



(12) BREVET D'INVENTION

- (11) N° de publication : **MA 27315 A1**
- (51) Cl. internationale : **A61K 31/222; C07C 69/025; C07C 69/007; A61P 3/02**
- (43) Date de publication : **02.05.2005**
-
- (21) N° Dépôt : **28031**
- (22) Date de Dépôt : **03.01.2005**
- (30) Données de Priorité : **03.07.2002 ES P200201554**
- (86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT: **PCT/ES2003/000327 02.07.2003**
- (71) Demandeur(s) :
- **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS, C/SERRANO 117 - 28006 MADRID (ES)**
 - **UNIVERSIDAD DE SEVILLA, C/VALPARAISO, 5-3° 41013 SEVILLA (EE)**
- (72) Inventeur(s) : **CERT VENTULA, ARTURO ; ESPARTERO SANCHEZ, JOSE, LUIS ; TRUJILLO PEREZ-LANZAC, MARIANA ; ALCUDIA GONZALEZ, FELIPE ; MATEO BRIZ, RAQUEL**
- (74) Mandataire : **CABINET CHARDY**
-
- (54) Titre : **METHODE DE PREPARATION D'ESTERS D'HYDROXYTYROSOL, LES ESTERS AINSI OBTENUS ET LEUR UTILISATION**
- (57) Abrégé : L'objet de la présente invention est une méthode pour la préparation d'une vaste gamme d'esters d'hydroxytyrosol. La synthèse des composants se fait par la réaction d'hydroxytyrosol synthétique ou des composants naturels d'hydroxytyrosol, oléuropéine ou aglycones d'oléuropéine (que l'on trouve dans l'huile d'olive, les margines, le grignon d'olive et les feuilles d'olivier) avec un agent acylant, qui est un composé qui contient au moins un groupe acylique de reste R, où R est H, un radical alkyle ayant entre 1 et 3 atomes de carbone linéaire, ramifié ou cyclique, un radical alkényle pouvant avoir jusqu'à 31 atomes de carbone linéaire, ramifié ou cyclique ou un groupe aryle. Les esters préparés selon cette méthode font également l'objet de l'invention et ils peuvent être utilisés aussi bien comme additifs de denrées alimentaires ou de cosmétiques que dans des préparations pharmaceutiques. **MÉTHODE DE PRÉPARATION D'ESTERS D'HYDROXYTYROSOL, LES ESTERS AINSI OBTENUS ET LEUR UTILISATION**

RÉSUMÉ :

L'objet de la présente invention est une méthode pour la préparation d'une vaste gamme d'esters d'hydroxytyrosol. La synthèse des composants se fait
5 par la réaction d'hydroxytyrosol synthétique ou des composants naturels d'hydroxytyrosol, oléuropéine ou aglycones d'oléuropéine (que l'on trouve dans l'huile d'olive, les margines, le grignon d'olive et les feuilles d'olivier) avec un agent acylant, qui est un composé qui contient au moins un groupe acylique de
reste R, où R est H, un radical alkyle ayant entre 1 et 3 atomes de carbone
10 linéaire, ramifié ou cyclique, un radical alkényle pouvant avoir jusqu'à 31 atomes de carbone linéaire, ramifié ou cyclique ou un groupe aryle. Les esters préparés selon cette méthode font également l'objet de l'invention et ils peuvent être utilisés aussi bien comme additifs de denrées alimentaires ou de cosmétiques que dans des préparations pharmaceutiques.

15

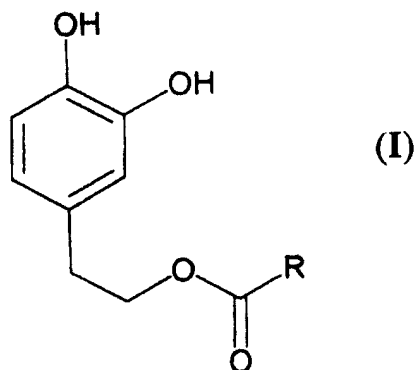
TITRE

**MÉTHODE DE PRÉPARATION D'ESTERS D'HYDROXYTYROSOL, LES
20 ESTERS AINSI OBTENUS ET LEUR UTILISATION**

SI 27315

OBJET DE L'INVENTION

La méthode qui fait l'objet de la présente invention propose une manière simple et efficace de préparer toute une gamme d'esters d'hydroxytyrosol, dont la
5 formule générale est :



La synthèse des composants se fait par réaction d'hydroxytyrosol synthétique naturel ou de composés intermédiaires de la réduction de l'acide 3,4
10 dihydroxyphényl acétique ou de n'importe lequel de ses esters dérivés ou des composés naturels hydroxytyrosol, oléuropéine ou aglycones de l'oléuropéine (que l'on trouve dans l'huile d'olive, les margines, le grignon d'olive et les feuilles d'olivier) avec un agent acylant, qui est un composé qui contient au moins un groupe acylique de reste R, où R est H, un radical alkyle à structure
15 en chaîne carbonée linéaire, ramifiée ou cyclique, substituée ou non, ayant entre 1 et 31 atomes de carbone, ou un radical alkényle avec structure de chaîne carbonée linéaire, ramifiée ou cyclique, substituée ou non, ayant jusqu'à 31 atomes de carbone ou un groupe aryle. Les esters préparés selon la méthode de l'invention peuvent être utilisés aussi bien comme additifs de
20 produits de l'alimentation ou cosmétiques que dans des préparations pharmaceutiques.

ÉTAT DE LA TECHNIQUE

25

Les antioxydants sont ajoutés aux huiles et aux graisses ainsi qu'aux aliments, afin de prévenir la formation de couleurs et de goûts non voulus et d'autres composants qui naissent dans l'oxydation des lipides ["Food Antioxidants", B.J.F.

