

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 275**

51 Int. Cl.:
C12P 19/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07730118 .2**
96 Fecha de presentación: **13.06.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2027279**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2009**

54 Título: **Compuestos fenólicos con aplicaciones cosméticas y terapéuticas**

30 Prioridad:
14.06.2006 EP 06290972

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.07.2012

73 Titular/es:
**LIBRAGEN
3 RUE DES SATELLITES BÂTIMENT CANAL
BIOTECH
31000 TOULOUSE, FR**

72 Inventor/es:
**AURIOL, Daniel;
NALIN, Renaud;
ROBE, Patrick y
LEFEVRE, Fabrice**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 384 275 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

Compuestos fenólicos con aplicaciones cosméticas y terapéuticas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la preparación de derivados fenólicos, composiciones farmacéuticas y cosméticas que comprenden tales derivados fenólicos, y su uso para la belleza de la piel y para tratar enfermedades.

Antecedentes de la invención

Compuestos fenólicos y sus propiedades

10 Los compuestos fenólicos (también llamados fenólicos), o polifenoles, constituyen uno de los grupos más numerosos y ampliamente distribuidos de sustancias en el reino vegetal, con más que 8.000 estructuras fenólicas conocidas actualmente. Los polifenoles son productos del metabolismo secundario de las plantas. La expresión "compuestos fenólicos" abarca un intervalo considerable de sustancias que poseen un anillo aromático que lleva uno o más sustituyentes hidroxilo. La mayoría de las clases principales de polifenoles vegetales se enumeran en la Tabla 1, según el número de átomos de carbono de la cadena principal básica. La estructura de los polifenoles naturales varía desde moléculas simples, tales como ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, tales como taninos condensados (HARBORNE JB (1980) Plant phenolics. En: BELL EA, CHARLWOOD BV (eds) Encyclopedia of Plant Physiology, volumen 8, Secondary Plant Products, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. Pp: 329-395).

15 Los tres grupos importantes para los seres humanos son los ácidos fenólicos (C6-C1, C6-C2 y C6-C3), los flavonoides (C6-C3-C6) y los polifenoles de alto peso molecular (más que 30 átomos de carbono). De hecho, los fenólicos, particularmente los polifenoles, exhiben una amplia variedad de actividades biológicas beneficiosas en los mamíferos, que incluyen acciones antivirales, antibacterianas, inmunoestimulantes, antialérgicas, antihipertensivas, antiisquémicas, antiarrítmicas, antitrombóticas, hipocolesterolémicas, antilipoperoxidantes, hepatoprotectoras, antiinflamatorias, anticarcinogénicas, antimutagénicas, antineoplásicas, antitrombóticas, y vasodilatadoras. Son poderosos antioxidantes *in vitro*.

25 **TABLA 1** : Las principales clases de compuestos fenólicos (o fenólicos) en las plantas (HARBORNE JB, 1980)

NÚMERO DE ÁTOMOS DE CARBONO	CADENA PRINCIPAL BÁSICA	CLASE	EJEMPLOS
6	C6	Fenoles simples Benzoquinonas	Catecol, hidroquinona, 2,6-dimetoxibenzoquinona
7	C6-C1	Ácidos fenólicos	Gálico, salicílico
8	C6-C2	Acetofenonas Derivados de tirosina Ácidos fenilacéticos	3-Acetil-6-metoxibenzaldehído Tirosol p-Hidroxi-fenilacético
9	C6-C3	Ácidos hidroxicinámicos Fenilpropenos Cumarinas Isocumarinas Cromonas	Cafeico, ferúlico Miristicina, eugenol Umbeliferona, aesculetina Bergenona Eugenina
10	C6-C4	Naftoquinonas	Juglona, plumbagina
13	C6-C1-C6	Xantonas	Mangiferina
14	C6-C2-C6	Estilbenos Antraquinonas	Resveratrol Emodina
15	C6-C3-C6	Flavonoides	Quercetina, cianidina

		Isoflavonoides	Genisteína
18	(C6-C3) ₂	Lignanos Neolignanos	Pinoresinol Eusiderina
30	(C6-C3-C6) ₂	Biflavonoides	Amentoflavona
n	(C6-C3) _n (C6) _n (C6-C3-C6) _n	Ligninas Melaninas de catecol Flavolanos (Taninos condensados)	

Entre los ácidos fenólicos, las estructuras carbonadas constitutivas más importantes son las estructuras hidroxibenzoicas (C6-C1) e hidroxicinámicas (C6-C3). El contenido de ácido hidroxibenzoico de las plantas comestibles es generalmente muy bajo, con la excepción de ciertas frutas rojas, rábanos negros y cebollas, que pueden tener concentraciones de varias decenas de miligramos por kilogramo de peso fresco. Los ácidos hidroxibenzoicos son componentes de estructuras complejas tales como taninos hidrolizables (galotaninos en mangos y elagitaninos en frutas rojas tales como fresas, frambuesas y moras). Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes que los ácidos hidroxibenzoicos, y consisten principalmente en los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico. Estos ácidos raramente se encuentran en la forma libre, excepto en alimentos procesados que hayan sufrido congelación, esterilización o fermentación. Las formas enlazadas son derivados glicosilados o ésteres de ácido quínico, ácido siquímico y ácido tartárico. El ácido cafeico y el ácido quínico se combinan para formar ácido clorogénico, que se encuentra en muchos tipos de frutas y en alta concentración en el café. El ácido cafeico, tanto libre como esterificado, es generalmente el ácido fenólico más abundante, y representa entre 75% y 100% del ácido hidroxicinámico total de la mayoría de las frutas (MANACH C, SCALBERT A, MORAND C, REMESY C, JIMENEZ L (2004) Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr 79: 727-747).

Los flavonoides consisten en un grupo numeroso de sustancias polifenólicas de bajo peso molecular, derivados de benzo-γ-pirona que son diversos en estructura química; representan el grupo más común y ampliamente distribuido de fenólicos vegetales. La estructura común de los flavonoides es la de los difenilpropanos (C6-C3-C6); consiste en dos anillos aromáticos (ciclos A y B) enlazados mediante tres carbonos que usualmente forman un heterociclo oxigenado (ciclo C). La Figura 1 muestra la estructura básica y el sistema usado para la numeración de carbonos del núcleo del flavonoide. Las variaciones estructurales dentro de los anillos subdividen a los flavonoides en varias familias: flavonoles, flavonas, flavanoles, isoflavonas, antocianidinas y otros. Estos flavonoides a menudo aparecen como glicósidos, glicosilación que hace a la molécula más soluble en agua y menos reactiva hacia los radicales libres. El azúcar más comúnmente implicado en la formación de glicósidos es la glucosa, aunque también aparecen galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa, así como disacáridos tales como rutinosa. Todas las variantes de flavonoides están relacionadas por una ruta de biosíntesis común, que incorpora precursores tanto de la ruta del siquimato como del acetato-malonato (CROZIER A, BURNS J, AZIZ AA, STEWART AJ, RABIASZ HS, JENKINS GI, EDWARDS CA, LEAN MEJ (2000) Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. Biol Res 33: 79-88). Se producen modificaciones adicionales en diversas etapas, dando como resultado una alteración en el grado de hidroxilación, metilación, isoprenilación, dimerización y glicosilación (produciendo O- o C-glicósidos). Los compuestos fenólicos actúan como antioxidantes, con mecanismos que implican tanto eliminación de radicales libres como quelación de metales. En efecto, niveles en exceso de cationes metálicos de hierro, cinc y cobre en el cuerpo humano pueden promover la generación de radicales libres y contribuir al daño oxidativo de las membranas celulares y del ADN celular; formando complejos con estos iones metálicos reactivos, pueden reducir su absorción y reactividad. Se tiene que subrayar que, aunque la mayoría de los flavonoides quelan al Fe²⁺, hay grandes diferencias en la actividad quelante. En particular, el dihidroflavonol taxifolina quela más eficazmente al Fe²⁺ que el correspondiente flavonol quercetina (VAN ACKER SABE, VAN DER BERG DJ, TROMP MNJL, GRIFFIOEN DHG, VAN BENNEKOM, VAN DER VIJGH WJF, BAST A (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radic Biol Med 20 331-342).

Los flavonoides tienen una química estructural ideal para actividades de eliminación de radicales libres (varios estudios han mostrado que los flavonoides actúan como eliminadores de aniones superóxido, oxígeno singlete, radicales hidroxilo y radicales peróxido lípidos por donación rápida de un átomo de hidrógeno). Un importante hallazgo a partir de los estudios de la relación entre las características estructurales de los flavonoides y su actividad antirradicales es que se requiere un resto catecol (3',4'-dihidroxifenol) en el anillo B para una buena actividad de eliminación. Recientemente, esta afirmación fue confirmada con, no obstante, una modulación: en un estudio sobre la relación entre las características estructurales de 29 flavonoides y su actividad antirradicales, se observó de hecho que la estructura de catecol en el anillo B no es siempre una condición *sine qua non* para conseguir una alta actividad de eliminación de radicales libres, y que flavonoides altamente activos poseen un anillo B 3',4'-dihidroxi y/o un grupo 3-OH (AMIC D, DAVIDOVIC-AMIC D, BESLO D, TRINAJSTIC N (2003) Structure radical scavenging

activity relationships of flavonoids. *Croatica Chem Acta* 76: 55-61). Se ha demostrado que los flavonoides son antioxidantes más eficaces *in vitro* que las vitaminas E y C en una base molar (RICE-EVANS CA, MILLER NJ, PAGANGA G (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2: 152-159). Hay también informes de flavonoides que inhiben la actividad de enzimas tales como oxigenasas.

- 5 Se debe subrayar que la hidrofobicidad de los polifenoles es intermedia entre la de la vitamina C (altamente hidrófila) y la de la vitamina E (altamente hidrófoba); por tanto, se espera que los polifenoles actúen en interfaces agua-lípido, y pueden estar implicados en rutas de regeneración oxidativa con la vitamina C y E.

Derivados fenólicos y su preparación

- 10 Debido a su baja solubilidad en agua y/o su alta sensibilidad hacia la oxidación, el uso de fenólicos en preparaciones farmacéuticas o cosméticas requiere formulaciones adaptadas y específicas. Dado que estas formulaciones también deben satisfacer las restricciones asociadas a su uso final, el compromiso entre aceptabilidad, concentración y estabilidad es a menudo difícil de alcanzar.

- 15 Las formas de fenólicos más solubles en agua y/o más resistentes a la oxidación, tales como los glicósidos, no están siempre disponibles en la naturaleza y pueden requerir, cuando existen, procedimientos complejos de extracción y purificación a partir del material vegetal. Se han intentado métodos tanto químicos como bioquímicos (enzimáticos) para aumentar la solubilidad en agua y/o la estabilidad. Como los compuestos fenólicos tienen varios grupos hidroxilo libres, los intentos de modificaciones químicas de los compuestos fenólicos conducen a reacciones no selectivas, que generan un abanico de moléculas diferentes. Se requieren entonces etapas de purificación adicionales para recuperar el (los) producto(s) deseado(s).

- 20 En lo que se refiere al método bioquímico, se han investigado hasta la fecha tres vías para obtener glicósidos fenólicos, y básicamente glicósidos de flavonoides.

- 25 La primera vía se basa en glicosiltransferasas capaces de transferir el resto de azúcar de un nucleótido de azúcar a un aceptor (en el caso de UDP-glucosa:glucosiltransferasas (UGT), la glucosa es transferida desde uridina 5'-difosfoglucosa). Estas enzimas, que contribuyen en la síntesis del metabolismo secundario en las plantas, tienen amplias especificidades de sustrato aceptor (LIM EK, HIGGINS GS, BOWLES DJ (2003) Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid by UDP-glucose:glucosyltransferase is maintained *in planta*. *Biochem J* 373: 987-92; LIM EK, ASHFORD DA, HOU B, JACKSON RG, BOWLES DJ (2004) *Arabidopsis* glycosyltransferases as biocatalysts in fermentation for regioselective synthesis of diverse quercetin glucosides. *Biotechnol. Bioeng.* 87(5): 623-31). No obstante, este método es afectado por el muy alto coste de los nucleótidos de azúcar, y porque la regeneración del sustrato del nucleótido de azúcar, que es un modo de disminuir el coste del sustrato, es difícil de dominar a gran escala.

- 35 La segunda vía se basa en enzimas transferidoras de sacáridos, capaces de transferir glucosa de un α -glucosilsacárido. Dichas enzimas se seleccionan de las hidrolasas α -glucosidasa (EC 3.2.1.20) y α -amilasa (EC 3.2.1.1), y de la transferasa ciclodextrin-glucanotransferasa (EC 2.4.1.19). Sus sustratos son amilosa, dextrinas, ciclodextrinas, maltooligosacáridos e hidrolizados parciales de almidón, que contienen todos ellos, principal o exclusivamente, residuos glucosilo enlazados unos a otros mediante un enlace α 1 \rightarrow 4 osídico. Según este método, la patente de EE.UU. 5.565.435 afirma que se obtiene α -glucosilquercetina. Se tiene que subrayar que las enzimas que degradan el almidón enlazan el residuo glucosilo al flavonoide mediante un enlace α -osídico, mientras que la UDP-glucosa:glucosiltransferasa investigada por LIM *et al.* enlaza el residuo glucosilo al flavonoide mediante un enlace β -osídico. Se tiene que subrayar también que, en las condiciones descritas en la patente de EE.UU. 5.565.435, la molécula de quercetina podría ser solubilizada ajustando el pH a 8,5 y manteniendo el medio de reacción a 60°C. La solubilización de fenólicos en medios alcalinos es debida a la formación de fenolatos; en estas condiciones de pH y temperatura, la estabilidad del sustrato se consiguió operando bajo condiciones anaeróbicas. Parece por tanto que este modo de preparación es sumamente difícil de controlar y manejar, y que sería valioso un modo simple de preparación.

