

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 338**

21 Número de solicitud: 201231864

51 Int. Cl.:

C07C 29/76 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

30.11.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.01.2013

Fecha de la concesión:

26.11.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

09.12.2013

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE GRANADA (100.0%)
Hospital Real, Cuesta del Hospicio s/n
18071 Granada (Granada) ES**

72 Inventor/es:

**FERNÁNDEZ BARRERO, Alejandro;
HERRADOR DEL PINO, María Del Mar ;
ARTEGA BURÓN, Pilar y
FERNÁNDEZ ARTEAGA, Alejandro**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE ALL-TRANS-GERANILGERANIOL**

57 Resumen:

Procedimiento de obtención de all-trans-geranilgeraniol.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de all-trans-geranilgeraniol a partir de plantas de la clase Magnoliopsida, preferentemente a partir de partes aéreas de Bixa orellana o Bellardia trixago. El procedimiento comprende una fase de extracción y una fase de saponificación. De forma opcional puede realizarse una fase adicional de purificación.

ES 2 394 338 B1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de obtención de *all-trans*-geranilgeraniol

5 **SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se encuadra dentro del sector químico en el campo de la obtención de productos a partir de extractos de plantas. La invención tiene su aplicación en el sector farmacéutico y de perfumería ya que el metabolito secundario a obtener, geranilgeraniol, ha mostrado actividad antitumoral, antituberculosa, antimalárica y también puede ser utilizado como sintón de partida para la síntesis de otros productos de interés farmacéutico (vitamina K, vitamina E, antioxidantes, anticancerígenos, etc) y en perfumería.

10 **ESTADO DE LA TÉCNICA**

Geranilgeraniol es un compuesto de alto valor añadido, debido principalmente a sus múltiples actividades biológicas, que han hecho que en los últimos años existan más de 20 patentes acerca de su producción o de sus aplicaciones entre las que se encuentra su uso como intermediario de la síntesis de vitamina E cuya producción excede de las 20000 tm.

Entre las propiedades biológicas de geranilgeraniol, cabe destacar su potente capacidad de inducir apoptosis en diferentes líneas tumorales humanas, incluyendo la leucemia mieloide HL-60 y K562 que se caracterizan por resistir la acción de la mayoría de agentes inductores de apoptosis. Se ha descrito también la actividad de geranilgeraniol frente a la leucemia linfoblástica Molt3, la leucemia humana U937, el adenocarcinoma COLO320 D o el adenocarcinoma de pulmón A549. Recientes estudios también han relevado la prometedora actividad anticarcinogénica de geranilgeraniol frente a la hepatocarcinogénesis. Las posibilidades antitumorales de geranilgeraniol se amplían tras encontrarse descrita en la bibliografía la actividad antitumoral de derivados sencillos de geranilgeraniol, como plaunotol, ácido geranilgeránico o geranilgeranilacetona. Por último un nuevo valor añadido de geranilgeraniol se debe a su uso como material de partida en síntesis de moléculas de interés.

Se ha descrito el aumento de la producción de geranilgeraniol mediante sobreexpresión de genes en *Saccharomyces cerevisiae* y *Escherichia coli*. Se han descrito también diferentes síntesis para la preparación de geranilgeraniol. Algunos ejemplos son: a) reacción de trialquilfosfonoacetatos con farnesilacetona seguido de reducción con hidruro de aluminio, b) reacción de 4-toluensulfonato de geranilo con acetato de 8-bromo geranilo en presencia de *n*-butillitio seguido de eliminación del resto sulfónico con litio metálico y aminas, c) reacción de acoplamiento alílico entre 8-bromogeraniol protegido con *t*-butildimetilsililo (TBS) y geranilbario seguido de desprotección del grupo hidroxilo. También se ha obtenido geranilgeraniol a partir de acetato de geranilinalol, vía aminación catalizada por paladio(0) y mediante acoplamiento de Suzuki entre ácido metanborónico y el viniltriflato del enolato potásico del β -cetoéster obtenido por reacción del dianión del ester acetilacético con bromuro de farnesilo, seguido de reducción con DIBAL. El producto obtenido mediante estas síntesis, en la mayoría de los casos, es una mezcla de estereoisómeros geométricos donde uno o más de los dobles enlaces tienen estereoquímica *Z*, por tanto es necesaria una separación mediante destilación o cromatografía en columna para obtener *all-trans*-geranilgeraniol puro. Sin embargo el *all-trans*-geranilgeraniol es termolábil luego la destilación es difícil, mientras la separación de los estereoisómeros por columna es un procedimiento engorroso y tedioso.