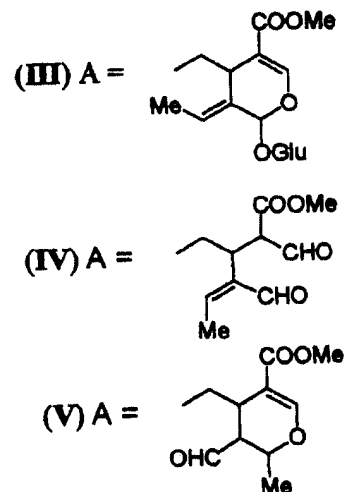
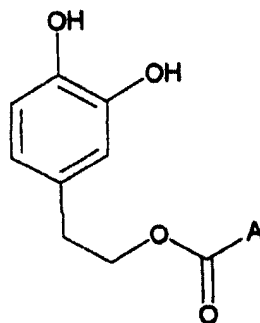
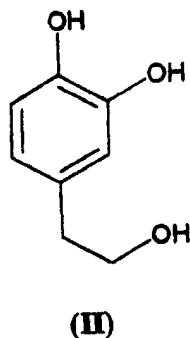
HUDSON ed., Elsevier, Londres, 1990 ; G. PASCAL dans "Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias", L.J. Multon ed., Ed. Acribia, Saragosse (Espagne), 1988, p. 157 et suiv.]. D'après les estimations, la vie utile de nombreuses denrées alimentaires est allongée de 15 à 200 % sous l'effet des antioxydants [R. MAESTRO DURÁN AND R. BORJA PADILLA, *Grasas y Aceites*, **44** (1993), 101].

On utilise à l'heure actuelle toute une gamme d'additifs antioxydants dans l'élaboration de denrées alimentaires [décret royal 145/1997, Journal officiel du 22/ 03/ 97, p. 9378 et suiv.] et de cosmétiques ["Inventario de Ingredientes Cosméticos", Centre de Publications du ministère de la Santé et la Consommation, Madrid, 1996], d'origine aussi bien naturelle que synthétique, en fonction de la nature, plus ou moins élevée en lipides, du produit que l'on se propose de garder de l'oxydation.

Parmi les antioxydants naturels sont à mettre en évidence, pour leur forte activité, les composés polyphénoliques, en particulier les *ortho* et les *paracatécholes*. L'hydroxytyrosol (II) est l'un de ces *o-catécholes* et on en trouve dans différentes sources naturelles, avec une présence spécialement importante dans l'olivier, [A. VÁZQUEZ RONCERO, *Rev. Fr. Corps Gras*, **25** (1978) 21], libre ou sous forme de dérivés (fondamentalement l'oléuropéine, III, [L.M. PANIZZI, *Gazz. Chim. Ital.*, **90** (1960) 1449]). L'hydroxytyrosol présente, face à l'oxydation, une capacité protectrice bien plus élevée que les additifs antioxydants normalement utilisés dans la conservation des denrées alimentaires gras : les tocophéroles (antioxydants d'origine naturelle) et le butyle hydroxytoluol (BHT, antioxydant d'origine synthétique) [M. SERVILI, et al., *Rev. Ital. Sostanze Grasse*, **73** (1996) 55]. Toutefois, étant pratiquement insoluble dans un milieu lipophile, il ne peut pas être utilisé pour ce type d'aliments.

Or, on sait que l'huile d'olive vierge (HOV) contient certains niveaux d'aglycones de l'oléuropéine (IV et V), d'un goût amer qu'ils font passer dans l'huile [G.F. MONTEODORO et al., *J. Agric. Food Chem.*, **415** (1993) 2228 ; A. VÁZQUEZ RONCERO et al., *Grasas y Aceites*, **25** (1974) 269]. Ces dérivés (IV et V) possèdent une activité antioxydante similaire à celle que présente l'hydroxytyrosol libre [M. SERVILI et al. ; *Rev. Ital. Sostanze Grasse*, **73** (1996) 55], ce qui signifie que la présence d'une liaison ester dans la molécule

n'affecte pas le pouvoir antioxydant.



5 On a découvert récemment la présence d'un autre ester d'hydroxytyrosol dans l'HOV ; l'acétate d'hydroxytyrosol (VI) [M. BRENES et al., *J. Agric. Food Chem.*, **47** (1999) 3535 ; J.L. ESPARTERO et al., *Libro de Resúmenes de la XXVII Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química*, Tenerife, 1999, Réf. **S6-1C-10** p. 165 ; R. MATEOS et al., *J. Agric. Food Chem.* **49** (2001) 2185]. Ce composé a fait l'objet d'études visant à confirmer sa capacité antioxydante et il s'est avéré qu'il présentait la même activité vis-à-vis de l'oxydation que l'hydroxytyrosol libre lui-même. Au surplus, il est liposoluble et il n'est pas amer, caractéristiques qui le rendent spécialement indiqué pour un usage éventuel comme additif alimentaire.