- 45 La tercera vía implica glucosiltransferasas usando sacarosa (β -D-fructofuranosil- α -D-glucopiranosido) como donador de glucosilo y produciendo glucanos con la liberación de fructosa. Se han hecho varios intentos con esta clase de enzimas para intentar conseguir glicósidos de fenólicos. Primero, se demostró que la glucosiltransferasa de *Streptococcus sobrinus* (referenciada por los autores como cepa 6715, serotipo g) cataliza la síntesis de 4'-O- α -D-glucopiranosil-(+)-catequina en un medio estrictamente acuoso (catequina a 1 g/L en tampón fosfato 100 mM, pH 6,0, conteniendo sacarosa al 2%) (NAKAHARA K, KONTANI M, ONO H, KOMADA T, TANAKA T, OOSHIMA T, HAMADA S (1995) Glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus* catalyzes glucosylation of catechin. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(7): 2768-70). Se demostró que una enzima similar, la glucosiltransferasa-D de *Streptococcus mutans* GS-5, es menos regioselectiva, ya que cataliza no sólo la síntesis de 4'-O- α -D-glucopiranosil-(+)-catequina sino también la síntesis de 7-O- α -D-glucopiranosil-(+)-catequina y del derivado diglucosilado 4',7-O- α -D-glucopiranosil-(+)-catequina (MEULENBELD GH, ZUILHOF H, VAN VELDHUIZEN A, VAN DEN HEUVEL RHH, HARTMANS S (1999) Enhanced (+)-catechin transglucosylating activity of *Streptococcus mutans* GS-5 glucosyltransferase-D due to fructose removal. *Appl Environ Microbiol* 65(9): 4141-7). Aunque varias investigaciones con respecto a la especificidad de aceptor de la glucosiltransferasa de *Streptococcus mutans* GS-5 conducen a los

autores a inferir que los aceptores aromáticos parecen requerir dos grupos hidroxilo aromáticos adyacentes (MEULENBELD GH, HARTMANS S (2000) Transglycosilation by *Streptococcus mutans* GS-5 glucosyltransferase-D: acceptor specificity and engineering reaction conditions. Biotechnol Bioeng 70(4): 363-9), esta afirmación fue contradicha por la identificación de glucosilación en la posición 7 en la catequina (MEULENBELD et al., 1999) y por la síntesis de derivados distintos al pirocatecol. En efecto, la pinosilvina y el resveratrol, respectivamente 3,5-dihidroxi-*trans*-estilbeno y 3,4',5-trihidroxi-*trans*-estilbeno, fueron glucosilados por una preparación de glucosiltransferasa en bruto producida por *Streptococcus mutans* para formar respectivamente 3-O- α -D-glucopiranosil-(*E*)-pinosilvina y 3-O- α -D-glucopiranosil-(*E*)-resveratrol (SHIM H, HONG W, AHN Y (2003) Enzymatic preparation of phenolic glucosides by *Streptococcus mutans*. Bull Korean Chem Soc 24(11): 1680-2). Muy recientemente, se ha afirmado que los flavonoles quercetina y miricetina y la flavona luteolina podrían ser glucosilados por glucansacarasa especiales, a saber, la dextransacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F (sacarosa:1,6- α -D-glucano 6- α -D-glucosiltransferasa, EC 2.4.1.5) y la alternansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-23192 (sacarosa:1,6(1,3)- α -D-glucano 6(3)- α -D-glucosiltransferasa, EC 2.4.1.140) (BERTRAND A, MOREL S, LEFOULON F, ROLLAND Y, MONSAN P, REMAUD-SIMEON M (2006) *Leuconostoc mesenteroides* glucansucrase synthesis of flavonoid glucosides by acceptor reactions in aqueous-organic solvents. Carbohydr Res 341: 855-63). Convencionalmente, en presencia de sacarosa, la primera produce un glucano (dextrano) en el que el 95% de los enlaces glucosídicos son α -(1 \rightarrow 6) (cadena principal del polisacárido) y el 5% α -(1 \rightarrow 3) (puntos de ramificación), y la segunda un glucano (alternano) en el que los enlaces glucosídicos son alternativamente α -(1 \rightarrow 6) y α -(1 \rightarrow 3). Los derivados flavonoides obtenidos fueron: luteolin-3'-O- α -D-glucopiranosido, luteolin-4'-O- α -D-glucopiranosido, quercetin-3'-O- α -D-glucopiranosido, quercetin-4'-O- α -D-glucopiranosido, quercetin-3'-4'-O- α -D-digluco-piranosido, miricetin-3'-O- α -D-glucopiranosido y miricetin-4'-O- α -D-glucopiranosido. Este trabajo demuestra que los rendimientos de la síntesis de derivados glicosidos no sólo se basan en la propia enzima (la síntesis de luteolin-O-glicósidos cayó de 44% a 8% entre dextransacarasa y alternansacarasa), sino también en ligeras diferencias químicas entre dos aceptores (no se observó conversión con la dextransacarasa sobre diosmetina y diosmina).

A partir del significativo (aunque no exhaustivo) estado de la técnica anterior con respecto a las vías experimentadas para obtener derivados glucosilados de polifenoles en general (y flavonoides en particular) para vencer los principales inconvenientes convencionales de los flavonoides (escasa solubilidad en agua en condiciones fisiológicas, en particular a pH que oscila de 5 a 7 y 30°C, y alta sensibilidad a la autooxidación en estas condiciones biológicas), parece claro que no se pueden deducir pautas precisas para establecer la producción enzimática de un glicósido fenólico específico. Al contrario, se ve que no hay manera de que el experto en la técnica pueda predecir qué flavonoide puede ser glucosilado con qué enzima y en qué condiciones para obtener altas concentraciones de glicósido (véase el resumen en la Tabla 2). En efecto, aunque se han hecho intentos para establecer una relación entre las estructuras fenólicas y la posibilidad de su uso como aceptor de glicosilo por glicosiltransferasas, parece sin embargo que la obtención de fenólicos glicosilados depende en gran medida de la naturaleza de la sustancia fenólica y de la enzima usada para la reacción de condensación. Esto es particularmente cierto con glucosiltransferasas que sintetizan convencionalmente α -D-glucanos a partir de sacarosa (EC 2.4.1.5), para las que sólo un número muy pequeño de estructuras polifenólicas han sido reportadas con éxito. Además, en el caso de las principales glucosiltransferasas estudiadas, a saber, glucosiltransferasa-D de *S. mutans* GS-5 y dextransacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, se tiene que mencionar que la primera sintetiza un α -glucano soluble en agua de una manera estimulada y dependiente de cebador (HAMADA N, KURAMITSU HK (1989) Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* *gtfD* gene, coding for primer-dependant soluble glucan synthesis. Infect Immun 56: 1999-2005), mientras que la segunda no (ROBYT JF, WALSETH TF (1978) The mechanism of acceptor reactions of *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B 512F. Carbohydr Res 61: 433-45). Estas glucosiltransferasas tienen un mecanismo distinto de acción, y por consiguiente moléculas que son aceptoras para una enzima no son necesariamente aceptoras para la otra; en otras palabras, como se muestra en los trabajos citados anteriormente, no hay justificación para considerar que las sustancias que actúan como aceptor de glucosilo en el caso de la glucosiltransferasa D de *S. mutans* GS -5 actúen también como aceptor de glucosilo en el caso de la dextransacarasa de *L. mesenteroides* NRRL B-512F, y *vice versa*.

Más aún, la información de la técnica anterior muestra que, a pesar del interés y abundancia de fenólicos, se han obtenido pocos glicósidos de fenólicos por reacciones enzimáticas.

Tabla 2

POLIFENOL	ORIGEN DE LA ENZIMA	PRODUCTO(S) Y REFERENCIA
Enzimas y sustratos: Glicosiltransferasas capaces de transferir el resto de azúcar de un nucleótido de azúcar (p.ej., UDP-glucosa)		
Ácido cafeico (OH en 3 y 4)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cafeoil-3-O- β -glucósido - LIM <i>et al.</i> 2003
Ácidos o- y m- cumáricos (OH en 2 y 3, respectivamente)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	2-O y 3-O- β -glucósidos de ácidos o- y m- cumáricos - LIM <i>et al.</i> 2003

Ácido isoferúlico (OH en 3; OCH ₃ en 4)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3-O-β-glucósido - LIM <i>et al.</i> 2003
Ácido p-cumárico (OH en 4), ácido ferúlico (OH en 4 y OCH ₃ en 3) y ácido sinápico (OH en 4 y OCH ₃ en 3 y 5)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ningún glucósido - LIM <i>et al.</i> 2003
Quercetina (flavonol; OH en 3, 5, 7, 3' y 4')	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3-O-, 7-O-, 3'-O-, 4'-O-monoglucósidos y 3,7-di-O y 7,3'-di-O-glucósidos - LIM <i>et al.</i> 2003; LIM <i>et al.</i> 2004
Luteolina (flavona; OH en 5, 7, 3' y 4')	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Glucósidos - LIM <i>et al.</i> 2003
Eriodictiol (flavanona; OH en 5, 7, 3' y 4')	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ningún glucósido - LIM <i>et al.</i> 2003
Catequina (flavanol; OH en 3, 5, 7, 3' y 4') y cianidina (antociano; OH en 5, 7, 3', 4')	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ningún glucósido - LIM <i>et al.</i> 2003
Enzimas y sustratos: Enzimas degradantes del almidón (α-glucosidasa, ciclodextrina glucanotransferasa o CGTasa, α-amilasa) y almidón y/o hidrolizados de almidón		
Quercetina (flavonol; OH en 5, 7, 3' y 4')	α-glucosidasa: hígado de cerdo, semilla de alforfón, <i>Mucor</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Saccharomyces</i> CGTasa: <i>Bacillus</i> , <i>Klebsiella</i> α-amilasa: <i>Aspergillus</i>	α-glucosilquercetina (pat. de EE.UU. 5.565.435) (OH glucosilado no mencionado)
Enzimas y sustratos: Glicosiltransferasas capaces de transferir el resto de azúcar de la sacarosa		
Catequina (flavanol; OH en 3, 5, 7, 3' y 4')	<i>Streptococcus sobrinus</i>	4'-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina (NAKAHARA <i>et al.</i> 1995)
Resveratrol (OH en 3, 5, 4') y pinosilvina (OH en 3,5)	<i>Streptococcus mutans</i>	3-O-α-D-glucopiranosil-(E)-pinosilvina y 3-O-α-D-glucopiranosil-(E)-resveratrol (SHIM <i>et al.</i> 2003)
Catequina (flavanol; OH en 3, 5, 7, 3' y 4')	<i>Streptococcus mutans</i> GS-5 (glicosiltransferasa D)	4'-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina, 7-O-α-D-glucopiranosil-(+)-catequina y 4',7-O-α-D-diglucopiranosil-(+)-catequina (MEULENBELD <i>et al.</i> 1999)
Catecol (OH en 1 y 2), 3-metoxicatecol (OCH ₃ en 3), 3-metilcatecol (CH ₃ en 3), 4-metilcatecol (CH ₃ en 4)	<i>Streptococcus mutans</i> GS-5 (glicosiltransferasa D)	Glucósidos (MEULENBELD y HARTMANS, 2000)
Fenol, 3-hidroxifenol, alcohol bencílico, alcohol 2-hidroxibencílico, alcohol 2-metoxibencílico, 1-fenil-1,2-etanodiol	<i>Streptococcus mutans</i> GS-5 (glicosiltransferasa D)	Ningún glucósido (MEULENBELD y HARTMANS, 2000)
Quercetina (flavonol; OH en 3, 5, 7, 3' y 4'), luteolina (flavona; OH en 5, 7, 3' y 4'), miricetina (flavonol; OH en 3, 5, 7, 3', 4' y 5')	<i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F	Glucósidos (3' y 4' con luteolina y <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F) (BERTRAND <i>et al.</i> 2006)
Diosmetina (flavona; OH en 5 y 3'; OCH ₃ en 4')	<i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F	Ningún glucósido (BERTRAND <i>et al.</i> 2006)

Otro punto clave a considerar en la síntesis enzimática de glicósidos de fenólicos es la posibilidad de crear derivados de fenólicos que permitan recuperar los fenólicos iniciales mediante una reacción de hidrólisis en condiciones suaves.

5 En efecto, para un polifenol dado, las propiedades ventajosas que se conocen en el presente corresponden a una estructura específica, y se tiene que demostrar por tanto que el derivado valioso, con propiedades de solubilidad en agua y estabilidad aumentadas, puede ser convertido en la parte sacárida por un lado y la parte aglicona por otro lado. MISHRA *et al.* dan un ejemplo de disminución de la actividad antioxidante debido a glicosilación (MISHRA B, PRIYADARSINI KI, KUMAR MS, UNNIKRISHNAN MK, MOHAN H (2003) Effect of O-glycosylation on the antioxidant activity and free radical reactions of a plant flavonoid, chrysoeriol. *Bioorg Med Chem* 11:2677-85). El crisoeeriol y su glicósido (crisoeeriol-6-O_G-acetil-4'-β-D-glucósido) son dos flavonoides extraídos de la planta tropical *Coronopus didymus*; el crisoeeriol muestra mejor efecto protector que el glicósido cuando se ensaya su capacidad de inhibir la peroxidación de lípidos inducida por radiación gamma, Fe (III) y Fe (II). Hasta la fecha, esta reversibilidad es conocida sólo para la α-glucosilqueretina obtenida con enzimas degradantes del almidón *in vitro* (patente de EE.UU. 5.565.435). Por tanto, si la funcionalización de fenólicos como derivados glicosídicos es una manera (i) de facilitar su formulación en cosméticos, productos farmacéuticos o cualquier otra preparación hecha por el hombre debido a una solubilidad en agua más alta que la de la aglicona, y (ii) de aumentar la estabilidad de estos fenólicos en dichas fórmulas, siendo ambas ellas propiedades universales de las formas glucosiladas de los polifenoles, estos derivados glicosídicos deben ser hidrolizables en condiciones biológicas.

Hay por lo tanto una necesidad de crear:

- 20 - nuevos derivados de compuestos fenólicos valiosos con solubilidad en agua (en las mismas condiciones fisico-químicas (pH, salinidad, temperatura...)) y estabilidad aumentadas; y/o,
- nuevos derivados de compuestos fenólicos valiosos que puedan ser convertidos fácilmente en su precursor, glucosa y sustancia fenólica, en el lugar donde tienen que ejercer su actividad biológica y no durante su almacenamiento en una fórmula comercial; y/o,
- 25 - nuevos derivados de compuestos fenólicos valiosos que se puedan obtener mediante un procedimiento en el que las etapas de síntesis y purificación se puedan llevar a cabo de una manera reproducible y en cualquier escala dependiente de la demanda del mercado.

Debido al hecho de que la estructura del pirocatecol (presencia de dos grupos hidroxilo vecinos) es reconocida como particularmente importante para la actividad eliminadora de los polifenoles, los compuestos fenólicos que parecen particularmente eficaces son los que contienen una estructura de catecol; entre los compuestos fenólicos que son de particular interés, están los siguientes compuestos:

- ácido protocatecuico (ácido 3,4-dihidroxibenzoico, Figura 2) y sus derivados ésteres; y/o,
- ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico, Figura 3) y sus derivados ésteres, especialmente ácido rosmarínico (éster (R)-1-carboxi-2-(3,4-dihidroxifenil)etílico del ácido 3,4-dihidroxicinámico), ácido clorogénico (ácido 3-O-(3,4-dihidroxicinamoil)-D-quinico), ácido chicórico, equinacósido, verbascósido y éster fenetílico del ácido cafeico, y su forma reducida ácido hidrocafeico y sus derivados ésteres; y/o,
- 35 - estructuras especiales no estrechamente relacionadas con el ácido protocatecuico ni el ácido cafeico y que contienen el anillo de pirocatecol: ácido 3,4-dihidroximandélico (Figura 4) y su sustancia relacionada ácido 3,4-dihidroxifenilacético y 3,4-dihidroxifenilglicol con una cadena principal C2-C6, y esculetina (6,7-dihidroxicumarina, Figura 5) con una cadena principal C6-C3; y/o,
- 40 - las flavanonas taxifolina (3,5,7,3',4'-pentahidroxiflavanona, Figura 6), fustina (3,7,3',4'-tetrahidroxiflavanona), eriodictiol (5,7,3',4'-tetrahidroxiflavanona); y/o,
- los flavonoles fisetina (3,7,3',4'-tetrahidroxiflavona) y ramnetina (3,5,3',4'-tetrahidroxi-7-metoxiflavona); y/o,
- las flavonas cirsililol y 3',4',7-trihidroxiflavona y la isoflavona 3'-hidroxidaidzeina.