Bellardia trixago (L.) All., también denominada *Trixago apula* Steven y *Bartsia trixago* L. (Scrophulariaceae) es una planta que se encuentra ampliamente distribuida por la Región Mediterránea. Su composición química revela la existencia de diferentes tipos de productos naturales como son glicósidos de iridoides y de lignanos, flavonoides y terpenos. En Andalucía se ha detectado la presencia de hasta tres quimiotipos diferentes de la planta. Uno ellos contiene altas proporciones de monomalonilester de geranilgeraniol [Barrero, A. F.; Sánchez, J. F.; Cuenca, F. G. *Phytochemistry* 1988, 27, 3676-3678], siendo la mejor fuente conocida en todo el mundo para este tipo de molécula.

Bixa orellana es una planta que se desarrolla en países de la zona intertropical de América, y que también contiene geranilgeraniol. La patente [ES 2209890 T3] describe un procedimiento para la extracción de este producto y tocotrienoles de subproductos de *Bixa orellana*.

Otras fuentes conocidas de geranilgeraniol son las semillas del lino (*Linum usitatissimum*), semillas y hojas de Sucupira (*Pterodon pubescens*) o el crotón (*Croton eluteria*).

Sin embargo, a pesar de las distintas fuentes y procedimientos de obtención de geranilgeraniol, sigue existiendo en el estado de la técnica la necesidad de una tecnología sencilla, simple y eficaz para la obtención de *all-trans*-geranilgeraniol. Dado que en la mayoría de los procesos para la obtención de *all-trans*-geranilgeraniol existentes hoy día es necesario una separación de estereoisómeros geométricos mediante procesos difíciles o engorrosos, la presente invención simplifica la obtención de geranilgeraniol utilizando como material de partida material vegetal renovable y obtiene directamente el estereoisómero geométrico *all-trans* activo. El proceso implica una tecnología sencilla, lo que supone una simplificación y abaratamiento de la obtención del mismo y sus derivados.

Entre otras aplicaciones, los productos obtenidos por este procedimiento se pueden utilizar como antitumorales, antiulcerosos, antivirásicos y cardioprotectores

OBJETO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un procedimiento (procedimiento de la invención) para la obtención de *all-trans*-geranilgeraniol a partir de plantas de la clase Magnoliopsida.

5

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, en un aspecto, a un procedimiento, en adelante procedimiento de la invención, para la obtención de un compuesto de fórmula general $C_{20}H_{34}O$ [(2*E*,6*E*,10*E*)-3,7,11,15-tetrametilhexadeca-2,6,10,14-tetraen-1-ol] que comprende las siguientes etapas:

10

- a) Obtención de un extracto a partir de un material vegetal de partida obtenido de plantas de la clase Magnoliopsida, preferentemente *Bixa orellana* o *Bellardia trixago*.
- b) Saponificación del extracto obtenido en a) para la obtención esteroespecífica de *all-trans*-geranilgeraniol.

15

En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende además una etapa c) de purificación del *all-trans*-geranilgeraniol obtenido en etapa b), de manera que se obtiene un *all-trans*-geranilgeraniol con un menor contenido de impurezas o libre de impurezas. En otra realización particular dicha purificación se realiza mediante cromatografía en columna. En una realización preferente, la fase de purificación del *all-trans*-geranilgeraniol obtenido se realiza mediante cromatografía en columna de gel de sílice, eluyendo con mezclas de hexano:*t*-butilmetiléter de polaridad creciente para obtener *all-trans*-geranilgeraniol. El rendimiento que se obtiene mediante este último procedimiento está entre 0.8 y 3.5 g de geranilgeraniol puro por cada 100 g de material vegetal de partida.