15

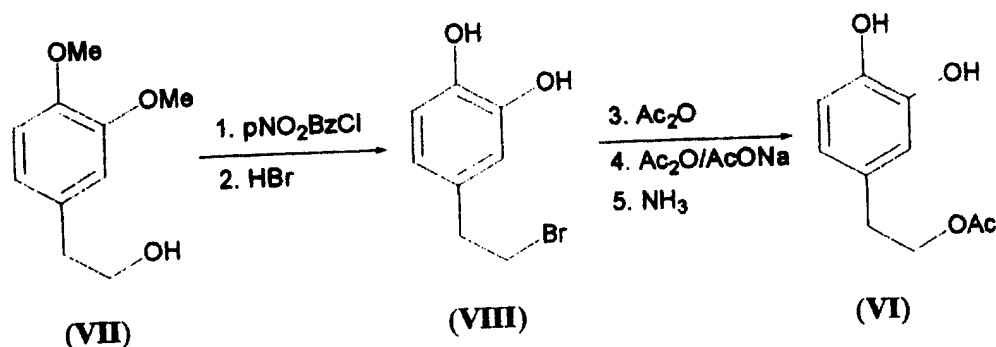
D'autre part, on se doute depuis un certain temps que les phénols contenus dans l'huile d'olive ont un effet bénéfique pour la santé de l'homme [F. VISIOLI et C. GALLI, *J. Agric. Food Chem.* **46** (1998) 4292]. On a constaté que l'hydroxytyrosol prévenait le dommage oxydatif du DNA et l'oxydation des lipoprotéines de faible densité [O.I. ARUOMA et al., *J. Agric. Food Chem.*, **46** (1998) 5181], qu'il inhibait l'agrégation des plaquettes [A. PETRONI et al., *Thromb. Res.* **78** (1995) 151], qu'il inhibait également l'activité de certaines lipoxgénases [N. KOHYAMA et al., *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **61** (1997) 347 ; R. de la PUERTA et al., *Biochem. Pharmacol.* **57** (1999) 445], et qu'il était absorbé par l'organisme humain avec l'ingestion d'huile d'olive [F. VISIOLI et al.,

25

FEBS Lett., **468** (2000) 159]. Toutes ces études permettent de croire que l'hydroxytyrosol et ses dérivés peuvent avoir une utilisation pharmacologique.

Une référence sur la préparation d'un ester d'hydroxytyrosol a été publiée par Baraldi en 1983 [P.G. BARALDI et al., *Liebigs Ann. Chem.*, **83** (1983) 684]. Dans ce cas, on obtenait l'acétate d'hydroxytyrosol par une route synthétique, que Schöpf avait préalablement étudiée [C. SCHÖPF et al., *Liebigs Ann. Chem.*, **563** (1949) 86], et qui impliquait cinq phases à partir de 2-(3,4-diméthoxyphényle)éthanol (VII), tel que le montre le schéma ci-après :

10



Récemment a été décrite une nouvelle synthèse [M.H. GORDON et al., *J. Agric. Food Chem.*, **49** (2001) 2480] à partir de l'hydroxytyrosol, synthèse qui est composée de trois phases : traitement au bromure de benzyle pour donner 2-(3,4-dibenzyloxyphényle)éthanol, acétylation avec acide acétique en pyridine afin d'obtenir l'acétate du produit précédent et, enfin, élimination des groupes de benzyle par hydrogénation, à l'aide d'un catalyseur de palladium.

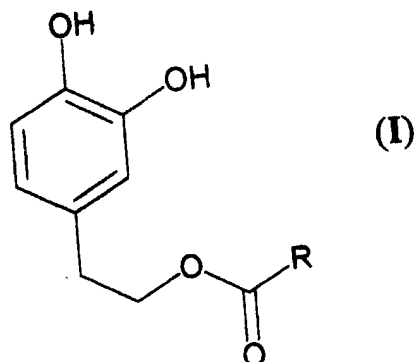
15

Les deux méthodes sont longues, certaines de leurs phases exigent des conditions spéciales et/ ou une manipulation spécialement soignée pour éviter les pertes non nécessaires de produit, et les rendements totaux sont faibles. Au demeurant, ces méthodes ne permettent de synthétiser que l'acétate d'hydroxytyrosol (VI) en question.

25

EXPLICATION DE L'INVENTIONN

L'objectif de cette invention est une méthode pour la préparation d'esters d'hydroxytyrosol dont la formule générale est :



La méthode est une réaction d'estérification régiosélective qui se compose des phases suivantes :

a) contact entre l'un des composants ci-après :

- 5 - hydroxytyrosol
- hydroxytyrosol comme composé intermédiaire de la réduction de l'acide 3,4-dihydroxyphényle acétique ou de n'importe lequel de ses esters dérivés
- oléuropéine
- 10 - aglycones de l'oléuropéine

et d'un agent acylant dans un rapport de concentration compris entre 10:1 et 1.1000 (hydroxytyrosol / agent acylant), à une température comprise entre 0 et 150° C, pendant une période allant de 30 minutes à 1 mois, en présence d'un catalyseur.

- 15 b) isolation et purification des esters d'hydroxytyrosol obtenus au cours de la phase précédente.

L'agent acylant est un composant qui contient au moins un groupe acylique de reste R. Le radical R de la formule générale peut être H, un radical alkyle, un radical alkényle ou un groupe aryle. Le radical alkyle peut être n'importe quel radical à structure de chaîne carbonée linéaire, ramifiée ou cyclique, substituée ou non, ayant jusqu'à 31 atomes de carbone inclus. Le radical alkényle peut être n'importe quel radical à structure de chaîne carbonée linéaire, ramifiée ou cyclique, substituée ou non, ayant jusqu'à 31 atomes de carbone inclus, ayant un degré ou plus d'insaturation dans n'importe quelle position de la chaîne. Le radical aryle est un groupe phényle ou un dérivé de ce dernier substitué.

Au cas où un agent acylant est un ester, la réaction est régiosélective à 95 % au moins.

La réaction est effectuée en présence ou non d'un solvant inerte et d'un catalyseur acide ou enzymatique.

Le solvant est choisi parmi les suivants : esters, éthers ou hydrocarbures halogénés.

- 5 Le catalyseur peut être un acide minéral, phosphorique, organylsulfonique ou une lipase. En présence d'acide sulfurique, la réaction a lieu à température ambiante, pendant une période allant de 30 minutes à 24 heures.

La méthode faisant l'objet de l'invention peut inclure, après la phase de contact, l'isolation et purification des esters d'hydroxytyrosol obtenus.

- 10 Les esters d'hydroxytyrosol que l'on peut obtenir par la procédure antérieure font également partie de la présente invention ; le reste acylique en est constitué par une chaîne qui peut contenir :

- de 3 à 6 atomes de carbone

- de 7 à 9 atomes de carbone

- 15 - plus de 10 atomes de carbone.