45 Se incluye a continuación información más detallada sobre estos fenólicos de interés.

50 Ácido protocatecuico (también llamado ácido 3,4-dihidroxibenzoico, o (ácido 3,4-dihidroxibenzoico)) se encuentra en muchas plantas comestibles y medicinales, aunque la mayoría de las veces en concentraciones más bajas que los derivados del ácido cinámico. Aunque ligeramente menos potente que el ácido cafeico, el ácido protocatecuico mostró un efecto inhibitorio dependiente del tiempo y dependiente de la dosis sobre el crecimiento de células de cáncer de mama humano T47D. También se demostró que el ácido protocatecuico y el ácido cafeico interactúan directamente con el receptor arilhidrocarbonado, inhiben la óxido nítrico sintasa y tiene un efecto pro-apoptótico (KAMPA M, ALEXAKI VI, NOTAS G, NIFLI AP, NISTIKAKI A, HATZOGLOU A, BAKOGEORGOU E, KOUIMTZOGLOU E, BLEKAS G, BOSKOU D, GRAVANIS A, CASTANAS E (2004) Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells; potential mechanisms of action. *Breast*

Cancer Res 6: R63-R74). LIU *et al.* (LIU KS, TSAO SM, YIN MC (2005) *In vitro* antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. *Phytother Res* 19(11): 942-5) demostraron *in vitro* un efecto inhibitorio del ácido protocatecuico sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* resistentes a la meticilina. Los datos de la zona de inhibición y los valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) mostraron que el ácido protocatecuico inhibió eficazmente el crecimiento de todos los patógenos bacterianos ensayados. Estudios recientes indican que se podría usar el ácido protocatecuico como agente protector contra enfermedades cardiovasculares y neoplasmas (SZUMILO J. (2005), *Postepy Hig Med Dosw* (Online) 59: 608-15). El mecanismo de su acción está asociado principalmente con la actividad antioxidante, incluyendo la inhibición de la generación así como la eliminación de radicales libres y regulación en ascenso de enzimas que participan en su neutralización.

También se demostró que el ácido protocatecuico es un posible agente quimiopreventivo para la carcinogénesis del colon mediante la supresión de la manifestación de biomarcadores intermedios inducidos por carcinogénesis de colon inducida por azoximetano (AOM) en ratas (TANAKA T, KOJIMA T, SUZUI M, MORI H (1993) *Chemoprevention of colon carcinogenesis by the natural product of a simple phenolic compound protocatechuic acid: suppressing effects on tumor development and biomarkers expression of colon tumorigenesis. Cancer Res. Sep 1; 53(17): 3908-13*). El ácido protocatecuico es también por lo tanto un valioso compuesto fenólico activo, pero su biodisponibilidad se debe incrementar mediante funcionalización para obtener derivados más solubles en agua.

Ácido cafeico (también llamado ácido 3,4-dihidroxicinámico), un derivado del ácido *trans*-cinámico (ácido *trans*-3-fenilacrílico) contiene un grupo -CH=CH-COOH que asegura mayor capacidad donadora de H y la posterior estabilización de radicales que el grupo carboxilato en los ácidos benzoicos (RICE-EVANS CA, MILLER NJ, PAGANDA G (1996) *Structure - antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med* 20(7): 933-56). Además de sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud humana (los ácidos cafeico y 3-metoxicafeico o ferúlico reaccionan con el nitrito *in vitro* e inhiben la formación de nitrosaminas *in vivo*; también inhiben la nitración de tirosina mediada por peroxinitrito), el ácido cafeico demostró recientemente ser eficaz en proteger la piel humana del eritema inducido por UVB (SVOBODOVA A, PSOTOVA J, WALTEROVA D (2003) *Natural Phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. Biomed Papers* 147: 137-145). El ácido cafeico se encuentra frecuentemente en la forma de derivados, con 1-carboxi-2-(3,4-dihidroxifenil)-etanol para formar ácido rosmarínico, con ácido quínico para formar ácido clorogénico y con feniletanol para formar éster fenético del ácido cafeico.

Ácido rosmarínico (también llamado ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-[3-(3,4-dihidroxifenil)prop-2-enoiloxi]propanoico) se encuentra en la familia de plantas *Lamiaceae*, que incluye albahaca, salvia, menta, romero y hoja de perilla (AL SEREITI MR, ABU-KAMER KM, SEN P (1999) *Pharmacology of rosemary and its therapeutic potentials. Indian J. Exp Biol* 37(2): 124-30). Se ha demostrado que la suplementación oral con hojas de perilla o extractos de ácido rosmarínico suprime reacciones alérgicas en ratones y, más recientemente, en humanos (MAKINO T, FURUTA A, FUJII H, NAKAGAWA T, WAKUSHIMA H, SAITO K, KANO Y (2001) *Biol Pharm Bull* 24(10): 1206-9 – TAKAKANO H, OSAKABE N, SANBONGI C, YANAKASIWA R, INOUE KI, YASUDA A, NATSUME M, BABA S, ICHIISHI EI, YOSHIKAWA T (2004) *Extract of Perilla frutescens enriched for rosmarinic acid inhibits seasonal allergic rhinoconjunctivitis in humans. Exp Biol Med* 229(3): 247-54). El ácido rosmarínico alivia los síntomas de alergia impidiendo la activación de células con respuesta inmune e induciendo la apoptosis, o suicidio celular, en células con respuesta inmune ya activadas (HUR YG, YUN Y, WON J (2004) *Rosmarinic acid induces p56lck-dependent apoptosis in jurkat and peripheral T cells via mitochondrial pathway independent from fas/fas ligand interaction. J Immunol* 172(1): 79-87). También se ha demostrado que el ácido rosmarínico mata linfocitos T y neutrófilos activados por alergia durante reacciones alérgicas sin afectar a los linfocitos T o los neutrófilos en su estado de reposo (SANBONGI C, TAKANO H, OSAKABE N (2003) *Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. Free Radic Biol Med* 34(8): 1060-9).

El ácido rosmarínico fue el primero que demostró reducir reacciones alérgicas en ratones usando la reacción de anafilaxis cutánea pasiva en la oreja del ratón (MAKINO T, FURATA Y, WAKUSHIMA H, FUJII H, SAITO K, KANO Y (2003) *Anti-allergic effect of Perilla frutescens and its active constituents. Phytother Res* 17(3): 240-3). Un estudio demostró que el ácido rosmarínico inhibió la activación del promotor IL-2 de los linfocitos T en un cribado a gran escala de extractos de plantas (WON J, HUR YG, HUR EM, PARK SH, KANG MA, CHOI Y, PARK C, LEE KH, YUN Y (2003), *Rosmarinic acid inhibits TCR-induced T cell activation and proliferation in a Lck-dependent manner. Eur J Immunol* 33(4): 870-9). Otro estudio demostró que el ácido rosmarínico, inhibiendo tanto la activación como la proliferación de los linfocitos T, tuvo potentes efectos inmunosupresores cuando se combinó con rapamicina, un fármaco anti-rechazo (YUN SY, HUR YG, KANG MA, LEE J, AHN C, WON J (2003) *Synergistic immunosuppressive effects of rosmarinic acid and rapamycin in vitro and in vivo. Transplantation* 75(10): 1758-60).

Ácido clorogénico (también llamado 3-(3,4-dihidroxicinamato) del ácido 1,3,4,5-tetrahidroxiciclohexanocarboxílico) es el fenólico soluble principal en especies solanáceas tales como patata, tomate, y berenjena. También se acumula en niveles sustanciales en manzanas, peras, ciruelas y café. SAWA *et al.* (SAWA T, NAKAO M, AKAIKE T, ONO K, MAEDA H (1999) *Alkylperoxyl radical-scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor prompted effect of vegetables. J Agric Food Chem* 47: 397-402) observaron que retira especies reactivas particularmente tóxicas eliminando los radicales alquilperoxilo, y puede prevenir la carcinogénesis reduciendo el daño en el ADN que causan.

Éster fenético del ácido cafeico (CAPE) es uno de los componentes principales del própolis de abeja, el material resinoso de color oscuro que es recogido por las abejas en los capullos de plantas vivas mezclado con cera de abejas y secreciones salivares. El CAPE es un potente y específico inhibidor de la activación de miembros de la familia de factores de transcripción NF- κ B, y esto puede proporcionar la base molecular para sus múltiples actividades inmunomodulatorias y antiinflamatorias (NATARAJAN K, SINGH S, BURKE TR, GRUNBERGER D, AGGARWAL BB (1996) Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- κ B. Proc Natl Acad Sci USA 93: 9090-5). Más recientemente, fue probado el papel del CAPE como potente agente antimetastásico que puede inhibir notablemente la capacidad metastásica e invasiva de las células malignas (HWANG HJ, PARK HJ, CHUNG HJ, MIN HY, PARK EJ, HONG JY, LEE SK (2006) Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on cancer cell metastasis mediated by the down-regulation of matrix metalloproteinase expression in human HT1080 fibrosarcoma cells. J Nutri Biochem 17: 356-62).

Esculetina (o aesculetina, también llamada 6,7-dihidroxycumarina), un miembro de la familia de los fenólicos C6-C3, tiene una estructura de cumarina que se deriva del ácido *trans*-cinámico por orto-hidroxilación (hay que recordar que el ácido cafeico es el ácido 3,4-dihidroxicinámico), isomerización *trans-cis* del doble enlace de la cadena lateral y lactonización. Mientras que la forma *trans* es estable y no puede ciclarse, la forma *cis* es muy inestable y la ciclación es por tanto favorecida. La glucosa es un buen grupo saliente que ayuda en la transformación *cis-trans*. Una enzima específica encontrada en *Melilotus alba* (*Leguminosae*) hidroliza específicamente el glucósido *cis* (β -glucosidasa). Algunas de sus propiedades son la inhibición de la proliferación celular mediada por Ras y la atenuación de la restenosis vascular después de angioplastia en ratas (PAN SL, HUANG YW, GUH JH, CHANG YL, PENG CY, TENG CM (2003). Esculetin inhibits Ras-mediated cell proliferation and attenuates vascular restenosis following angioplasty in rats. Biochem Pharmacol 65: 1897-1905) y la inhibición de la tirosinasa de champiñón (MASAMOTO Y, ANDO H, MURATA Y, SHOMOISHI Y, TADA M, TAKAHATA K (2003) Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculetin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. Biosci Biotechnol Biochem 67(3): 631-4). Se tiene que mencionar que la esculetina se encuentra frecuentemente como glucósido, esculina (esculetin-6- β -D-glucopiranosido), con un enlace β -glucosídico en la posición 6. Los miembros de fenólicos C6-C2 se encuentran básicamente en el metabolismo de la catecolamina, y las sustancias 3,4-dihidroxifenólicas relacionadas podrían tener propiedades interesantes (EISENHOFER G, KOPIN IJ, GOLDSTEIN DS (2004) catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. Pharmacol Rev 56(3): 331-49).

Taxifolina (o dihidroquercetina, o 3,5,7,3',4'-pentahidroxi-flavanona, o (2R,3S)-2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxicroman-4-ona) aparece en diversas cortezas (*Larix sibirica* Lebed, *Pinus pinaster ssp atlantica*) y en las semillas de *Silybum marinum* (usadas para la preparación del complejo de silimarina y que contiene flavonolignanos de silimarina que son formados biogénicamente por adición oxidativa de alcohol coniferílico a la taxifolina). Tiene un enlace quiral entre el ciclo B y los dos otros ciclos. Relacionada con el grupo de la vitamina PP, posee un amplio espectro de actividades biológicas (MIDDLETON E, KANDASWAMI C, THEOHARIDES TC (2000) The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. Pharmacol Rev 52(4): 673-752). Muestra acción protectora de los capilares, antiinflamatoria y gastroprotectora, disminuye los espasmos de los músculos lisos del intestino, aumenta las funciones del hígado, y posee actividad protectora anti-radiación. La taxifolina también ha mostrado tener aplicaciones potenciales en la reducción de la inflamación de la piel (BITO T, ROY S, SEN CK, SHIRAKAWA T, GOTOH A, UEDA M, ICHIHASHI M, PACKER L (2002) Flavonoids differentially regulate IFN-gamma-induced ICAM-1 expression in human keratinocytes: molecular mechanisms of action. FEBS Lett. 520(1-3): 145-52). Sin embargo, la taxifolina es escasamente soluble en disolución acuosa (alrededor de 1 g/l), lo que impide su utilización para algunas aplicaciones cosméticas y terapéuticas.

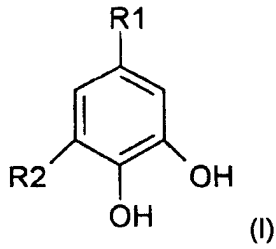
Siendo reconocido que la glicosilación hace a los polifenoles, en células vegetales así como *in vitro*, más solubles en agua y menos reactivos hacia los radicales libres, si existen glucósidos de estos fenólicos de particular interés, entonces podrían representar derivados polifenólicos con solubilidad en agua y estabilidad aumentadas, y por tanto con un valor añadido aumentado.

También sería útil obtener derivados de estos fenólicos que puedan ser convertidos durante su uso final en la estructura fenólica inicial metabolizable. Este objetivo puede ser conseguido por medio de la presente invención.

Compendio de la invención

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones, y cualquier información que no caiga dentro de las reivindicaciones se proporciona para información solamente.

La presente invención se refiere a un método para producir un O- α -glucósido fenólico que comprende incubar sacarosa y una glucansacarasa de *Leuconostoc species*, preferiblemente de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, preferiblemente en agua tamponada a un pH conveniente para la actividad enzimática (bien conocido por un experto) o en un agua tamponada a un pH conveniente para la mezcla actividad enzimática-codisolvente, con un compuesto fenólico que tiene la siguiente fórmula:

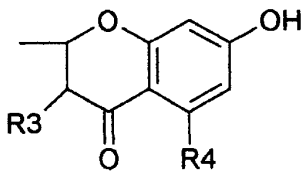


en la que:

R2 es O o OH; y

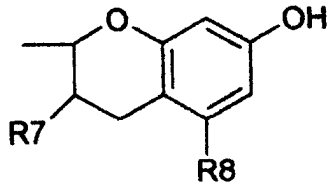
R1 se selecciona del grupo que consiste en

5 -



en donde R3 y R4, independientemente, son H o OH, a condición de que al menos uno entre R3 y R4 representa OH; y,

-



10

en donde R7 se selecciona del grupo que consiste en H, -OH o -OCOR, y R8 es H o OH, a condición de que al menos uno entre R7 y R8 representa OH;

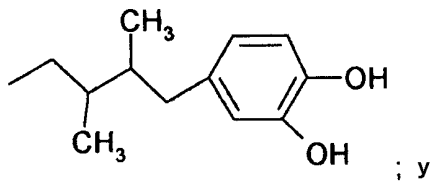
- $-(CH_2)_n-COOR$ o $-(CH_2)_n-CONHR$, siendo n un número entero de 0 a 2;

15 - $-(CR_{12}=CH)-COOR$ o $-(CR_{12}=CH)-CONHR$, siendo R12 H o alquilo o alqueno C_1-C_6 lineal, ramificado o cíclico, preferiblemente metilo, etilo, propilo, ciclohexilo o fenilo, más preferiblemente metilo o fenilo;

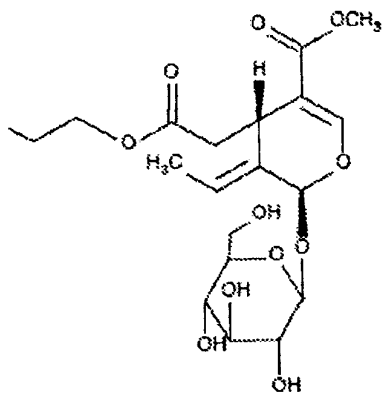
- $-(CH_2)_n-COR$ o $-(CH=CH)_n-COR$, siendo n un número entero de 0 a 2;

- H;

-



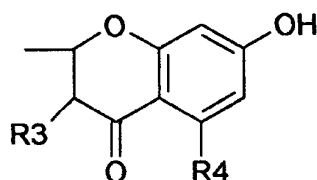
20 -



en donde R es H o un grupo hidrocarbonado C_1-C_{10} lineal, ramificado o cíclico, aromático o no, saturado o insaturado, opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo, en donde dicho grupo hidrocarbonado comprende un alquilo, un alqueno o un alquino, preferiblemente un alquilo o un alqueno, que puede estar sustituido por uno o varios sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en: un arilo (C_5-C_9), un heterociclo (C_4-C_9), un alcoxi (C_1-C_3), un acilo (C_2-C_3), un alcohol (C_1-C_3), un grupo carboxílico ($-COOH$), un éster (C_2-C_3), una amina (C_1-C_3), un grupo amino ($-NH_2$), una amida ($-CONH_2$), una imina (C_1-C_3), un nitrilo, un hidroxilo ($-OH$), un grupo aldehído ($-CHO$), un halógeno, un halogenoalquilo (C_1-C_3), un tiol ($-SH$), un tioalquilo (C_1-C_3), una sulfona (C_1-C_3), un sulfóxido (C_1-C_3), y una combinación de los mismos.

