó ácido 10-metilundecanoico a partir de bromuro de isopentilo y 7-bromoheptanoato de etilo con un rendimiento del 81% (se purificó mediante destilación bajo presión reducida) y, utilizando este compuesto, 10-metilundecanoato vanilílico se sintetizó con un rendimiento de 98% (que contenía 8,5% en peso de 10-metilácido decanoico) de la misma manera que el Ejemplo 5.

10  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,86 (d, 6H,  $J=6,64\text{Hz}$ ) , 1,10-1,40 (n, 12H), 1,50-1,60 (m, 1H), 1,60-1,70 (m, 2H) , 2,33 (t, 2H,  $J=7,68\text{Hz}$ ), 3,90 (s, 3H) , 5,03 (s, 2H) , 5,63 (s, 1H), 6,83-6,90 (n, 3H).

[Ejemplo 23] Síntesis de 6-metiloctanoato vanilílico

De la misma manera que el Ejemplo 1, se sintetizó ácido 6-metiloctanoico a partir de 1-cloro-2-metilbutano y 4-bromobutanoato de etilo con un rendimiento del 83% (se purificó mediante destilación bajo presión reducida) y, utilizando este compuesto, se sintetizó 6-metiloctanoato vanilílico con un rendimiento del 80% (que contenía un 6,7% en peso de 6-metilácido octanoico) de la misma manera que el Ejemplo 5.

15  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,80-0,9-0 (m, 6H), 1,05-1,19 (m, 2H), 1,221,40 (n, 5H), 1,60-1,70 (n, 2H), 2,34 (t, 2H,  $J=7,56\text{Hz}$ ), 3,89 (s, 3H), 5,03 (s, 2H), 5,60 (brs, 1H), 6,85-6,91 (n, 3H).

[Ejemplo 24] Síntesis de 7-metilnonanoato vanilílico

20 De la misma manera que el Ejemplo 1, se sintetizó ácido 7-metilnonanoico a partir de 1-cloro-2-metilbutano y 5-bromopentanoato de etilo con un rendimiento del 90% (se purificó mediante destilación bajo presión reducida) y, utilizando este compuesto, 7-metilnonanoato vanilílico se sintetizó con un rendimiento del 93% (que contenía un 6,8% en peso de 7-metilácido decanoico) de la misma manera que el Ejemplo 5.

25  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,80-0,90 (m, 6H) , 1,05-1,20 (m, 2H) , 1,201,38 (m, 7H), 1,60-1,70 (m, 2H), 2,34 (t, 2H,  $J=7,72\text{Hz}$ ), 3,90 (s, 3H) , 5,03 (s, 2H) , 5,60 (brs, 1H), 6,85-6,91 (m, 3H).

[Ejemplo 25] Síntesis de 8-metildecanoato vanilílico

30 De la misma manera que el Ejemplo 1, se sintetizó ácido 8-metildecanoico a partir de 1-cloro-2-metilbutano y 6-bromohexanoato de etilo con un rendimiento del 87% (se purificó mediante destilación bajo presión reducida) y, utilizando este compuesto, 8-metildecanoato vanilílico se sintetizó con un rendimiento del 88% (que contenía un 96% en peso de ácido 8-metildecanoico) de la misma manera que el Ejemplo 5.

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ ): 0,80-0,90 (m, 6H) , 1,02-1,20 (m, 2H) , 1,201,40 (m, 9H) , 1,60-1,70 (m, 2H); 2,34 (t, 2H,  $J=7,72\text{Hz}$ ), 3,90 (s, 3H) , 5,03 (s, 2H), 5,60 (brs, 1H) , 6,85-6,91 (m, 3H).

[Ejemplo de referencia 1] Estabilidad de capsinoide en ausencia de ácido graso

35 Decanoato vanilílico se sintetizó por separado de alcohol vanilílico y ácido decanoico y se examinó la estabilidad. Se separó ácido decanoico mediante cromatografía en columna de gel de sílice, y el producto purificado se disolvió en acetonitrilo y se analizó mediante HPLC para encontrar un 95,6% en área. Cuando la muestra se analizó nuevamente 62 h después, la pureza había disminuido a un 82,0% en área y se confirmó que se había descompuesto el decanoato vanilílico.