Les esters d'hydroxytyrosol, obtenus ou non en appliquant la méthode de l'invention, peuvent être utilisés comme additifs dans des formulations alimentaires, des cosmétiques et des préparations pharmaceutiques.

- 20 Dans le même ordre d'idées, les produits de la réaction obtenus peuvent être utilisés sans isolation postérieure des esters, comme additifs dans les applications mentionnées.

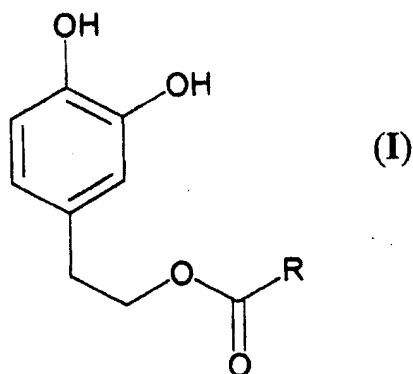
En particulier et pour utilisation dans des formulations alimentaires, les esters peuvent être ajoutés seuls ou combinés à d'autres antioxydants naturels de type orthodiphénolique ou diterpénique, dans une quantité telle que leur concentration totale à la phase apolaire de l'aliment ne dépasse pas 200 ppm.

25 Fait également partie de la présente invention une formulation alimentaire qui contient comme additifs des esters d'hydroxytyrosol, seuls ou combinés à d'autres antioxydants naturels de type orthophénolique ou diterpénique, dans une quantité telle que leur concentration totale à la phase apolaire de l'aliment ne dépasse pas 200 ppm.

30 Enfin, toujours parmi les thèmes faisant l'objet de la présente invention, mentionnons un produit cosmétique et une préparation pharmaceutique qui contiennent des esters d'hydroxytyrosol.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

Cette invention décrit une nouvelle méthode pour la préparation d'esters d'hydroxytyrosol [2-(3,4-dihydroxyphényle)éthanol], dont la formule générale (I) est :



où

R est H, un radical alkyle ayant 1 à 31 atomes de carbone, aussi bien linéaire que ramifié ou cyclique, substitué ou non, un radical alkényle ayant jusqu'à 31 atomes de carbone linéaire, ramifié ou cyclique, substitué ou non et avec un degré ou plus d'insaturation ou un groupe aryle.

à partir de l'hydroxytyrosol ou d'esters naturels d'hydroxytyrosol (oléuropéine, aglycones d'oléuropéine) et d'un agent acylant, qui contient au moins un groupe acylique de reste R. L'hydroxytyrosol peut avoir une origine synthétique [R. CAPASSO et al., *J. Agric. Food Chem.*, **47** (1999) 1745 ; C. BAI et al., *J. Agric. Food Chem.*, **46** (1998) 3998 ; R. VERHE et al., *Bull. Liaison Groupe Polyphenols*, **15** (1992) 237 ; A. BIANCO et al., *Synth. Commun.* **18** (1988) 1765 ; P.G. BARALDI et al., *Liebigs Ann. Chem.*, **83** (1983) 684 ; J.C. SPIN et al., *J. Agric. Food Chem.*, **49** (2001) 1187] ou naturelle et peut être utilisé à n'importe quelle concentration. De même, l'hydroxytyrosol peut être ajouté comme composant intermédiaire de la réduction de l'acide 3,4-dihydroxyphényle acétique ou de n'importe lequel de ses esters dérivés. L'oléuropéine et les aglycones d'oléuropéine ont une origine naturelle. On trouve aussi bien l'hydroxytyrosol que l'oléuropéine et ses aglycones dans les olives, l'huile d'olive, les feuilles

d'olivier et dans les produits de déchets de l'élaboration de l'huile d'olive ou des olives de table, notamment dans les margines, le grignon d'olive et les eaux de lavage que l'on obtient avec la préparation d'olives vertes au goût espagnol [M.J. AMIOT et al., *J. Agric. Food Chem.*, **34** (1986) 823 ; R. BRIANTE et al., *J. of Biotechnol.*, **93** (2002) 109 ; M. BRENES et al., *J. Agric. Food Chem.*, **43** (1995) 2702 ; R. MATEOS et al., *J. Agric. Food Chem.*, **49** (2001) 2185 ; R. CAPASSO et al., *J. Agric. Food Chem.*, **47** (1999) 1745 ; R. CAPASSO et al., *Agrochimica*, **38** (1994) 165 ; R. CAPASSO et al., *Phytochemistry*, **12** (1992) 4125 ; E. RAGAZZI et al., *Ann. Chim.*, **57** (1967) 1476] and R. CAPASSO et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **607** (1996) 365 ; L.M. PANIZZI et al., *Gazz. Chim. Ital.* **90** (1960) 1449].

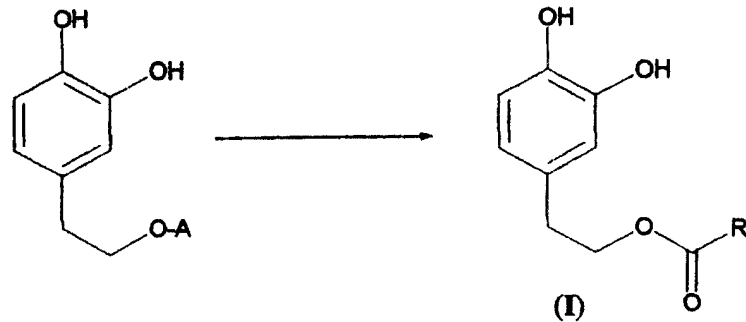
Par "radical alkyl ayant entre 1 et 31 atomes de carbone" on entendra, dans le sens utilisé pour cette description, n'importe quel radical ayant une structure de chaîne carbonée linéaire, ramifiée ou cyclique, substituée ou non, ayant jusqu'à 31 atomes de carbone inclus.