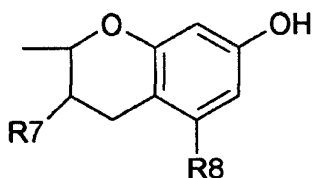
- 10 Preferiblemente, el agua tamponada a un pH conveniente para la actividad enzimática usada bien sin codisolvente o bien en una mezcla con un codisolvente consiste en tampón acetato de sodio o potasio a una concentración que oscila de 20 a 500 mM en agua, pero se puede usar cualquier otra sustancia amortiguadora sin ningún efecto negativo sobre la actividad enzimática. Preferiblemente, el agua tamponada a un pH conveniente para la mezcla actividad enzimática-codisolvente consiste en una mezcla de agua, preferiblemente un agua tamponada como se describió anteriormente, y dimetilsulfóxido (DMSO) con una relación menor que 35% de DMSO (volumen/volumen),
- 15 preferiblemente entre 15-25%, más preferiblemente aproximadamente 15%.

En una primera realización, R1 del compuesto fenólico es



- 20 en donde R3 y R4, independientemente, son H o OH, a condición de que al menos uno entre R3 y R4 representa OH. En particular, el compuesto fenólico se puede seleccionar del grupo que consiste en la taxifolina, el eriodictiol, la dihidrobinetina y la fustina.

En una segunda realización, R1 del compuesto fenólico es



- 25 en donde R7 se selecciona del grupo que consiste en H, $-OH$ o $-OCOR$, y R8 es H o OH, a condición de que al menos uno entre R7 y R8 representa OH. En particular, el compuesto fenólico se puede seleccionar del grupo que consiste en la catequina, la epicatequina, el galato de catequina, el galato de epicatequina, la galocatequina, la epigalocatequina, el galato de galocatequina y el galato de epigalocatequina.

- 30 En una tercera realización, R1 del compuesto fenólico es $-(CH_2)_n-COOR$ o $-(CH_2)_n-CONHR$, siendo n un número entero de 0 a 2. En particular, el compuesto fenólico se puede seleccionar del grupo que consiste en el ácido homoprotocatecuico, el ácido dihidrocafeico, el éster etílico del ácido protocatecuico, el galato de propilo, el ácido gálico, la hamamelitanina (2',5-di-O-galoil-hamamelosa) y el ácido protocatecuico.

En una cuarta realización, R1 del compuesto fenólico es $-(CR_{12}=CH)-COOR$ o $-(CR_{12}=CH)-CONHR$, siendo R12 H o un alquilo o alqueno C_1-C_6 lineal o cíclico, preferiblemente metilo, etilo, propilo, ciclohexilo o fenilo. En particular,

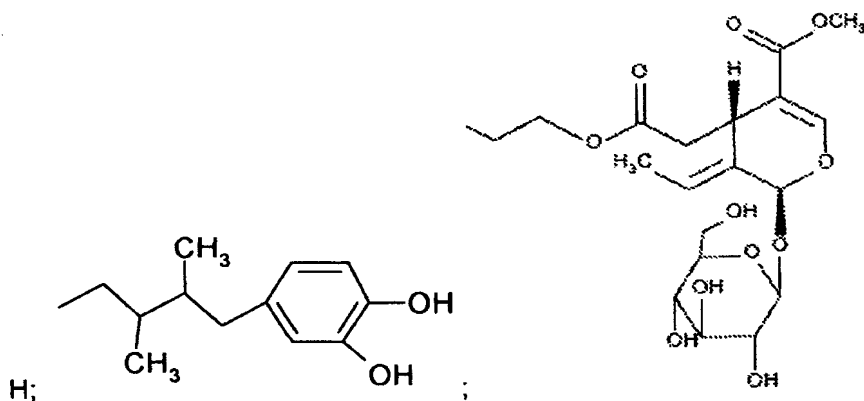
el compuesto fenólico se puede seleccionar del grupo que consiste en el ácido cafeico, el ácido rosmarínico, la esculetina, la 4-metilesculetina, la nordalbergina (6,7-dihidroxifenilcumarina), el ácido clorogénico, el éster fenético del ácido cafeico, el ácido chicórico (ácido dicafeoiltartárico), el equinacósido (O-6-desoxi-alfa-L-manopiranosil-(1→3)-O-(beta-D-glucopiranosil-(1→6))-, 4-(3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoato de 2-(3,4-dihidroxifenil)etilo), beta-D-glucopiranosido) y el verbascósido.

5

En una quinta realización, R1 del compuesto fenólico es $-(CH_2)_n-COR$ o $-(CH=CH)_n-COR$, siendo n un número entero de 0 a 2. En particular, el compuesto fenólico se puede seleccionar del grupo que consiste en la maclurina, el 3,4-dihidroxibenzaldehído, la 3,4-dihidroxibenzofenona, la buteína (2',3,4,4'-tetrahidroxichalcona), la 3,4-dihidroxiaceto fenona, la mareína (2',3,3',4,4'-pentahidroxi-4'-glucosilchalcona) y la eriodictiolchalcona (2',4',6',3,4-pentahidroxichalcona).

10

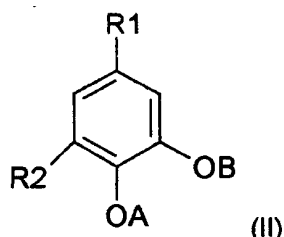
En una sexta realización, R1 del compuesto fenólico se selecciona del grupo que consiste en



En particular, el compuesto fenólico se puede seleccionar del grupo que consiste en el pirocatecol, el ácido nordihidroguaiarético, y la oleuropeína, respectivamente.

15

La presente invención también se refiere a los O- α -glucósidos fenólicos obtenibles por el método de la invención. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un O- α -glucósido fenólico que tiene la siguiente fórmula:



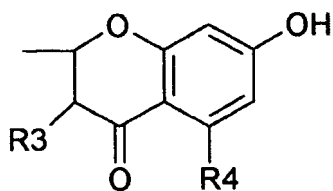
en la que

A y B, idénticos o diferentes, son H o un residuo $-\alpha$ -glucosilo, a condición de que al menos uno de A y B es un residuo $-\alpha$ -glucosilo;

R2 es H o OH; y,

R1 se selecciona del grupo que consiste en

-

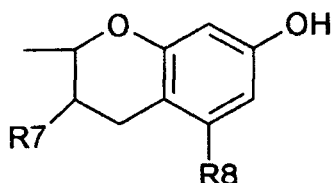


25

en donde R3 y R4, independientemente, son H o OH, a condición de que al menos uno entre R3 y R4 representa

OH; y,

-

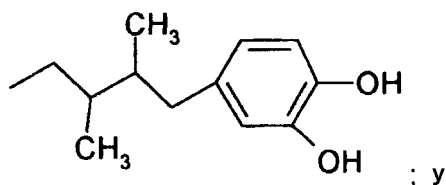


5 en donde R7 se selecciona del grupo que consiste en H, -OH o -OCOR, y R8 es H o OH, a condición de que, cuando R2 es H, R7 y R8 no son ambos OH, y al menos uno entre R7 y R8 es OH;

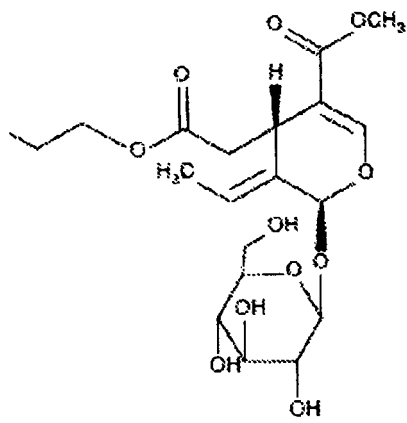
- $-(CH_2)_n-COOR$ o $-(CH_2)_n-CONHR$, siendo n un número entero de 0 a 2;
- $-(CR_{12}=CH)-COOR$ o $-(CR_{12}=CH)-CONHR$, siendo R12 H o un alquilo o alquenilo C₁-C₆ lineal, ramificado o cíclico, preferiblemente metilo, etilo, propilo, ciclohexilo o fenilo, más preferiblemente metilo o fenilo;
- $-(CH_2)_n-COR$ o $-(CH=CH)_n-COR$, siendo n un número entero de 0 a 2;

10 - H;

-



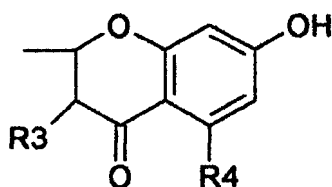
-



15 en donde R es H o un grupo hidrocarbonado C₁-C₁₀ lineal, ramificado o cíclico, aromático o no, saturado o insaturado, opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo, en donde dicho grupo hidrocarbonado comprende un alquilo, un alquenilo o un alquinilo, preferiblemente un alquilo o un alquenilo, que puede estar sustituido por uno o varios sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en: un arilo (C₅-C₉), un heterociclo (C₄-C₉), un alcoxi (C₁-C₃), un acilo (C₂-C₃), un alcohol (C₁-C₃), un grupo carboxílico (-COOH), un éster (C₂-C₃), una amina (C₁-C₃), un grupo amino (-NH₂), una amida (-CONH₂), una imina (C₁-C₃), un nitrilo, un hidroxilo (-OH), un grupo aldehído (-CHO), un halógeno, un halogenoalquilo (C₁-C₃), un tiol (-SH), un tioalquilo (C₁-C₃), una sulfona (C₁-C₃), un sulfóxido (C₁-C₃), y una combinación de los mismos.

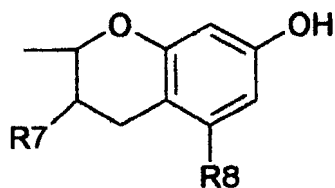
20

Un primer O- α -glucósido fenólico preferido de la fórmula (II) tiene R1 que es



y preferiblemente el O- α -glucósido fenólico se selecciona del grupo que consiste en el O- α -glucósido de taxifolina, el O- α -glucósido de eriodictiol, el O- α -glucósido de dihidrorobinetina y el O- α -glucósido de fustina.

Un segundo O- α -glucósido fenólico preferido de la fórmula (II) tiene R1 que es



5

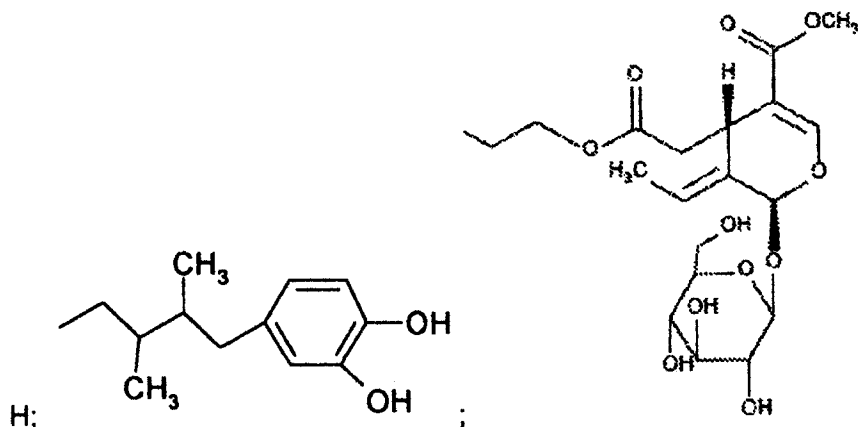
y preferiblemente el O- α -glucósido fenólico se selecciona del grupo que consiste en el O- α -glucósido de galato de catequina, el O- α -glucósido de galato de epicatequina, el O- α -glucósido de galocatequina, el O- α -glucósido de epigalocatequina, el O- α -glucósido de galato de galocatequina y el O- α -glucósido de galato de epigalocatequina.

10 Un tercer O- α -glucósido fenólico preferido de la fórmula (II) tiene R1 que es $-(CH_2)_n-COOR$ o $-(CH_2)_n-CONHR$, siendo n un número entero de 0 a 2, y preferiblemente el O- α -glucósido fenólico se selecciona del grupo que consiste en el O- α -glucósido de ácido homoprotocatecuico, el O- α -glucósido de ácido dihidrocafeico, el O- α -glucósido del éster etílico del ácido protocatecuico, el O- α -glucósido de galato de propilo, el O- α -glucósido de ácido gálico, el O- α -glucósido de hamamelitanina y el O- α -glucósido de ácido protocatecuico.

15 Un cuarto O- α -glucósido fenólico preferido de la fórmula (II) tiene R1 que es $-(CR_{12}=CH)-COOR$ o $-(CR_{12}=CH)-CONHR$, siendo R12 H o un alquilo o alqueno C₁-C₆ lineal o cíclico, preferiblemente metilo, etilo, propilo, ciclohexilo o fenilo, y preferiblemente el O- α -glucósido del compuesto fenólico se selecciona del grupo que consiste en el O- α -glucósido de ácido cafeico, el O- α -glucósido de ácido rosmarínico, el O- α -glucósido de esculetina, el O- α -glucósido de 4-metilesculetina, el O- α -glucósido de nordalbergina (6,7-dihidroxiifenilcumarina), el O- α -glucósido de ácido clorogénico, el O- α -glucósido del éster fenílico del ácido cafeico, el O- α -glucósido de ácido chicórico (ácido dicafeoiltartárico), el O- α -glucósido de equinacósido (2-(3,4-dihidroxiifenil)etil O-6-desoxi-alfa-L-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O-(beta-D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6))), 4-(3-(3,4-dihidroxiifenil)-2-propenoato), el O- α -glucósido de beta-D-glucopiranosido y el O- α -glucósido de verbascósido.