20

En el contexto de la presente invención material vegetal de partida se refiere a toda la parte aérea de la planta, incluyendo pero no limitándose a hojas, flores, tallos y semillas. En una realización particular, el material de partida utilizado se obtiene a partir de las partes aéreas secas y pulverizadas.

25

En una realización particular, el material vegetal de partida se obtiene de *Bixa orellana* o *Bellardia trixago*.

En una realización preferente, el material vegetal de partida procede de las partes aéreas de *Bellardia trixago*, y aún más preferentemente de *Bellardia trixago* quimiotipo GeGe. El rendimiento en este caso es de aproximadamente el 3.5% de *all-trans*-geranilgeraniol sobre el total del peso seco de material vegetal procedente de *Bellardia trixago*.

30

En otra realización preferente, el material vegetal de partida se obtiene de las partes aéreas de *Bixa orellana*, y más preferentemente de sus semillas. El rendimiento en este caso es de aproximadamente el 1% de *all-trans*-geranilgeraniol sobre el total del peso seco de material vegetal procedente de *Bixa orellana*.

35

La extracción se puede llevar a cabo por técnicas ampliamente conocidas por el experto en la materia. En una realización particular del procedimiento de la invención, el extracto se obtiene, tanto en frío como en caliente, añadiendo un disolvente orgánico, preferentemente apolar, al material vegetal de partida. Dicho disolvente orgánico se selecciona del grupo formado por hexano, *t*-butilmetiléter, cloroformo, acetato de etilo, etanol, metanol o sus mezclas. El material vegetal de partida se extrae con el disolvente orgánico por maceración a temperatura ambiente o en sistema soxhlet hasta agotamiento del material (4-24 h). Tras filtración se evapora el disolvente bajo presión reducida originándose el extracto.

40

Aunque la utilización de otro disolvente orgánico no afecta excesivamente al rendimiento, en una realización más preferente, la extracción se realiza con metanol. En otra realización preferente, la extracción se realiza con *t*-butilmetiléter.

45

En una realización particular del procedimiento de la invención, la saponificación para la obtención esteroespecífica de *all-trans*-geranilgeraniol se lleva a cabo utilizando diferentes bases, preferiblemente seleccionadas del grupo formado por NaOH, KOH y Na_2CO_3 y, preferentemente la concentración de la base es del 10% p/v. Tal y como es conocido por el experto en la materia, la saponificación se puede llevar a cabo a distintos tiempos y concentraciones.

50

En una realización más preferente de esta etapa, la obtención esteroespecífica de *all-trans*-geranilgeraniol mediante saponificación del extracto, se consigue disolviendo el extracto de *Bellardia trixago* GeGe en metanol y añadiendo potasa metanólica.

55

MODOS DE REALIZACION

En las realizaciones preferidas del procedimiento objeto de la invención se ha utilizado materia vegetal procedente del cultivo de plántulas de *Bellardia trixago* GeGe en vermiculita suplementada con Nutrichem y en cámara de cultivo a 25°C, 75% HR, y 16:8 L:O.

60

Ejemplo 1:

a) Fase de extracción:

100 g de las partes aéreas secas y pulverizadas de *B. trixago* se extrajeron con metanol en sistema soxhlet durante 12 h. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente bajo presión reducida originándose 7 g de extracto.

b) Fase de Saponificación:

El extracto obtenido se disolvió en 400 mL de metanol y a la disolución se le añadió 400 mL de potasa metanólica 10%. La mezcla resultante se dejó a temperatura ambiente durante 12 horas. Transcurrido este tiempo se eliminó el metanol bajo presión reducida, se diluyó con 1 L de agua y se extrajo tres veces con 400 mL de *t*-butilmetileter cada vez.

La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y evaporó bajo presión reducida obteniéndose 4 g de *all-trans*-geranilgeraniol con una pureza de aproximadamente el 95%.

Ejemplo 2:

a) Fase de extracción:

100 g de las partes aéreas secas y pulverizadas de *B. trixago* se extrajeron con metanol en sistema soxhlet durante 12 h. Transcurrido este tiempo se evaporó el disolvente bajo presión reducida originándose 7 g de extracto.

b) Fase de Saponificación:

El extracto obtenido se disolvió en 400 mL de metanol y a la disolución se le añadió 400 mL de potasa metanólica 10 % p/v. La mezcla resultante se dejó a temperatura ambiente durante 12 horas.