Dans le même sens, le terme "radical alkényle ayant entre 1 et 31 atomes de carbone" sera entendu comme n'importe quel radical ayant une structure de chaîne carbonée linéaire, ramifiée ou cyclique, substituée ou non, ayant jusqu'à 31 atomes de carbone inclus et un degré ou plus d'insaturation dans n'importe quelle position de la chaîne.

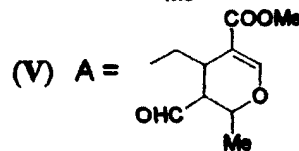
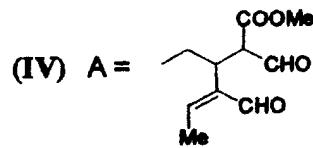
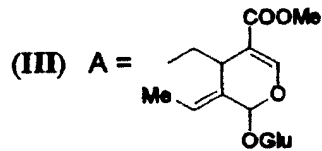
Toujours dans le même ordre d'idées, "aryle" aura le sens d'un groupe phényle ou d'un dérivé benzénique substitué par un groupe ou davantage de quelque nature que ce soit.

La synthèse des composants (I), qui fait l'objet de cette invention, est effectuée par une réaction d'hydroxytyrosol (II) synthétique (obtenu par l'une ou l'autre des méthodes décrites plus haut) ou des produits naturels : hydroxytyrosol (II), oléuropéine (III) et aglycones d'oléuropéine (IV et V) (dérivés de n'importe laquelle des sources mentionnées plus haut), avec un dérivé acylique (RCOX), où R a le sens qui lui a été donné plus haut. Cette réaction peut se faire avec chauffage ou à la température ambiante et en présence d'un catalyseur acide ou enzymatique, conformément au schéma ci-après :

catalyseur



(II) A = H



5

Comme catalyseur acide, on peut utiliser n'importe quelle substance de nature acide, avec une préférence pour : acide sulfurique (H_2SO_4), chlorure d'hydrogène (HCl), acide phosphorique, acide trifluoroacétique (CF_3COOH), acide acétique (CH_3COOH), acide *p*-toluénosulfonique ($CH_3C_6H_4SO_3H$) ou acide camphorsulfonique ($C_{10}H_{16}HO_4S$).

10

Comme catalyseur enzymatique, on peut utiliser n'importe quelle enzyme ayant une activité d'estérase ou lipase, crue ou purifiée, avec une préférence pour : lipase pancréatique porcine (PPL), papaïne, estérase de foie de cheval, de porc, de vache, de lapin ou de brebis.

15

La réaction peut se faire en l'absence ou en présence de solvants, lesquels devront être inertes.

Les esters d'hydroxytyrosol obtenus en appliquant la méthode de l'invention ont fait l'objet d'études afin de confirmer leur capacité antioxydante et il s'est avéré

qu'ils présentaient, face à l'oxydation. la même activité que l'hydroxytyrosol libre lui-même. Leur avantage, c'est qu'ils sont bien plus solubles dans des environnements lipidiques (huiles, saindoux, graisses...). C'est pourquoi ces composants de formule (I) sont utiles pour l'industrie alimentaire et des cosmétiques comme additifs antioxydants. D'autre part, les esters d'hydroxytyrosol possèdent des effets pharmacologiques similaires à ceux que l'on a observés avec l'hydroxytyrosol, et qui peuvent être encore plus importants en raison du caractère plus liposoluble de ces molécules.

10 Concernant l'état de la technique précédente, la méthode de l'invention présente les avantages ci-après :

- 1) C'est la première fois qu'a été décrite la préparation d'esters d'hydroxytyrosol par une réaction de transestérification.
- 2) Les catalyseurs utilisés peuvent être éliminés aisément, ce qui évite tout processus de purification postérieure.
- 15 3) La méthode de l'invention permet d'accéder, en principe, à n'importe quel ester d'hydroxytyrosol en changeant tout simplement la nature du réactif RCOX .
- 4) La réaction est effectuée avec de hautes performances chimiques.
- 20 5) Il s'agit d'une méthode plus simple et efficace que celle qui est décrite dans l'état de la technique pour la synthèse de l'acétate d'hydroxytyrosol.
- 6) Les esters d'hydroxytyrosol obtenus par la méthode de l'invention sont plus solubles dans des lipides que l'hydroxytyrosol et ils n'ont pas de goût amer.
- 25 7) Leur activité antioxydante est plus élevée que celle d'autres additifs utilisés à l'heure actuelle (tocophérols et BHT).
- 8) Ils sont préparés à partir d'hydroxytyrosol ou de ses dérivés naturels mentionnés plus haut et qui se trouvent en abondance dans les eaux usées pour l'obtention de l'huile d'olive (margines), les résidus solides (grignon) et les feuilles d'olivier, d'où on peut les extraire par des procédés connus. Il serait ainsi possible de tirer parti des produits de déchet des moulins à huile.
- 30 9) Il est aisé de préparer des esters d'hydroxytyrosol dont le reste R soit celui d'un acide gras présent sous forme naturelle dans les graisses
- 35

animales et/ ou les huiles végétales (butyrique, palmitique, stéarique, oléique, linoléique, etc.), qui en fait des candidats adéquats comme additifs antioxydants liposolubles dans l'alimentation humaine et les applications pharmacologiques.

- 5 10) L'élection d'un agent acylant approprié permet de moduler l'hydrosolubilité et la lipophilie des produits obtenus.

MODE DE RÉALISATION DE L'INVENTION

L'invention est illustrée par les exemples suivants qui, en aucune façon, ne
10 prétendent limiter la portée de la présente invention.