25 Un quinto O- α -glucósido fenólico preferido de la fórmula (II) tiene R1 que es $-(CH_2)_n-COR$ o $-(CH=CH)_n-COR$, siendo n un número entero de 0 a 2, y preferiblemente el O- α -glucósido del compuesto fenólico se selecciona del grupo que consiste en el O- α -glucósido de maclurina, el O- α -glucósido de 3,4-dihidroxibenzaldehído, el O- α -glucósido de 3,4-dihidroxibenzofenona, el O- α -glucósido de buteina (2',3,4,4'-tetrahidroxichalcona), el O- α -glucósido de 3,4-dihidroxiacetofenona, el O- α -glucósido de mareína (2',3,3',4,4'-pentahidroxi-4'-glucosilchalcona) y el O- α -glucósido de eriodictiolchalcona (2',4',6',3,4-pentahidroxichalcona).

Un sexto O- α -glucósido fenólico preferido de la fórmula (II) tiene R1 que se selecciona del grupo que consiste en



30

El O- α -glucósido fenólico se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en el O- α -glucósido de pirocatecol, el O- α -glucósido de ácido nordihidroguaiarético, y el O- α -glucósido de oleuropeína.

En una realización preferida, el O- α -glucósido fenólico de la presente invención tiene un residuo α -glucosilo que es un monómero de glucosa.

- 5 Preferiblemente, los O- α -glucósidos fenólicos de la presente invención tienen una solubilidad 20 veces más alta que la correspondiente aglicona en las mismas condiciones fisiológicas.

Los O- α -glucósidos fenólicos de la presente invención pueden ser escindidos por una enzima para liberar la correspondiente aglicona.

La presente invención se refiere además a O- α -glucósidos fenólicos de la presente invención como medicamentos.

- 10 La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica o cosmética que comprende un O- α -glucósido fenólico de la presente invención.

La presente invención se refiere también al uso de un O- α -glucósido fenólico de la presente invención para preparar una composición farmacéutica o cosmética para ser administrada por vía tópica, oral, rectal, nasal o vaginal, en donde enzimas emitidas por microorganismos asociados a la piel, boca, tracto intestinal, sistema respiratorio superior o tracto genital femenino liberan la correspondiente aglicona.

- 15 La presente invención se refiere también al uso de un O- α -glucósido fenólico de la presente invención para preparar una composición farmacéutica o cosmética para tratar o prevenir un cáncer, una enfermedad cardiovascular, una infección bacteriana, un eritema inducido por UVB, una alergia, un trastorno inflamatorio o inmunitario.

Breve descripción de los dibujos

- 20 **Figura 1** - Flavonoides: estructura básica y numeración de átomos de carbono.

Figura 2 - Ácido protocatecuico.

Figura 3 - Ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico).

Figura 4 - Ácido 3,4-dihidroxi mandélico.

Figura 5 - Esculetina (6,7-dihydroxicumarina).

- 25 **Figura 6** - Taxifolina.

Figura 7 - Glucósido de derivados de ácido cafeico.

Figura 8 - Glucósido de ácido 3,4-dihydroxi benzoico y otros ácidos fenólicos.

Figura 9 - Glucósido de flavanol.

Figura 10 - Glucósido de flavanol, isoflavona, flavona y dihydroflavanol.

- 30 **Figura 11** - Glucósido de polifenol neutro.

Figura 12 - Cromatograma de HPLC del medio de reacción que contiene taxifolina como aceptor de glucósido (289 nm). Duración de la incubación: 0.

Figura 13 - Cromatograma de HPLC del medio de reacción que contiene taxifolina como aceptor de glucósido (289 nm). Duración de la incubación: 22 horas.

- 35 **Figura 14** - Espectro de masas de la sustancia eluida a alrededor de 8,13 minutos. Duración de la incubación: 22 horas.

Figura 15 - Espectro de UV de la sustancia eluida a alrededor de 8,13 minutos. Duración de la incubación: 22 horas.

Figura 16 - Espectro de masas de la sustancia eluida a alrededor de 6,15 minutos. Duración de la incubación: 22 horas.

- 40 **Figura 17** - Espectro de UV de la sustancia eluida a alrededor de 6,15 minutos. Duración de la incubación: 22 horas.

Figura 18 - Cromatograma de HPLC de una disolución acuosa de taxifolina y glucósido de taxifolina (289 nm). (elución con una concentración inicial de metanol de 10% - método 1).

Figura 19 - Cromatograma de HPLC de una preparación de glucósido de taxifolina altamente purificada (289 nm; método 2).

Figura 20 - Crecimiento microbiano en presencia o ausencia de glucósido de taxifolina (micro-flora de la piel humana).

Figura 21 - Evolución de las concentraciones de glucósido de taxifolina y taxifolina en presencia de microflora de piel humana.

- 5 Las estructuras mostradas en las figuras 7-11 se dan como ilustraciones. Otros isómeros de glucósido están también contemplados en la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

10 **Compuesto fenólico o fenólicos:** compuesto que posee un anillo aromático que lleva uno o más sustituyentes hidroxilo.

15 **Flavonoides:** compuestos polifenólicos que poseen 15 átomos de carbono, dos anillos de benceno unidos por una cadena de tres carbonos lineal que da un sistema C6-C3-C6. El primer anillo de benceno (anillo A) forma con un átomo de oxígeno y los tres átomos de carbono que unen los dos anillos de benceno una cadena principal de cromano (anillos A y C). La cadena principal de cromano lleva el segundo anillo aromático B en la posición 2, 3 o 4. En algunos casos, el anillo C heterocíclico de seis miembros aparece en una forma abierta isomérica o está reemplazado por un anillo de cinco miembros. Tanto el estado de oxidación del anillo C heterocíclico como la posición del anillo B son importantes en la clasificación de los flavonoides:

- antocianinas: el anillo C es un pirano que participa en una cadena principal de 3-hidroxicromeno sustituida en 2,
- 20 - sustancias catéquicas (flavanoles): el anillo C es un tetrahidropirano hidrogenado que participa en una cadena principal de 3-hidroxi- o 3,4-dihidroxicromano sustituida en 2 (catequina, epicatequina, galocatequina y epigalocatequina, que forman los taninos condensables),
- flavonas: el anillo C es una pirona sustituida en 2,
- flavonoles: el anillo C es una pirona hidroxilada en 3 y sustituida en 2,
- flavanonas: el anillo C es una dihidropirona sustituida en 2,
- 25 - dihidroflavonoles: el anillo C es una dihidropirona hidroxilada en 3 y sustituida en 2,
- isoflavonas: flavonas con la sustitución en 3 en lugar de 2,
- chalconas y dihidrochalconas: el anillo C está abierto y con un doble enlace C2C3 (chalconas) o no (dihidrochalconas),
- auronas: el anillo C es un anillo de cinco miembros.

30 **Enzima:** molécula de proteína que cataliza reacciones químicas sobre moléculas (llamadas sustratos) para obtener otras moléculas (llamadas productos). Se asigna a cada enzima un nombre recomendado, un nombre sistemático que remarca el tipo de reacción y un número de código de la Comisión de Enzimas (EC). Estos números de código, con prefijo EC, contienen cuatro elementos separados por puntos. El primer número muestra a cuál de las seis divisiones principales (clases) pertenece la enzima: oxidorreductasas (EC 1), transferasas (EC 2), hidrolasas (EC 3), liasas (EC 4), isomerasas (EC 5) y ligasas (EC 6). El segundo número indica la subclase, el tercero la sub-subclase y el cuarto es el número de serie de la enzima en su sub-subclase.

35 **Biodisponibilidad:** el grado al que, o velocidad a la que, una molécula u otra sustancia es absorbida o llega a estar disponible en el sitio de actividad fisiológica después de su administración o aplicación.

40 **Glucansacarasas:** nombre común de las glucosiltransferasas con el número EC 2.4.1.5 (véase en lo sucesivo; KRALJ S, VAN GEEL-SCHUTTEN GH, DONDORFF MMG, KIRSANOVS S, VAN DER MAAREL MJEC, DIJKHUIZEN L (2004) Glucan synthesis in the genus *Lactobacillus*: isolation and characterization of glucansucrase genes, enzymes and glucan products from six different strains. Microbiology 150: 3681-90).

45 **Glicosiltransferasa:** enzima que cataliza la transferencia de grupo(s) glicosilo de un compuesto (llamado donador) a otro (llamado aceptor). Las glicosiltransferasas se clasifican como transferasas, con el número EC 2.4. Las transferasas que transfieren hexosas (moléculas de carbohidratos que tienen seis átomos de carbono por molécula) están incluidas en la sub-subclase EC 2.4.1. Las transferasas que transfieren el resto glucosa de la sacarosa a un aceptor son EC 2.4.1.4 (sacarosa: 1,4- α -D-glucan 4- α -D-glucosiltransferasa; nombre recomendado: amilosacarosa). EC 2.4.1.5 (sacarosa: 1,6- α -D-glucan 6- α -D-glucosiltransferasa; nombre recomendado: dextran-sacarosa), EC 2.4.1.7 (sacarosa: ortofosfato α -D-glucosiltransferasa; nombre recomendado: sacarosa fosforilasa).

50 **Glicona:** parte química de un derivado glicosídico que pertenece a la familia de los carbohidratos. Si el grupo

glicona es glucosa, entonces la molécula es un glicósido; si es fructosa, entonces la molécula es un fructósido; si es ácido glucurónico, entonces la molécula es un glucurónido.

- 5 **Enlace glicosídico:** enlace químico entre una glicona y otra glicona o una aglicona. Dependiendo de si el enlace glicosídico está “por debajo” o “por encima” del plano de la molécula de carbohidrato cíclica cuando se considera la proyección de HAWORTH, los glicósidos se clasifican como α -glicósidos y β -glicósidos.

Aglicona: parte química de un derivado glicosídico que no es la glicona.

Donde se usa “que comprende”, esto puede ser reemplazado preferiblemente por “que consiste esencialmente en”, más preferiblemente “que consiste en”.

- 10 En el contexto de la presente invención, el término “alquilo” significa más específicamente un grupo tal como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *terc*-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, octilo, nonilo, decilo, undecilo, dodecilo, tridecilo, tetradecilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, nonadecilo, eicosilo, heneicosilo, docosilo y las otras formas isoméricas de los mismos. Alquilo (C_1 - C_6) significa más específicamente metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *terc*-butilo, pentilo, hexilo y las otras formas isoméricas de los mismos. Alquilo (C_1 - C_3) significa más específicamente metilo, etilo, propilo o isopropilo.

- 15 El término “alqueno” se refiere a un grupo alquilo definido anteriormente que tiene al menos un enlace de etileno insaturado, y el término “alquino” se refiere a un grupo alquilo definido anteriormente que tiene al menos un enlace de acetileno insaturado. Alqueno (C_2 - C_3) incluye un etenilo, un propenilo (1-propenilo o 2-propenilo).

Los grupos “arilo” son hidrocarburos aromáticos mono-, bi- o tricíclicos que tienen de 5 a 9 átomos de carbono. Los ejemplos incluyen un fenilo, en particular.

- 20 Los grupos “heterociclo” son grupos que contienen 1 a 3 anillos que comprenden uno o más heteroátomos, preferiblemente 1 a 5 heteroátomos endocíclicos. Pueden ser mono-, bi- o tricíclicos. Pueden ser aromáticos o no. Los ejemplos de heterociclos aromáticos incluyen grupos piridina, piridazina, pirimidina, pirazina, furano, tiofeno, pirrol, oxazol, tiazol, isotiazol, imidazol, pirazol, oxadiazol, triazol, tiadiazol y triazina. Los ejemplos de biciclos incluyen en particular grupos quinolina, isoquinolina y quinazolina (para dos anillos de 6 miembros) e indol, bencimidazol, benzoxazol, benzotiazol e indazol (para un anillo de 6 miembros y un anillo de 5 miembros). Los heterociclos no aromáticos comprenden en particular piperazina, piperidina, etc.

Alcoxi (C_1 - C_3) incluye metoxi, etoxi, propoxi e isopropoxi.

Acilo (C_2 - C_3) incluye acetilo, propilacilo e isopropilacilo.

Alcohol (C_1 - C_3) incluye metanol, etanol, propanol e isopropanol.

- 30 Éster (C_2 - C_3) incluye éster metílico y éster etílico.

Amina (C_1 - C_3) incluye metilamina, etilamina y propilamina.

Imina (C_1 - C_3) incluye metilimina, etilimina y propilimina.

El halógeno puede ser Cl, Br, I o F.

Halogenoalquilo (C_1 - C_3) incluye halogenometilo, halogenoetilo y halogenopropilo.

- 35 Tioalquilo (C_1 - C_3) incluye tiometilo, tioetilo y tiopropilo.

Sulfona (C_1 - C_3) incluye metilsulfona, etilsulfona y propilsulfona.

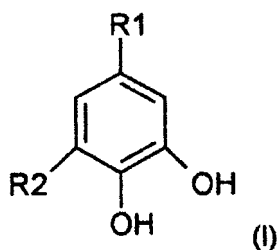
Sulfóxido (C_1 - C_3) incluye metilsulfóxido, etilsulfóxido, propilsulfóxido e isopropilsulfóxido.

“Heteroátomo” denota N, S o O.

- 40 Esta descripción también se refiere a un procedimiento para preparar O- α -glucósidos de compuestos fenólicos que contienen una estructura de catecol y seleccionados por ejemplo entre ácido protocatecuico y sus derivados ésteres, ácido cafeico y sus derivados ésteres, especialmente ácido rosmarínico, ácido clorogénico y éster fenético de ácido cafeico, y ácido hidrocafeico o ácido 3,4-dihidroxihipocinámico, 3,4-dihidroxihipoglicol, esculetina, taxifolina, fustina, eriodictiol, fisetina y ramnetina. En particular, los compuestos fenólicos que contienen una estructura de catecol se pueden seleccionar del grupo que consiste en el galato de epicatequina, el eriodictiol, la esculetina, la epicatequina, la fisetina, la fustina, el ácido homoprotocatecuico, el ácido protocatecuico, el éster etílico del ácido protocatecuico, el hidroxitirosol, la maclurina, el ácido nordihidroguaiarético, la oleuropeína, el pirocatecol, la ramnetina, el ácido rosmarínico, la taxifolina, la 3-hidroxidaidzeína, la 3,4-dihidroxibenzofenona, el ácido cafeico, el ácido dihidrocafeico, el éster fenético de ácido cafeico, la catequina, el cirsiolol, el ácido clorogénico, la gopipetina, la orientina, la homoorientina, el 3,4-dihidroxibenzaldehído, la buteína, la 3,4-dihidroxiacetofenona, la mareína, la maritiméina, la eriodictiolchalcona, la 4-metilesculetina, la nordalbergina, el salsolinol, el ácido chicórico, el equinacósido, el

verbascósido, la antrorobina, la epigalocatequina, la dihidrorobinetina, la galocatequina, el ácido gálico, el galato de propilo, el galato de epigalocatequina, la hamamelitanina y la robinetina. El procedimiento para preparar O- α -glucósidos de compuestos fenólicos que contienen una estructura de catecol también se puede realizar con cirsiolol, 3',4',7-trihidroxiavona y 3'-hidroxidaidzeína (flavonas e isoflavona).