Transcurrido este tiempo se eliminó el metanol bajo presión reducida, se diluyó con 1 L de agua y se extrajo tres veces con 400 mL de *t*-butilmetileter cada vez. La fase orgánica se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y evaporó bajo presión reducida obteniéndose un producto crudo.

c) Fase de Purificación:

El producto crudo obtenido se cromatografió en columna de gel de sílice, eluyendo con hexano:*t*-butilmetiléter (1:1) originándose 3.5 g de *all-trans*-geranilgeraniol.

Ejemplo 3:

La metodología es la misma que en el ejemplo 2, pero en lugar de usar como disolvente metanol para la extracción se usa *t*-butilmetileter, obteniéndose 5.5 g de extracto. Después de la saponificación se obtienen 3.5 g de *all-trans*-geranilgeraniol.

Ejemplo 4:

La metodología es la misma que en el ejemplo 2, pero en lugar de usar en la saponificación como base KOH, se usa NaOH. El rendimiento obtenido a partir de 100 g de las partes aéreas secas es de 3.5 g de *all-trans*-geranilgeraniol.

Ejemplo 5:

La metodología es la misma que en el ejemplo 2, pero en lugar de usar en la saponificación como base KOH, se usa K_2CO_3 . El rendimiento obtenido a partir de 100 g de las partes aéreas secas es de 3.5 g de *all-trans*-geranilgeraniol.

Ejemplo 6:

La metodología es la misma que en el ejemplo 3, realizando la extracción con *t*-butilmetileter, pero en lugar de usar en la saponificación como base KOH, se usa NaOH. El rendimiento obtenido a partir de 100 g de las partes aéreas secas es de 3.5 g de *all-trans*-geranilgeraniol

Ejemplo 7:

La metodología es la misma que en el ejemplo 3, realizando la extracción con *t*-butilmetileter, pero en lugar de usar en la saponificación como base KOH, se usa K_2CO_3 . El rendimiento obtenido a partir de 100 g de las partes aéreas secas es de 3.5 g de *all-trans*-geranilgeraniol

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de *all-trans*-geranilgeraniol, que comprende las siguientes etapas:
 - a. Obtención de un extracto a partir de un material vegetal de partida obtenido de plantas de la clase Magnoliopsida,
 - b. Saponificación del extracto obtenido en a) para la obtención esteroespecífica *all-trans*-geranilgeraniol.
2. Procedimiento según la reivindicación anterior que además comprende una etapa c) de purificación del *all-trans*-geranilgeraniol obtenido en etapa b).
3. Procedimiento según la reivindicación anterior caracterizado porque la purificación se realiza mediante cromatografía en columna.
4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el extracto se obtiene añadiendo un disolvente orgánico a la materia vegetal.
5. Procedimiento según la reivindicación anterior, donde el disolvente orgánico se selecciona del grupo formado por hexano, *t*-butilmetiléter, cloroformo, acetato de etilo, etanol, metanol y sus combinaciones.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la saponificación se lleva a cabo con un agente básico seleccionado del grupo formado por NaOH, KOH, y Na₂CO₃.
7. Procedimiento según la reivindicación anterior donde el agente básico se utiliza a una concentración del 10%.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el material vegetal de partida se obtiene a partir de la parte aérea de la planta seca y pulverizada.
9. Procedimiento según la reivindicación anterior, donde la parte aérea se selecciona del grupo formado por hoja, flor, tallo, semillas y sus combinaciones.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde el material vegetal de partida se obtiene de *Bixa orellana* o *Bellardia trixago*.
11. Procedimiento según la reivindicación 10 donde el material vegetal de partida se obtiene de *Bellardia trixago*.
12. Procedimiento según la reivindicación anterior donde el material vegetal de partida se obtiene de *Bellardia trixago* quimiotipo *GeGe*.
13. Procedimiento según la reivindicación 10 donde el material vegetal de partida se obtiene de *Bixa orellana*.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 201231864