Exemple 1 : Préparation d'acétate de 2-(3,4-dihydroxyphenyl)éthyle (Acétate d'hydroxytyrosol)

15 Méthode A : À partir d'hydroxytyrosol

Ajouter 50 mg de lipase pancréatique porcine crue (Aldrich) à une solution de 50 mg d'hydroxytyrosol (II) dans 2 ml d'acétate d'éthyle et agiter le mélange résultant pendant 48 heures. La suspension résultante est filtrée par célite, le
20 solvant s'évapore à vide, et on obtient l'acétate d'hydroxytyrosol pur, avec un rendement de 86 %.

Méthode B : À partir d'oléuropéine

25 Ajouter 0.4 ml d'acide chlorhydrique 12N à une solution de 50 mg d'oléuropéine (III) dans 4 ml d'acétate d'éthyle et agiter le mélange résultant pendant 16 heures à 40° C. La suspension résultante est lavée avec une solution saturée de bicarbonate de soude, séchée sur du sulfate de sodium anhydre, filtrée et évaporée jusqu'à résidu. Le produit est purifié par chromatographie en colonne
30 et on obtient l'acétate d'hydroxytyrosol pur, avec un rendement de 72 %.

Méthode C : À partir de l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique

Ajouter une solution de 6 g d'acide 3,4 dihydroxyphényl acétique dans 120 ml de
35 THF (tétrahydrofurane) sec à une solution de 0,13 M d'hydrure d'aluminium et

lithium en THF. Chauffer à 70° C pendant 4 heures. Ajouter 300 ml d'acétate d'éthyle et ensuite 90 ml d'eau. La suspension résultante s'évapore à vide et le résidu pâteux est suspendu dans 200 ml d'eau, on ajoute de l'acide chlorhydrique dilué jusqu'à pH 2-3 et la solution résultante est extraite avec 7 x 200 ml d'acétate d'éthyle. L'extrait organique est séché sur du sulfate de soude et concentré jusqu'à un volume de 300 ml. On ajoute 60 mg d'acide p-toluènesulfonique et on chauffe à reflux 48 heures. La solution résultante s'évapore à vide et le résidu est purifié par chromatographie en colonne, et on obtient l'acétate pur avec un rendement de 73 %.

Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 6.63 (d, 1H), 6.60 (d, 1H), 6.46 (dd, 1H), 4.10 (t, 2H), 2.68 (t, 2H), 1.97 (s, 3H) ppm.
 ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 170.2, 145.0, 143.7, 128.5, 119.4, 116.1, 115.5, 64.6, 33.5, 20.6 ppm

Spectrométrie de masses (SM)

Calculé pour $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 197.081384
Déterminé par HRMS (CI) : 197.080136 (6.3 ppm)

Analyse élémentaire

Calculé pour $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$: C, 76.59 ; H, 10.64
Trouvé : C, 76.32 ; H, 10.91

Exemple 2 : Préparation de butyrate de 2-(3,4-dihydroxyphenyl)éthyle (Butyrate d'hydroxytyrosol)

À une solution de 50 mg d'hydroxytyrosol (II) dans 3 ml de butyrate de méthyle est ajoutée une goutte d'acide sulfurique concentré et la solution est chauffée à 70° C pendant 24 heures. Elle est lavée avec une solution saturée de bicarbonate de soude, la fraction organique est diluée à l'éther, séchée sur du sulfate de soude et évaporée à vide. Le résidu est purifié par chromatographie

en colonne et on obtient l'ester pur avec un rendement de 78 %.

Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 6.61 (d, 1H), 6.59 (d, 1H), 6.43 (dd, 1H), 4.11 (t, 2H), 2.67 (t, 2H), 2.25 (t, 2H), 1.72 (m, 2H), 0.92 (t, 3H) ppm.

^{13}C (DMSO- d_6) δ : 172.4, 145.1, 143.7, 129.4, 128.6, 119.3, 116.1, 64.6, 33.5, 18.2, 13.4 ppm

5

Spectrométrie de masses (SM)

Calculé pour $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$ $[\text{M}]^+$: 224.104861

Déterminé par HRMS (CI) : 224.103766 (4.9 ppm)

10

Analyse élémentaire

Calculé pour $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_4$: C, 64.27 ; H, 7.19

Trouvé : C, 63.98 ; H, 7.43

15

**Exemple 3 : Préparation d'heptanoate de 2-(3,4-dihydroxyphényle)éthyle
(Heptanoate d'hydroxytyrosol)**

À une solution de 50 mg d'hydroxytyrosol (II) dans 3 ml d'heptanoate d'éthyle sont ajoutés 3 mg d'acide p-toluènesulfonique et le mélange est chauffé à 65° C pendant 24 heures. Le produit est obtenu après purification par chromatographie en colonne avec un rendement de 66 %.

20

Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

^1H NMR (DMSO- d_6) δ : 6.62 (d, 1H), 6.58 (d, 1H), 6.42 (dd, 1H), 4.10 (t, 2H), 2.66 (t, 2H), 2.25 (t, 2H), 1.68 (m, 2H), 1.30 (m, 6H), 0.96 (t, 3H) ppm.

^{13}C (DMSO- d_6) δ : 172.5, 145.0, 143.8, 129.6, 128.4, 119.4, 116.2, 64.6, 34.4, 33.6, 32.8, 29.3, 25.6, 23.1, 13.4 ppm

Spectrométrie de masses (SM)

5 Calculé pour $C_{15}H_{22}O_4$ $[M]^+$: 266.151814
Déterminé par HRMS (CI) : 266.152102 (1.1 ppm)

Analyse élémentaire

10 Calculé pour $C_{15}H_{22}O_4$: C, 67.64 ; H, 8.33
Trouvé C, 68.02 ; H, 8.07

**Exemple 4 : Préparation d'oléate de 2-(3,4-dihydroxyphényle)éthyle
(Oléate d'hydroxytyrosol)**

15

Méthode A : à partir d'oléate d'éthyle

À une solution de 50 mg d'hydroxytyrosol (II) dans 1,0 ml d'oléate d'éthyle sont ajoutés 5 mg d'acide p-toluènesulfonique (Aldrich) et le mélange résultant est chauffé à 60° C pendant 24 heures. Le laisser refroidir puis le laver avec une solution saturée de $NaHCO_3$, recueillir la fraction organique, la sécher sur du sulfate de soude et introduire le mélange dans une colonne de chromatographie pour le purifier ; on obtient l'oléate d'hydroxytyrosol pur, avec un rendement de 76 %.