- 5 Para este fin, se consigue una reacción enzimática usando sacarosa, una sustancia abundante y bastante barata usada en los campos de los alimentos y alimentación. Esta reacción consiste en la transferencia de la parte de glucosa de la sacarosa a un grupo hidroxilo del anillo de catecol mediante una glicosiltransferasa (EC 2.4.1) o, una vez que un primer residuo glucosilo ha sido unido a un grupo hidroxilo del anillo de catecol, la transferencia de la parte de glucosa de la sacarosa a un grupo hidroxilo de la glucosa fijada, dependiendo la posición de este grupo hidroxilo de la especificidad de la enzima. Como cada compuesto fenólico citado anteriormente lleva dos grupos hidroxilo en dicho anillo, se pueden obtener dos derivados mediante esta reacción enzimática. Cuando una población de derivados glucósido resulta de la reacción de síntesis (por población, se entienden los compuestos para los cuales el anillo de catecol tiene uno de sus grupos hidroxilo sustituido o ambos de sus grupos hidroxilo sustituidos por un residuo glucosilo o un oligosacárido), a la población entera se le llama producto.
- 10
- 15 La presente descripción se refiere a un método para producir un O- α -glucósido fenólico que comprende incubar sacarosa y una glucansacarasa de *Leuconostoc species*, preferiblemente de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, en agua tamponada a un pH conveniente para la actividad enzimática (bien conocido por un experto) o en un agua tamponada a un pH conveniente para la mezcla actividad enzimática-codisolvente, con un compuesto fenólico que tiene la siguiente fórmula:



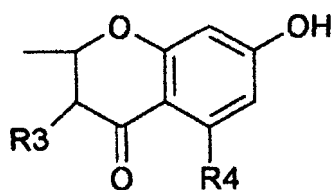
20

en la que:

R2 es O o OH; y

R1 se selecciona del grupo que consiste en

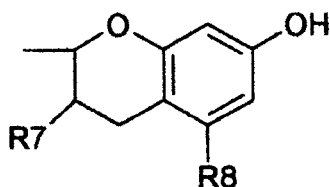
-



25

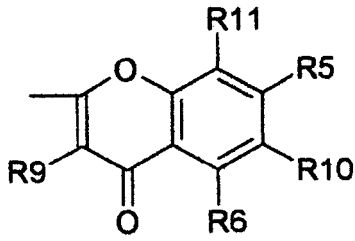
en donde R3 y R4, independientemente, son H o OH, a condición de que al menos uno entre R3 y R4 representa OH; y,

-



- 30 en donde R7 se selecciona del grupo que consiste en H, -OH o -OCOR, y R8 es H o OH, a condición de que al menos uno entre R7 y R8 representa OH;

-

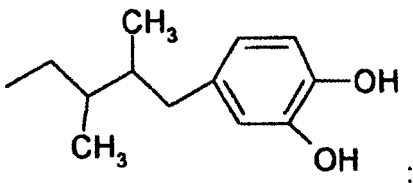


en donde R5 es OH o OCH₃; R6 es H o OH, R9 es H o OH, R10 es H, OCH₃ o C₆H₁₁O₅, y R11 es H, OH o C₆H₁₁O₅, a condición de que R10 y R11 no pueden ser ambos H cuando R5 y R6 son ambos OH y que cuando R10 es C₆H₁₁O₅ entonces R11 es H.

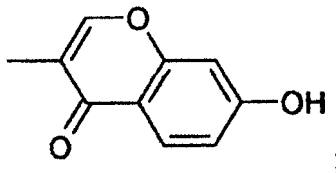
- 5
- (CH₂)_n-COOR o (CH₂)_n-CONHR, siendo n un número entero de 0 a 2;
 - (CR₁₂=CH)-COOR o (CR₁₂=CH)-CONHR, siendo R₁₂ H o un alquilo o alquenilo C₁-C₆ lineal, ramificado o cíclico, preferiblemente metilo, etilo, propilo, ciclohexilo o fenilo, más preferiblemente metilo o fenilo;
 - (CH₂)_n-OR o (CH₂)_n-NHR, siendo n un número entero de 0 a 2;
 - (CH₂)_n-COR o (CH=CH)_n-COR, siendo n un número entero de 0 a 2;

10

- H;
-

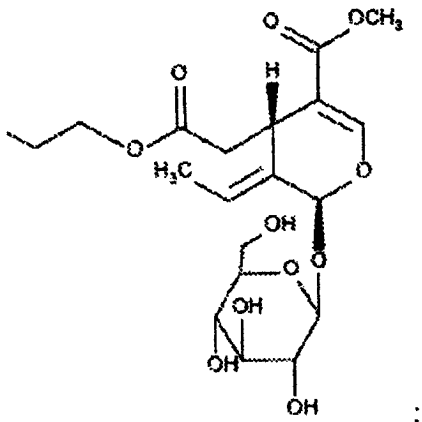


-



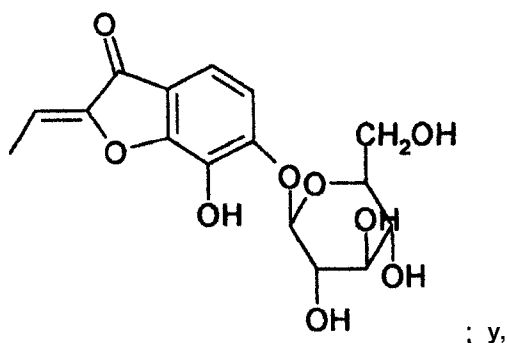
;

15



;

-



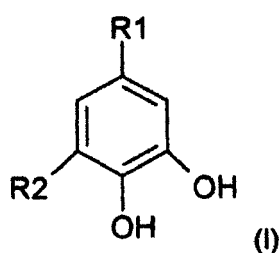
- un grupo hidrocarbonado C₁-C₁₀ que forma con el anillo representado de la fórmula (I) un anillo aromático condensado (bi- o tricíclico) junto con el carbono orto de R1;

5 en donde R es H o un grupo hidrocarbonado C₁-C₁₀ lineal, ramificado o cíclico, aromático o no, saturado o insaturado, opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo, en donde dicho grupo hidrocarbonado comprende un alquilo, un alquenilo o un alquinilo, preferiblemente un alquilo o un alquenilo, que puede estar sustituido por uno o varios sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en: un arilo (C₅-C₉), un heterociclo (C₄-C₉), un alcoxi (C₁-C₃), un acilo (C₂-C₃), un alcohol (C₁-C₃), un grupo carboxílico (-COOH), un éster (C₂-C₃), una amina (C₁-C₃), un grupo amino (-NH₂), una amida (-CONH₂), una imina (C₁-C₃), un nitrilo, un hidroxilo (-OH), un grupo aldehído (-CHO), un halógeno, un halogenoalquilo (C₁-C₃), un tiol (-SH), un tialquilo (C₁-C₃), una sulfona (C₁-C₃), un sulfóxido (C₁-C₃), y una combinación de los mismos.

15 En un primer aspecto de la descripción, R2 es H. En este aspecto, el compuesto fenólico puede ser por ejemplo el galato de epicatequina, el eriodictiol, la esculetina, la epicatequina, la fisetina, la fustina, el ácido homoprotocatecuico, el ácido protocatecuico, el éster etílico del ácido protocatecuico, el hidroxitirosol, la maclurina, el ácido nordihidroguaiarético, la oleuropeína, el pirocatecol, la ramnetina, el ácido rosmarínico, la taxifolina, la 3-hidroxiidazeína, la 3,4-dihidroxibenzofenona, el ácido cafeico, el ácido dihidrocafeico, el éster fenílico del ácido cafeico, la catequina, el cirsiol, el ácido clorogénico, la gosipetina, la orientina, la homoorientina, el 3,4-dihidroxibenzaldehído, la buteína, la 3,4-dihidroxiacetofenona, la mareína, la maritimeína, la eridictiolchalcona, la 4-metilesculetina, la nordalbergina, el salsolinol, el ácido chicórico, el equinacósido, el verbascósido y la antrorobina.

20 En un aspecto alternativo de la descripción, R2 es OH. En este aspecto, el compuesto fenólico puede ser por ejemplo la epigalocatequina, la dihidrorobinetina, la galocatequina, el ácido gálico, el galato de propilo, el galato de epigalocatequina, la hamamelitanina y la robinetina.

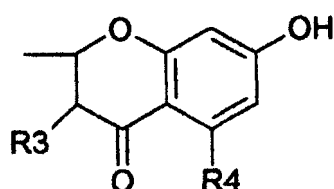
En un aspecto particular del método acorde con la presente descripción, el compuesto fenólico tiene la siguiente fórmula:



25 en la que

R2 es H o OH; y

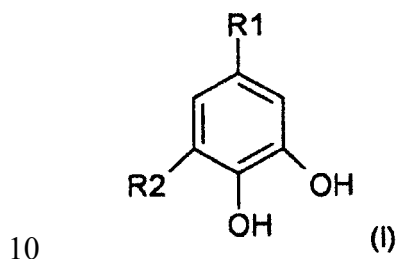
R1 es



en donde R3 y R4, independientemente, son H o OH, a condición de que al menos uno entre R3 y R4 representa OH.

- 5 En un aspecto preferido de la descripción, R3 y R4 son OH. En otro aspecto preferido R3 es H y R4 es OH. En un aspecto preferido más, R3 es OH y R4 es H. En un aspecto particularmente preferido, R2 es H y R3/R4 se seleccionan en las siguientes combinaciones: OH/OH; H/OH; OH/H. En otro aspecto preferido, R2 es OH y R3/R4 se seleccionan en las siguientes combinaciones: OH/OH; H/OH; OH/H. Preferiblemente, el compuesto fenólico se selecciona del grupo que consiste en la taxifolina, el eriodictiol, la dihidrorobinetina y la fustina.

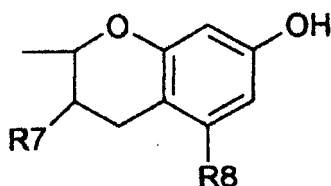
En otro aspecto particular del método acorde con la presente descripción, el compuesto fenólico tiene la siguiente fórmula:



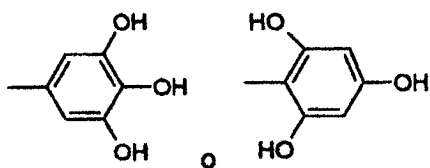
en la que

R2 es H o OH; y

R1 es

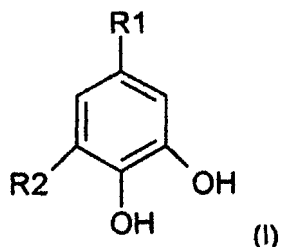


- 15 en donde R7 se selecciona del grupo que consiste en H, -OH o -OCOR y R8 es H o OH, a condición de que al menos uno entre R7 y R8 representa OH. En un aspecto preferido, R8 es OH y R7 es OH o OCOR. En un aspecto más preferido, R7 y R8 son ambos OH. En otro aspecto preferido, R7 es -OCOR y R8 es OH. En un aspecto preferido particular, R2 es H y R3/R4 se seleccionan en las siguientes combinaciones: H/OH, OH/H, OH/OH y OCOR/OH. En otro aspecto preferido particular, R2 es OH y R3/R4 se seleccionan en las siguientes combinaciones: H/OH, OH/H, OH/OH y OCOR/OH. Más preferiblemente, R es
- 20



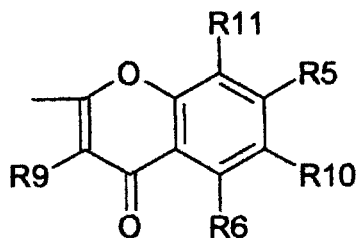
Preferiblemente, el compuesto fenólico se selecciona del grupo que consiste en la catequina, la epicatequina, el galato de catequina, el galato de epicatequina, la galocatequina, la epigalocatequina, el galato de galocatequina y el galato de epigalocatequina.

- 25 En un aspecto particular adicional del método acorde con la presente descripción, el compuesto fenólico tiene la siguiente fórmula:



en la que R2 es H o OH; y

R1 es



5 en donde R5 es OH o OCH₃; R6 es H o OH, R9 es H o OH, R10 es H, OCH₃ o C₆H₁₁O₅, y R11 es H, OH o C₆H₁₁O₅, a condición de que R10 y R11 no pueden ser ambos H cuando R5 y R6 son ambos OH, y que cuando R10 es C₆H₁₁O₅ entonces R11 es H. En particular, R6, R5 y R11 se pueden seleccionar de las siguientes combinaciones:

- a) R6 es OH y R5 es OCH₃ y R11 es H;
- b) R6 es OH y R5 es OH y R11 es OH;
- c) R6 es OH y R5 es OH y R11 es C₆H₁₁O₅; y

10 d) R6 es H y R5 es OH y R11 es H; y

R9 es H o OH, y R10 es H o OCH₃ o C₆H₁₁O₅,

con la condición de que cuando R10 es C₆H₁₁O₅, R11 es H.

En un aspecto preferido de la descripción, R9 es OH, R10 es H y R11 es H, mientras que R6 es OH y R5 es OCH₃, o R6 es H y R5 es O. Preferiblemente, R2 es H. Alternativamente, R2 es OH.

15 En otro aspecto preferido de la descripción, R9 es H y R10 es OCH₃ o C₆H₁₁O₅. En un aspecto particular de este aspecto, R9 y R11 son H, R10 y R5 son OCH₃, y R6 es OH.

En un aspecto preferido adicional de la descripción, R5 y R6 son ambos OH, R9 es H o OH, R10 es OH o C₆H₁₁O₅ y R11 es H, OH o C₆H₁₁O₅, a condición de que cuando R10 es C₆H₁₁O₅ entonces R11 es H. En otro aspecto preferido, R5 y R6 son ambos OH, R9 es H o OH, R10 es H, y R11 es OH o C₆H₁₁O₅.

20 En otro aspecto preferido de la descripción, R9 es H y R10 es H. En un aspecto preferido adicional, R9 es H, R10 y R5 son OCH₃, y R6 es OH.

En un aspecto particular de la descripción, R2, R5, R6, R9, R10 y R11 se pueden seleccionar de las combinaciones mencionadas a continuación.

R2	R5	R6	R9	R10	R11
H	OCH ₃	OH	H	H	H
H	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	H
H	OCH ₃	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
H	OCH ₃	OH	OH	H	H
H	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	H
H	OCH ₃	OH	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
H	OH	OH	H	H	OH
H	OH	OH	H	OCH ₃	OH
H	OH	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
H	OH	OH	OH	H	OH

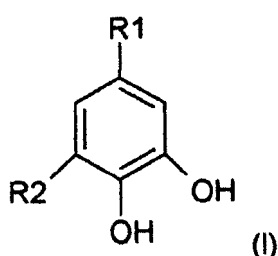
ES 2 384 275 T3

H	OH	OH	OH	OCH ₃	OH
H	OH	OH	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
H	OH	OH	H	H	C ₆ H ₁₁ O ₅
H	OH	OH	H	OCH ₃	C ₆ H ₁₁ O ₅
H	OH	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
H	OH	OH	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅
H	OH	OH	OH	OCH ₃	C ₆ H ₁₁ O ₅
H	OH	OH	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
H	OH	H	H	H	H
H	OH	H	H	OCH ₃	H
H	OH	H	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
H	OH	H	OH	H	H
H	OH	H	OH	OCH ₃	H
H	OH	H	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OCH ₃	OH	H	H	H
OH	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	H
OH	OCH ₃	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OCH ₃	OH	OH	H	H
OH	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	H
OH	OCH ₃	OH	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OH	OH	H	H	OH
OH	OH	OH	H	OCH ₃	OH
OH	OH	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OH	OH	OH	H	OH
OH	OH	OH	OH	OCH ₃	OH
OH	OH	OH	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OH	OH	H	H	C ₆ H ₁₁ O ₅
OH	OH	OH	H	OCH ₃	C ₆ H ₁₁ O ₅
OH	OH	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OH	OH	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅
OH	OH	OH	OH	OCH ₃	C ₆ H ₁₁ O ₅
OH	OH	OH	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OH	H	H	H	H

OH	OH	H	H	OCH ₃	H
OH	OH	H	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OH	H	OH	H	H
OH	OH	H	OH	OCH ₃	H
OH	OH	H	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H

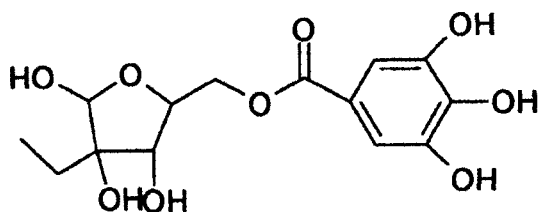
Preferiblemente, el compuesto fenólico se selecciona del grupo que consiste en la ramnetina, la fisetina, la robinetina, la gospipetina, la orientina, la homoorientina y el cirsiol.