[Ejemplo 26] Ejemplo de estabilización mediante coexistencia de ácido graso - 1

40 Se separó ácido decanoico mediante cromatografía en columna de gel de sílice y el producto purificado, decanoato vanilílico, se disolvió en acetonitrilo y se analizó mediante HPLC 9 h después para encontrar un 90,4% en área. A la solución de acetonitrilo del producto purificado, decanoato vanilílico, se agregó un 9,1% en peso de ácido decanoico y la mezcla se analizó mediante HPLC 19,5 h después para encontrar un 97,6% en área, lo que indicó un aumento de la pureza en comparación con la ausencia de la adición del ácido decanoico. De forma similar, se agregó un  
45 16,7%p., un 28,7%p. y un 44,8% en peso de ácido decanoico a decanoato vanilílico lo que resultó en purezas más

altas de un 98,1% en área, un 98,1 % en área y un 97,9 % en área en comparación con la ausencia de la adición del ácido decanoico.

[Ejemplo 27] Ejemplo de estabilización mediante coexistencia de ácido graso - 2

5 Se analizó capsiato que se obtuvo de la misma manera que el Ejemplo 5, que contenía un 3,2% en peso de ácido graso, mediante HPLC para encontrar una pureza de un 97,8% en área. Este capsiato se preservó en un solvente hexano a 5°C durante 30 días y se analizó mediante HPLC. Como resultado, la pureza resultó en un 97,6 % en área, lo que se mantuvo.

[Ejemplo 28] Ejemplo de estabilización mediante coexistencia de ácido graso - 3

10 Se analizó dihidrocapsiato obtenido de la misma manera que el Ejemplo 15, que contenía un 2,0% en peso de ácido graso, mediante HPLC para encontrar un 99,2% en área. Este dihidrocapsiato se preservó en un solvente hexano a 5°C durante 30 días y se analizó mediante HPLC. Como resultado, la pureza resultó en un 99,3 % en área, lo que se mantuvo.

### **Aplicabilidad industrial**

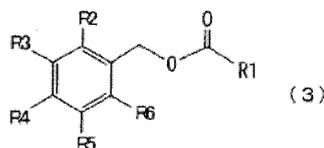
15 El procedimiento de la presente invención es útil para la producción industrial de capsinoide, debido a que capsinoide puede ser convenientemente sintetizado con un alto rendimiento en poco tiempo utilizando técnicas convencionales y una enzima económica. Asimismo, la coexistencia de un éster compuesto (capsinoide) y ácido graso habilitó el suministro estable y la preservación del capsinoide, que es convencionalmente inestable. Por lo tanto, la composición obtenida mediante el procedimiento de la presente invención que comprende un compuesto éster y ácido graso puede usarse como un aditivo de alimentos o un producto farmacéutico.

20

## REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de un compuesto éster representado por la fórmula (3):

5

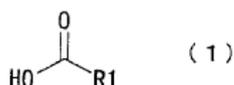


10

donde R1 es un grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono o un grupo alqueno sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono, y R2 a R6 son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo, un grupo alquilo que tiene de 1 a 25 átomos de carbono, un grupo alqueno que tiene de 2 a 25 átomos de carbono, un grupo alquilo que tiene de 2 a 25 átomos de carbono, un grupo alcoxi que tiene de 1 a 25 átomos de carbono, un grupo alqueno que tiene de 2 a 25 átomos de carbono o un grupo alqueno que tiene de 2 a 25 átomos de carbono, donde al menos uno de R2 a R6 es un grupo hidroxilo,

que comprende condensar un ácido graso representado por la fórmula (1):

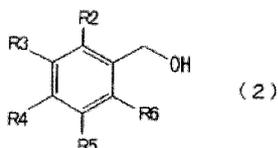
15



donde R1 es como se definió anteriormente,

y un hidroximetilfenol representado por la fórmula (2):

20



donde R2 a R6 son como se definieron anteriormente,

25

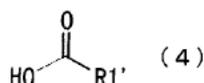
utilizando una enzima como catalizador sin disolvente.