25

Spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN)

1H NMR (DMSO- d_6) δ : 6.62 (d, 1H), 6.59 (d, 1H), 6.44 (dd, 1H), 5.31 (m, 2H), 4.10 (t, 2H), 2.67 (t, 2H), 2.23 (t, 2H), 1.97 (1.4H), 1.47 (m, 2H), 1.25 (m, 20H) 0.84 (t, 3H) ppm.
 ^{13}C (DMSO- d_6) δ : 172.7, 145.0, 143.7, 129.6, 128.5, 119.3, 116.1, 115.4, 64.5, 33.7, 33.4, 31.2, 29.0, 28.9, 28.7, 28.6, 28.5, 28.4, 28.3, 26.5, 24.3, 22.0, 13.8 ppm

Spectrométrie de masses (SM)

Calculé pour $C_{26}H_{43}O_4$ $[M+H]^+$: 419.316135
Déterminé par HRMS (CI) : 419.315427 (1.7 ppm)

Analyse élémentaire

5

Calculé pour $C_{26}H_{42}O_4 \times \frac{1}{2} H_2O$: C, 73.07 ; H, 10.07
Trouvé : C, 73.58 ; H, 10.48

Méthode B : à partir de l'huile d'olive

10

Ajouter 1 goutte d'acide sulfurique à une solution de 50 mg d'hydroxytyrosol (II) dans 0.5 ml d'huile d'olive et agiter le mélange résultant pendant 24 heures. Laver le mélange avec une solution saturée de $NaHCO_3$, recueillir la fraction organique, la sécher sur du sulfate de soude et le solvant s'évapore. Le mélange d'esters gras d'hydroxytyrosol (fondamentalement oléate d'hydroxytyrosol), dilué dans le reste de l'huile d'olive, peut être utilisé sans nécessité de purification. Si l'on souhaite le purifier, on peut utiliser une colonne chromatographique, on obtient un mélange liquide d'oléate d'hydroxytyrosol (83 %), de palmitate d'hydroxytyrosol (11 %) et de linoléate d'hydroxytyrosol (6 %).

20

REVENDICATIONS MODIFIÉES

[reçues par le Bureau international le 23 janvier 2004 (23/ 01/ 04) :

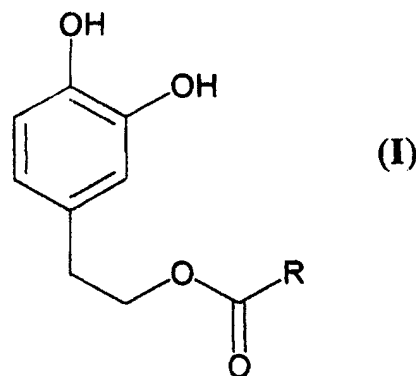
Revendications 1, 2, 3-7, 9, 10-19, 24-26, 27-30

remplacées par les revendications 1-6, 9-18, 25-27, 29-32 modifiées ;

5 revendications 7, 19, 24, 28 nouvelles]

REVENDICATIONS

10 1.- Méthode pour la préparation d'esters d'hydroxytyrosol dont la formule générale est :



par une réaction d'estérification régiosélective effectuée par contact entre l'un des composants ci-après :

- hydroxytyrosol
- 15 - hydroxytyrosol comme composant intermédiaire de la réduction de l'acide 3,4-dihydroxyphenyl acétique ou de n'importe lequel de ses esters dérivés
- oléuropéine
- aglycones d'oléuropéine

20 et un agent acylant, caractérisée par le fait que cet agent acylant est un acide organique ou un ester qui contient au moins un groupe acylique de reste R et qui est employé dans un rapport de concentration compris entre 10:1 et 1:1000 (hydroxytyrosol ou composé assimilé/ agent acylant), à une température comprise entre 0 et 150° C, pendant une période allant de 30 minutes à 1 mois,

25 en présence d'un catalyseur acide si l'agent acylant est un acide organique et d'un catalyseur acide ou enzymatique si l'agent acylant est un ester.

FEUILLE MODIFIÉE (ARTICLE 19)

- 2.- Méthode pour la préparation d'esters d'hydroxytyrosol d'après la revendication 1, caractérisée par le fait que l'estérification effectuée avec un ester comme agent acylant est régiosélective au moins à 95 %.
- 5 3.- Méthode pour la préparation d'esters d'hydroxytyrosol d'après les revendications 1-2, caractérisée par le fait que le radical R est un H, un radical alkyl, un radical alkényle ou un groupe aryle.
- 10 4.- Méthode pour la préparation d'esters d'hydroxytyrosol d'après les revendications 1-3, caractérisée par le fait que le radical alkyle peut être n'importe quel radical avec une structure de chaîne carbonée linéaire, ramifiée ou cyclique, substituée ou non, comprenant jusqu'à 31 atomes de carbone inclus.
- 15 5.- Méthode pour la préparation d'esters d'hydroxytyrosol d'après les revendications 1-3, caractérisée par le fait que le radical alkényle peut être n'importe quel radical ayant une structure de chaîne carbonée linéaire, ramifiée ou cyclique, substituée ou non, comprenant jusqu'à 31 atomes de carbone inclus et ayant un degré ou plus d'insaturation dans n'importe quelle position de
- 20 la chaîne.
- 6.- Méthode pour la préparation d'esters d'hydroxytyrosol d'après les revendications 1-3, caractérisée par le fait que le radical alkyle est un groupe phényle ou un dérivé de ce dernier substitué.
- 25 7.- Méthode pour la préparation d'esters d'hydroxytyrosol d'après les revendications 1-6, caractérisée par le fait que l'agent acylant utilisé est constitué par des triglycérides contenus dans des huiles ou des graisses.
- 30 8.- Méthode pour la préparation d'esters d'hydroxytyrosol d'après les revendications 1-7, caractérisée par le fait que la réaction peut, en option, être effectuée en présence d'un solvant sélectionné parmi l'un des suivants : esters, éthers ou hydrocarbures halogénés.