- 5 En un aspecto particular adicional del método acorde con la presente descripción, el compuesto fenólico tiene la siguiente fórmula:

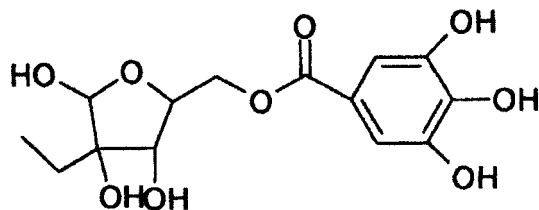


en la que

- 10 R2 es H o OH; y R1 es $-(CH_2)_n-COOR$ o $-(CH_2)_n-CONHR$, siendo n un número entero de 0 a 2. En un aspecto preferido, R2 es H. Alternativamente, R2 es OH. Preferiblemente, R se selecciona del grupo que consiste en H, un alquilo C₁-C₃, preferiblemente metilo, etilo o propilo, y



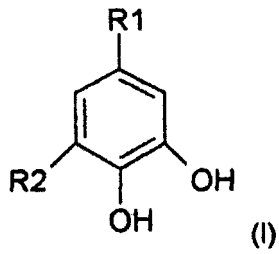
En un primer aspecto más preferido de la descripción, n es 0 y R es preferiblemente H. En un segundo aspecto más preferido n es 1 y R es preferiblemente H. En un tercer aspecto más preferido, n es 2 y R es preferiblemente H. En otro aspecto preferido, n es 0 y R es un alquilo C₁-C₃, preferiblemente metilo, etilo o propilo; o



- 15 En un aspecto preferido de la descripción, R1 es $-(CH_2)_n-COOR$. En un aspecto preferido, R es H.

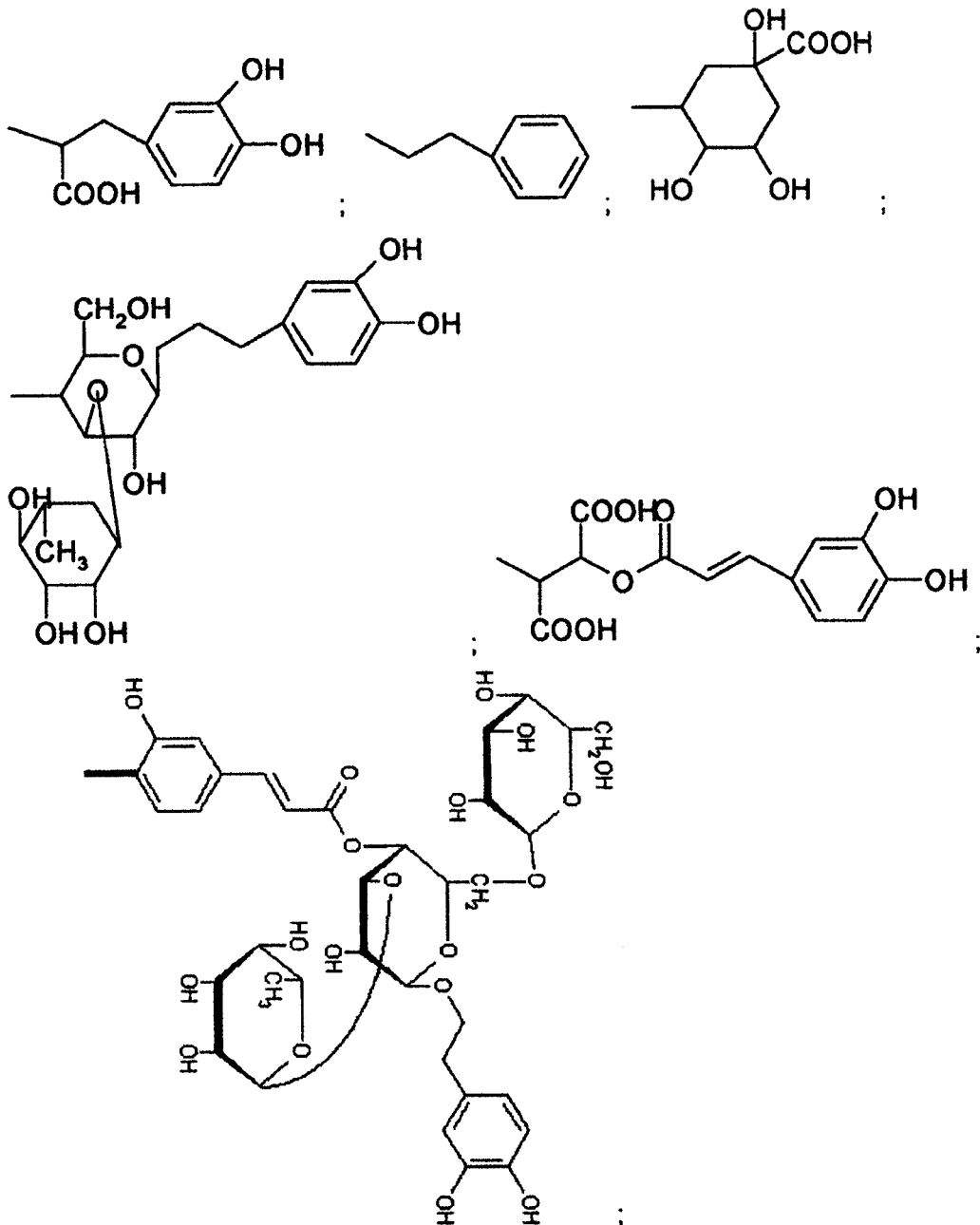
Preferiblemente, el compuesto fenólico se selecciona del grupo que consiste en el ácido homoprotocatecuico, el ácido dihidrocafeico, el éster etílico del ácido protocatecuico, el galato de propilo, el ácido gálico, la hamamelitanina (2',5-di-O-galoil-hamamelosa) y el ácido protocatecuico.

- 20 En un aspecto particular adicional del método acorde con la presente descripción, el compuesto fenólico tiene la siguiente fórmula:



en la que

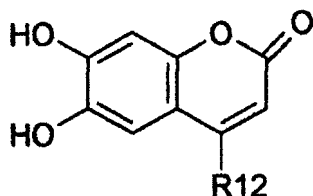
5 R2 es H o OH; y R1 es $-(CR_{12}=CH)-COOR$ o $-(CR_{12}=CH)-CONHR$, siendo R12 H o un alquilo o alqueno C₁-C₆ lineal o cíclico, preferiblemente metilo, etilo, propilo, ciclohexilo o fenilo, más preferiblemente metilo o fenilo. Preferiblemente R1 es $-(CH=CH)-COOR$ o $-(CH=CH)-CONHR$. En un aspecto preferido, R2 es H. Alternativamente, R2 es OH. En un aspecto preferido, R1 es $-(CH=CH)-COOR$. En un aspecto preferido, R se selecciona del grupo que consiste en H;



y un enlace unido al grupo fenilo de la fórmula (I) en el carbono en orto de R1.

Cuando R es un enlace unido al grupo fenilo de la fórmula (I) en el carbono en orto de R1, R12 se puede seleccionar en particular del grupo que consiste en H; metilo y fenilo. Entonces, el compuesto fenólico puede tener la siguiente fórmula:

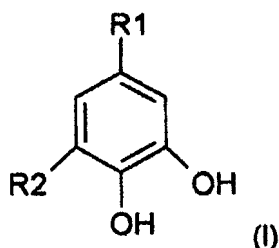
5



Siendo R12 H o un alquilo o alqueniilo C₁-C₆ lineal o cíclico, preferiblemente metilo, etilo, propilo, ciclohexilo o fenilo, más preferiblemente metilo o fenilo.

10 Preferiblemente, el compuesto fenólico se selecciona del grupo que consiste en el ácido cafeico, el ácido rosmarínico, la esculetina, la 4-metilesculetina, la nordalbergina (6,7-dihidroxifenilcumarina), el ácido clorogénico, el éster fenílico del ácido cafeico, el ácido chicórico (ácido dicafeoiltartárico), el equinacósido (O-6-desoxi-alfa-L-manopiranosil-(1→3)-O-(beta-D-glucopiranosil-(1→6))-, 4-(3-(3,4-dihroxifenil)-2-propenoato de 2-(3,4-dihroxifenil) etilo), beta-D-glucopiranosido) y el verbascósido.

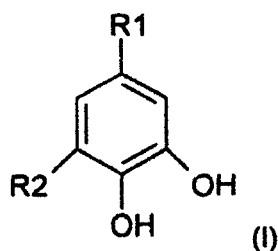
15 En un aspecto particular adicional del método acorde con la presente descripción, el compuesto fenólico tiene la siguiente fórmula:



en la que

R2 es H o OH; y R1 es -(CH₂)_n-OR, siendo n un número entero de 0 a 2. En un aspecto preferido n es 2. Preferiblemente, el compuesto fenólico es el hidroxitirosol.

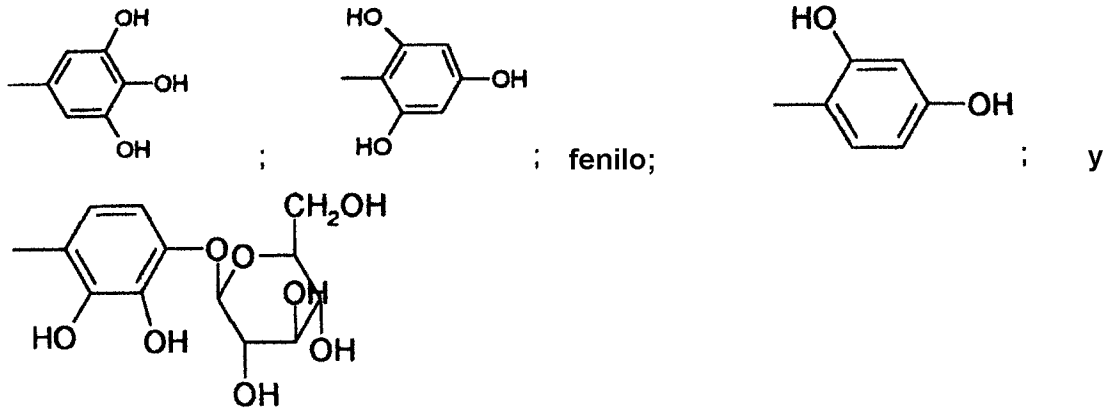
20 En un aspecto particular adicional del método acorde con la presente descripción, el compuesto fenólico tiene la siguiente fórmula:



en la que

R2 es H o OH; y R1 es -(CH₂)_n-COR o -(CH=CH)_n-COR, siendo n un número entero de 0 a 2.

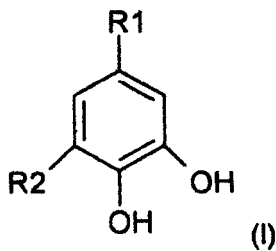
25 En un aspecto preferido de la descripción, n es 0 o 1 y R se selecciona del grupo que consiste en H; un alquilo C₁-C₃, preferiblemente metilo, etilo o propilo,, más preferiblemente un metilo;



Preferiblemente, n es 0. Alternativamente, n es 1.

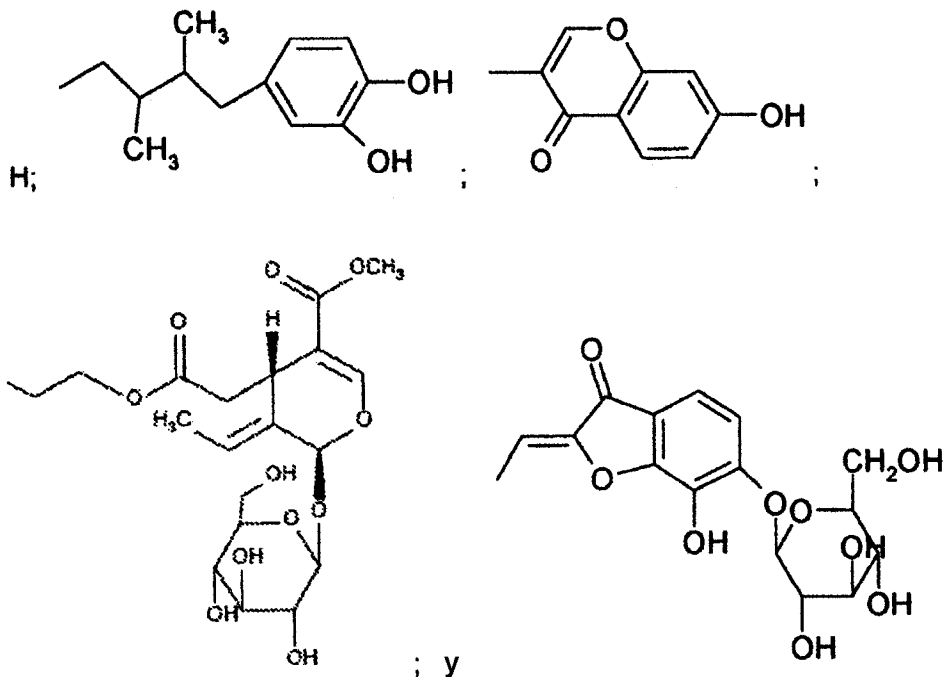
5 Preferiblemente, el compuesto fenólico se selecciona de la maclurina, el 3,4-dihidroxibenzaldehído, la 3,4-dihidroxibenzofenona, la buteína (2',3,4,4'-tetrahidroxichalcona), la 3,4-dihidroxiacetofenona, la mareína (2',3,3',4,4'-pentahidroxi-4'-glucosilchalcona), y la eriodictiolchalcona (2',4',6',3,4-pentahidroxichalcona).