22 Fecha de presentación de la solicitud: 30.11.2012

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

5 Int. Cl.: **C07C29/76** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	BARRERO, A. F. et al. "Dramatic variation in diterpenoids of different populations of <i>Bellardia trixago</i> ". <i>Phytochemistry</i> , 1988, Vol. 27, No. 11, páginas 3676-3678. Ver Experimental.	1-13
A	ES 2209890 T3 (BARRIE, T. ET AL.) 04/09/2002. Ver página 5, líneas 20-30.	1-13
A	JP 2007238508 A (TAMA BIOCHEMICAL CO LTD) 20/09/2007, (resumen) Word Patent Index [en línea]. Londres (Reino Unido) Thompson Publications Ltd, DW200781, N.º de acceso 2007-877391.	1-13
A	US 7989006 B2 (AMERICAN RIVER NUTRITION, INC.) 02/08/2011. Ver columna 6, líneas 11-33; columna 7, líneas 31-61.	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
14.01.2013

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/4

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

C07C

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, XPESP, CAS.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 14.01.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 6, 7, 13	SI
	Reivindicaciones 1-5, 8-12	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-13	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Barrero, A. F. et al. "Dramatic variation in diterpenoids of different populations of <i>Bellardia trixago</i> ". <i>Phytochemistry</i> , 1988, Vol. 27, No. 11, páginas 3676-3678.	1988
D02	ES 2209890 T3 (BARRIE, T. et al.)	04.09.2002
D03	JP 2007238508 A (TAMA BIOCHEMICAL CO LTD)	20.09.2007
D04	US 7989006 B2 (AMERICAN RIVER NUTRITION, INC.)	02.08.2011

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

La solicitud se refiere a un procedimiento para la obtención de all-trans-geranilgeraniol que comprende las etapas de preparación de un extracto a partir de plantas de la clase Magnoliopsida y saponificación de dicho extracto.

El documento D01 divulga la obtención de all-trans-geranilgeraniol mediante la extracción en hexano de material vegetal procedente de plantas *Bellardia trixago* y posterior saponificación del extracto resultante de la extracción. Dicho compuesto se obtiene tras la etapa de saponificación junto a con otros compuestos, como trixagol. El all-trans-geranilgeraniol puede ser aislado y purificado del resto de productos presentes en los extractos del material vegetal mediante cromatografía en columna convencional de gel de sílice (Experimental).

La invención definida en las reivindicaciones 1-5 y 8-12 de la solicitud deriva directamente y de forma inequívoca de lo divulgado en el documento D01, careciendo por tanto de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

Las reivindicaciones 6 y 7 se refieren a la utilización de NaOH, KOH o Na₂CO₃ como agentes básicos para llevar a cabo la reacción de saponificación. Dichas bases son las habitualmente utilizadas en reacciones de saponificación, por lo tanto se considera que un experto en la materia dentro de una actividad rutinaria y sin necesidad de un esfuerzo inventivo podría llevar a cabo la reacción de saponificación divulgada en D01 con dichas bases, dando como resultado el procedimiento recogido en las reivindicaciones 6 y 7.

En consecuencia, la invención definida en las reivindicaciones 6 y 7 de la solicitud carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

En relación a la reivindicación 13, relativa a la obtención de all-trans-geranilgeraniol a partir de extractos vegetales de plantas *Bixa orellana*, igualmente se reconoce novedad pero no así actividad inventiva. Dado que no se recogen ejemplos en la solicitud con dicha planta y que es conocido que extractos de *Bixa Orellana* (Magnoliopsida al igual que las plantas *Bellardia trixago* divulgadas en el documento D01), son una fuente de all-trans-geranilgeraniol (ver por ejemplo D02, página 5, líneas 20-30; D03, resumen; D04, columna 6, líneas 11-33; columna 7, líneas 31-61), se considera que un experto en la materia podría obtener el compuesto all-trans-geranilgeraniol a partir de dicha planta aplicando el procedimiento definido el documento D01 con una razonable expectativa de éxito.

Por lo tanto, la invención definida en la reivindicación 13 carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).