2. El método de la reivindicación 1, donde el hidroximetilfenol representado por la fórmula (2) es alcohol vanilílico.

3. El método de la reivindicación 1 ó 2, donde el ácido graso representado por la fórmula (1) se usa en exceso del hidroximetilfenol representado por la fórmula (2) para contener ácido graso representado por la fórmula (1) en la mezcla de reacción después de la condensación.

30

4. El método de la reivindicación 1 ó 2, que comprende además agregar un ácido graso representado por la fórmula (4):



35

donde R1' es un grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono o un grupo alqueno sustituido o no sustituido que tiene de 5 a 25 átomos de carbono,

después de la condensación del ácido graso representado por la fórmula (1) y el hidroximetilfenol representado por la fórmula (2).

5. El método de la reivindicación 3, que comprende además, después de la condensación, una etapa de purificación para separar de manera preparativa el compuesto de éster obtenido representado por la fórmula (3) como una mezcla con el ácido graso representado por la fórmula (4).

5 6. El método de la reivindicación 4, que comprende además, después de la condensación, una etapa de purificación para separar de manera preparativa el compuesto de éster obtenido representado por la fórmula (3) como una mezcla con el ácido graso representado por la fórmula (4).

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde R1 es un grupo seleccionado del grupo que consiste en un grupo hexilo, un grupo 5-metilhexilo, un grupo trans-5-metil-3-hexenilo, un grupo heptilo, un grupo 6-metilheptilo, un grupo 5-metilheptilo, un grupo trans-6-metil-4-heptenilo, un grupo octilo, un grupo 7-metiloctilo, un grupo trans-7-metil-5-octenilo, un grupo nonilo, un grupo 8-metilnonilo, un grupo 7-metilnonilo, un grupo trans-8-metil-6-nonenilo, un grupo trans-8-metil-5-nonenilo, un grupo trans-7-metil-5-nonenilo, un grupo decilo, un grupo 9-metildecilo, un grupo trans-9-metil-7-decenilo, un grupo trans-9-metil-6-decenilo, un grupo undecilo y un grupo dodecilo.

8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la enzima es lipasa.

15 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la condensación se realiza a una temperatura de 15°C a 90°C.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el ácido graso representado por la fórmula (1) se obtiene por hidrólisis de un compuesto de éster representado por la fórmula (8):



donde R1 es como se definió anteriormente y Rc es un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo isopropilo, un grupo terc-butilo, un grupo alilo o un grupo bencilo,

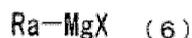
25 y someter el compuesto resultante a (A) una etapa de reacción del compuesto con una base para formar un cristal de sal y convertir el cristal en una forma libre y/o (8) una etapa de destilación.

11. El método de la reivindicación 10, donde el compuesto de éster representado por la fórmula (8) se obtiene convirtiendo un compuesto representado por la fórmula (5):



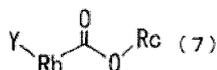
30 donde Ra es un grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 24 átomos de carbono o un grupo alqueno sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 24 átomos de carbono y X es un átomo de halógeno,

en un reactivo de Grignard representado por la fórmula (6):



35 donde Ra y X son como se definieron anteriormente,

y someter el reactivo de Grignard a una reacción de acoplamiento cruzado con un compuesto representado por la fórmula (7):

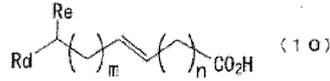


40 donde Rb es un grupo alquilo sustituido o no sustituido que tiene de 1 a 24 átomos de carbono o un grupo alqueno sustituido o no sustituido que tiene de 2 a 24 átomos de carbono (siempre que el total de átomos de carbono de Ra y

Rb sea de 5 a 25), R<sub>c</sub> es como se definió anteriormente e Y es un átomo de halógeno, un grupo metanosulfoniloxi, un grupo p-toluenosulfoniloxi, o un grupo trifluorometanosulfoniloxi.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el ácido graso representado por la fórmula (1) se obtiene por reacción de una mezcla de un ácido graso representado por la fórmula (10):

5



donde R<sub>d</sub> y R<sub>e</sub> son cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, m es 0 o 1, y n es un número entero de 1 a 5,

10 y un isómero cis de este con una base para formar sales de este, purificando, en base a la diferencia en la cristalinidad o solubilidad de las sales formadas, una sal de ácido graso representado por la fórmula (10) y convirtiendo después la sal en una forma libre de esta.