- 9.- Méthode pour la préparation d'esters d'hydroxytyrosol d'après les revendications 1-8, caractérisée par le fait que le catalyseur est un acide minéral.
- 5 10.- Méthode pour la préparation d'esters d'hydroxytyrosol d'après la revendication 9, caractérisée par le fait que le catalyseur est un acide phosphorique.
- 10 11.- Méthode pour la préparation d'esters d'hydroxytyrosol d'après les revendications 1-8, caractérisée par le fait que le catalyseur est un acide organosulfonique.
- 15 12.- Méthode pour la préparation d'esters d'hydroxytyrosol d'après les revendications 1-8, caractérisée par le fait que le catalyseur est une lipase.
- 13.- Méthode pour la préparation d'esters d'hydroxytyrosol d'après les revendications 1-12, caractérisée par le fait qu'elle inclut, après la phase de contact, l'isolation et purification des esters d'hydroxytyrosol obtenus.
- 20 14.- Esters d'hydroxytyrosol que l'on peut obtenir par une méthode d'après les revendications 1-13, caractérisée par le fait que le reste acylique est constitué d'une chaîne qui comprend entre 3 et 6 atomes de carbone.
- 25 15.- Esters d'hydroxytyrosol que l'on peut obtenir par une méthode d'après les revendications 1-13, caractérisée par le fait que le reste acylique est constitué d'une chaîne qui comprend entre 7 et 9 atomes de carbone.
- 30 16.- Esters d'hydroxytyrosol que l'on peut obtenir par une méthode d'après les revendications 1-14, caractérisée par le fait que le reste acylique est constitué d'une chaîne qui comprend plus de 9 atomes de carbone.
- 17.- Utilisation d'esters d'hydroxytyrosol d'après les revendications 14 et 16, comme additif dans des formulations alimentaires

18.- Utilisation d'esters d'hydroxytyrosol comme additif dans des formulations alimentaires d'après la revendication 18, caractérisée par le fait que les esters d'hydroxytyrosol sont obtenus par une méthode d'après les revendications 1-13.

19.- Utilisation d'esters hydroxytyrosol d'après la revendication 15, comme additif de formulations alimentaires.

20.- Utilisation d'esters d'hydroxytyrosol comme additif dans des formulations alimentaires d'après les revendications 17-19, caractérisée par le fait que ces esters s'additionnent bien tout seuls ou en combinaison avec d'autres antioxydants naturels de type orthodiphénolique ou diterpénique, dans une quantité telle que leur concentration totale à la phase apolaire de l'aliment ne dépasse pas 200 ppm.

21.- Utilisation du mélange de produits obtenus de la réaction par une méthode d'après les revendications 1-12, avec élimination préalable du catalyseur et du solvant, comme additif dans des formulations alimentaires

22.- Utilisation d'esters d'hydroxytyrosol esters d'après les revendications 14 et 16, comme additif dans des produits cosmétiques.

23.- Utilisation d'esters d'hydroxytyrosol comme additifs dans des produits de cosmétique d'après la revendication 22, caractérisée par le fait que les esters d'hydroxytyrosol sont obtenus par une méthode d'après les revendications 1-13.

24.- Utilisation d'esters d'hydroxytyrosol d'après la revendications 15, comme additifs dans des produits cosmétiques.

25.- Utilisation du mélange des produits obtenus dans la réaction par une méthode d'après les revendications 1-12, avec élimination préalable du catalyseur et du solvant, comme additif dans des produits cosmétiques.

35

FEUILLE MODIFIÉE (ARTICLE 19)

- 26.- Utilisation d'esters hydroxytyrosol d'après les revendications 14 et 16 dans des préparations pharmaceutiques.

- 5 27.- Utilisation d'esters d'hydroxytyrosol dans des préparations pharmaceutiques d'après la revendication 25, caractérisée par le fait que les esters d'hydroxytyrosol sont obtenus par une méthode d'après les revendications 1-13.

- 10 28.- Utilisation d'esters hydroxytyrosol d'après la revendication 15 dans des préparations pharmaceutiques.

- 15 29.- Utilisation du mélange des produits obtenus dans la réaction par une méthode d'après les revendications 1-12, avec élimination préalable du catalyseur et du solvant, dans des préparations pharmaceutiques.

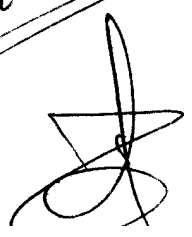
- 20 30.- Formulation alimentaire contenant comme additif des esters d'hydroxytyrosol d'après les revendications 14-16, seuls ou en combinaison avec d'autres antioxydants naturels de type orthodiphénolique ou diterpénique, dans une quantité telle que leur concentration totale à la phase apolaire de l'aliment ne dépasse pas 200 ppm.

- 25 31.- Produit cosmétique contenant comme additif des esters d'hydroxytyrosol, d'après les revendications 14-16.

- 32.- Préparation pharmaceutique contenant des esters d'hydroxytyrosol, d'après les revendications 14-16.

FEUILLE MODIFIÉE (ARTICLE 19)

30

P.V. 28031


Vingt sixième et dernière feuille
Rabat, le 3 - 01 - 2005