En un aspecto particular adicional del método acorde con la presente descripción, el compuesto fenólico tiene la siguiente fórmula:



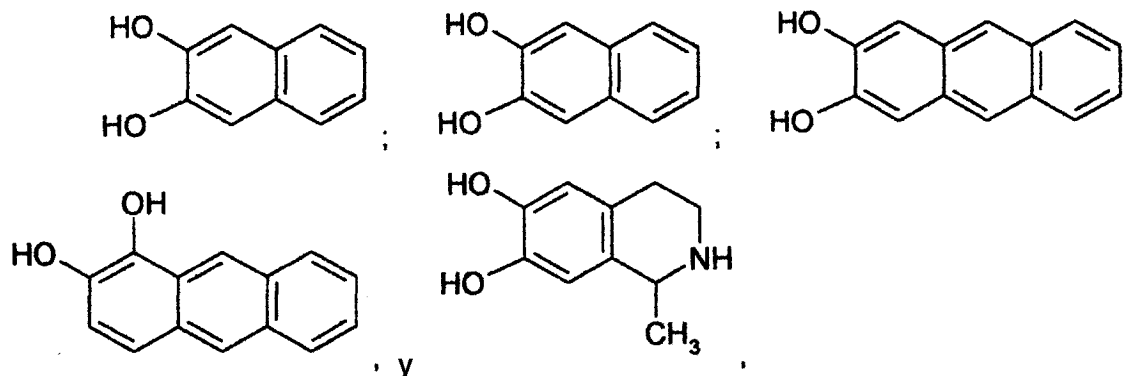
en la que

10 R2 es H o OH; y R1 se selecciona del grupo que consiste en



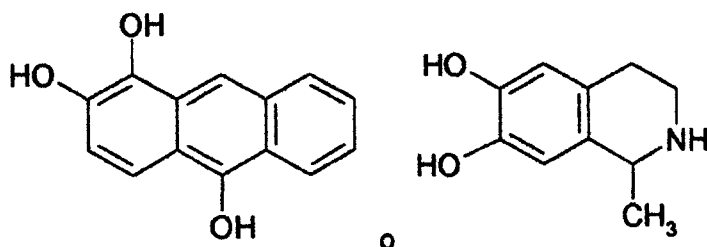
Preferiblemente, el compuesto fenólico se selecciona del grupo que consiste en el pirocatecol, el ácido nordihidroguaiarético, la 3-hidroxiidaidzeína, la oleuropeína, y la maritiméina (3',4',6,7-tetrahidroxi-6-O-glucosilaurona).

- 5 En este aspecto, R1 del compuesto fenólico es un grupo hidrocarbonado C₁-C₁₀ que forma con el anillo representado de la fórmula (I) un anillo aromático condensado (bi- o tricíclico) junto con el carbono orto de R1. En particular, el compuesto fenólico se puede seleccionar del grupo que consiste en



- 10 dicho anillo condensado puede estar opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo y puede estar sustituido por uno o varios sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en: un alcoxi (C₁-C₃), un acilo (C₂-C₃), un alcohol (C₁-C₃), un grupo carboxílico (-COOH), un éster (C₂-C₃), una amina (C₁-C₃), un grupo amino (-NH₂), una amida (-CONH₂), una imina (C₁-C₃), un nitrilo, un hidroxilo (-OH), un grupo aldehído (-CHO), un halógeno, un halogenoalquilo (C₁-C₃), un tiol (-SH), un tioalquilo (C₁-C₃), una sulfona (C₁-C₃), un sulfóxido (C₁-C₃), y una combinación de los mismos.

En un aspecto preferido particular, el compuesto fenólico es



- 15 **Naturaleza y fuente de la enzima**

Las enzimas que se pueden usar para esta reacción de condensación son glicosiltransferasas, más preferiblemente hexosiltransferasas (EC 2.4.1), y de una manera preferida glucansacarasas (EC 2.4.1.5).

- 20 En un aspecto preferido de la descripción, la enzima usada para la condensación de estos compuestos fenólicos con glucosa es una glucasacarasa de una especie bacteriana, más precisamente de una especie de *Leuconostoc*, y más preferiblemente de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

Fuentes alternativas de enzima pueden ser la(s) glucansacarasa(s) de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-742, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299, *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, o *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-23192.

- 25 Tales enzimas se pueden obtener mediante una fermentación natural de la cepas de producción, seguido de tratamientos celulares y recuperación y purificación de enzimas. Dado que las glucansacarasas son principalmente enzimas extracelulares grandes en disolución en el caldo de cultivo o células asociadas, las técnicas que se pueden usar para la recuperación de la enzima incluyen, pero no se limitan a, centrifugación y microfiltración tangencial, y, si es una enzima asociada a células, las técnicas que tienen como objetivo la rotura celular incluyen, pero no se limitan a, homogeneización en prensa francesa, perlas de vidrio, sonicación o cualquier método equivalente. Las técnicas que tienen como objetivo la concentración de enzimas incluyen, pero no se limitan a, ultrafiltración con un corte de peso molecular que oscila de 10 kDa a 300 kDa, y las técnicas que se pueden usar para la purificación de enzimas incluyen, pero no se limitan a, reparto de fases con polietilenglicol, cromatografía de permeación en gel. Una solución alternativa consiste en la expresión recombinante de dichas enzimas en huéspedes de expresión bien conocidos tales como *E. coli*, *S. cerevisiae*, Baculovirus, *Y. lipolytica*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *H. polymorpha* o células de mamíferos (véase como referencia "Production of recombinant Proteins: Novel Microbial and Eukaryotic
- 30
- 35

Expression Systems" Wiley 2004 - Gerd Gellissen Ed.), opcionalmente seguido de una(s) etapa(s) de purificación usando métodos bien conocidos por el experto en la técnica.

5 La enzima también se puede obtener mediante métodos de mutagénesis aleatoria, mutagénesis dirigida o evolución dirigida, bien conocidos por el experto en la técnica (MIYAZAKI K, ARNOLD FH (2004), *In vitro* DNA recombination. In Phage Display: A practical approach. Clarkson T and Lowman H, editores. New York: Oxford University press Inc., 43-60). Estas tecnologías podrían permitir obtener enzimas con actividad específica más alta, inhibición de productos más baja, regio, quimio y estereo selectividad dedicada, mejor estabilidad, o cualquier combinación de los mismos.

10 El procedimiento de la descripción puede así ser llevado a cabo bien con células enteras o bien con enzima bruta o purificada natural o recombinante. La enzima se puede usar bajo su forma "libre", o como un catalizador inmovilizado. Tales procedimientos de inmovilización incluyen, pero no se limitan a, encapsulación en gel (alginato de calcio, ...), adsorción en resina, reticulación con glutaraldehído, secado por pulverización en presencia eventualmente de un adyuvante adecuado para obtener una forma insoluble de la enzima, reactores de membrana o cualquier combinación de los mismos, y son bien conocidos por el experto en la técnica. La elección de un método de inmovilización se basa en su coste económico y en el campo final del procedimiento que implica dicha enzima inmovilizada.

15 La cantidad de actividad enzimática de una preparación de enzima se puede estimar usando la hidrólisis de sacarosa y la medida del azúcar reductor liberado (fructosa) por medio de métodos colorimétricos (tales como el que implica ácido 3,5-dinitro-salicílico; SUMNER JB, HOWELL SF (1935) A method for determination of invertase activity. J Biol Chem 108: 51-4). Esta actividad enzimática se expresa en unidades en las que una unidad (U) corresponde a la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de fructosa por minuto a 30°C, pH 5,2 (sacarosa:100 g/l; tampón de acetato de sodio: 50 mM; cloruro de calcio dihidratado: 10 mg/l).

Condiciones de reacción

25 La reacción se puede conseguir en agua tamponada o en una mezcla de agua tamponada/codisolvente(s). De hecho, los inventores observaron sorprendentemente que la enzima es capaz de glucosilar en ausencia de codisolventes.

30 Preferiblemente, el agua tamponada a un pH conveniente para la actividad enzimática usada bien sin codisolvente o bien en una mezcla con un codisolvente consiste en tampón acetato de sodio o potasio a una concentración que oscila de 20 a 500 mM en agua, pero se puede usar cualquier otra sustancia amortiguadora sin ningún efecto negativo sobre la actividad enzimática. Preferiblemente, el agua tamponada a un pH conveniente para la mezcla actividad enzimática-codisolvente consiste en una mezcla de agua, preferiblemente un agua tamponada como se describió anteriormente, y dimetilsulfóxido (DMSO) con una proporción menor que 35% de DMSO (volumen/volumen), preferiblemente entre 15-25% más preferiblemente alrededor de 15%.

35 La reacción se puede conseguir en una mezcla agua/codisolvente(s) que permite tanto una actividad apropiada de la enzima como un buen nivel de solubilidad de los compuestos fenólicos y del donador de glucosa, es decir, sacarosa. Tales codisolventes pueden ser los siguientes disolventes orgánicos miscibles con el agua: dimetilsulfóxido, dioxano, dimetilformamida, etanol, n-propanol, isopropanol, etilenglicol, glicerol, 1,2-propanodiol, sulfolano, tetrametilurea, lactato de etilo, éter dietílico de dietilenglicol, éter dietílico de trietilenglicol, usados a diferentes relaciones de peso/volumen. Además de estos disolventes orgánicos simples, también pueden contemplarse líquidos iónicos (sales de imidazolio, piridinio, fosfonio y amonio). Los codisolventes pueden ser también los siguientes disolventes orgánicos inmiscibles con el agua: acetato de etilo, metiletilcetona, metil-2 butanol-2, y una combinación de disolventes orgánicos miscibles con el agua con disolventes orgánicos inmiscibles con el agua.

45 En un aspecto preferido de la descripción, la mezcla está hecha de agua y dimetilsulfóxido (DMSO), con concentraciones de DMSO que oscilan de 5 a 70% (volumen/volumen). En un aspecto preferido, las concentraciones de DMSO están entre 5 y 50% (volumen/volumen). En un aspecto más preferido, la concentración de DMSO está entre 10 y 35% (volumen/volumen). De hecho, los inventores encontraron sorprendentemente que la reacción es sumamente más eficaz cuando tuvo lugar a una proporción de DMSO menor que 40%. La tasa más alta de producto ha sido registrada para una proporción de 15%. Por lo tanto, una proporción preferida del método acorde con la presente descripción está comprendida entre 15-25%, preferiblemente alrededor del 15% (+/- 3%).

50 Cada compuesto fenólico es incubado en esta mezcla de reacción con sacarosa y la enzima en condiciones de pH y temperatura que permiten a la enzima ser activa y sintetizar el máximo posible del glucósido deseado. Preferiblemente, el medio de reacción contiene, además, cationes de calcio en la forma de cloruro de calcio (o en la forma de cualquier sal de calcio soluble en agua) para mejorar la estabilidad de la enzima. La reacción de condensación se puede realizar a un pH que oscila de 4 a 8, y preferiblemente de 5 a 7, introduciendo una baja cantidad de tampón acetato en el medio de reacción. La temperatura del medio de síntesis es mantenida a un valor que oscila de 10 a 40 grados Celsius, y preferiblemente de aproximadamente 25 a 33 grados Celsius.

- Las condiciones de reacción típicas con la glucansacarasa de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F consiste en una mezcla de tampón acetato a 10 mM a 100 mM, DMSO a 10 a 35%(volumen/volumen), sacarosa a 100 mM a 900 mM y compuesto fenólico a 2 a 200 mM, sales de calcio a 0,5 mg a 1 g/l y la enzima para una concentración final de 0,5 a 5 U/ml. Esta reacción es incubada a 30°C durante varias horas (p.ej., 10 a 48 horas), y la síntesis del derivado del compuesto fenólico, así como la desaparición de dicho compuesto fenólico con el tiempo, es seguida por análisis HPLC. Se puede conseguir una mejor caracterización de los productos por cromatografía líquida de alta resolución acoplada con un detector de matriz de fotodiodos acoplado con un espectrómetro de masas para estimar directamente el número de restos de glucosa unidos al compuesto fenólico, y por tanto tener una buena caracterización analítica de los derivados sintetizados.
- 10 En un aspecto de la presente descripción, tales condiciones que permiten la caracterización analítica de los derivados sintetizados puede ser como sigue:
- Los medios de síntesis pueden ser analizados por cromatografía líquida de alta resolución acoplada con un detector de matriz de fotodiodos (PDA Waters® 996) y un espectrómetro de masas (Micromass ZQ 2000, Waters®).
- i) Condiciones de operación para cromatografía:
- 15
- Columna: KROMASIL C18 5µ, 250 mm x 4,6 mm (referencia: K2185, A.I.T. Chromato; 117 rue de Stalingrad; 78800 Houilles)
 - Elución (método 1):
 - Disolvente A: agua desionizada que contiene 1% v/v de ácido acético
 - Disolvente B: metanol de grado HPLC que contiene 1% v/v de ácido acético
- 20
- 0 a 10 minutos: 90% a 80% A (lineal); 10% a 20% B (lineal); 1 ml/minuto
 - 10 a 25 minutos: 80% a 50% A (lineal); 20% a 50% B (lineal); 1 ml/minuto
 - 25 a 30 minutos: 50% A; 50% B; 1 ml/minuto
 - 30 a 35 minutos: 50% a 90% A (lineal); 50 a 10% B (lineal); 1 ml/minuto
 - 45 minutos: siguiente inyección
- 25
- Temperatura de columna: 30°C
 - Volumen de inyección: 10 µl
- ii) Detector de matriz de fotodiodos
- Longitud de onda de inicio: 210 nm
 - Longitud de onda final: 400 nm
- 30
- Resolución: 1,2 nm
 - Tasa de muestreo: 1 espectro/segundo
- iii) Espectrómetro de masas LC (cuadrupolo simple)
- Ionización: electropulverización en modo negativo
 - Voltaje de pulverización: 3,0 kV
- 35
- Temperatura de la fuente: 150°C
 - Tensión de cono: 20 o 40V
 - Extractor: 3,0 V
 - Temperatura de desolvación: 300°C
 - Flujo de gas de cono: 30 L/hora
- 40
- Flujo de gas de desolvación: 600 L/hora
 - Espectros de masas de barrido completo: m/z de 100 a 2000

Purificación

Después de la síntesis, los O- α -glucósidos fenólicos pueden ser usados bien directamente o bien purificados hasta alcanzar una pureza deseada en términos de compuesto fenólico residual no transformado, azúcares, enzima y codisolventes.

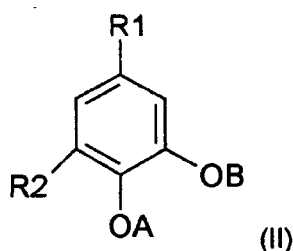
5 Por ejemplo, los O- α -glucósidos fenólicos pueden ser adsorbidos en una resina adsorbente macroporosa sintética aprovechando la ventaja de la diferencia de capacidad absorbente de las sustancias. Debido a la presencia de sustancias residuales en el volumen intersticial, la resina con las sustancias fenólicas adsorbidas se lava con agua a fin de retirar completamente la enzima, los azúcares y el polisacárido y el co-disolvente. Después, la resina puede sufrir una etapa de elución con un disolvente apropiado para recuperar el producto sintetizado. El disolvente apropiado es metanol, etanol, n-propanol, 2-propanol, acetona, puros, o una mezcla de ellos o una mezcla de ellos con agua con no más que 20% volumen/volumen de agua. La disolución que contiene el (los) producto(s) sintetizado(s) puede ser concentrada por evaporación a vacío a temperatura moderada (no más alta que 50°C) o con equipos de membrana compatibles para purificación adicional, o ser usada directamente para purificación adicional. Se pueden usar etapas de purificación adicionales tales como extracción líquido/líquido, HPLC preparativa, u otras rondas de purificación con resina para alcanzar el nivel requerido de pureza para la aplicación final. Los disolventes orgánicos que se pueden usar para la extracción líquido-líquido son acetato de etilo, acetato de butilo, metiletilcetona, dependiendo de la diferencia de solubilidad del compuesto fenólico y el glucósido del compuesto fenólico.

20 Finalmente, se puede obtener un jarabe que contiene la(s) sustancia(s) deseada(s) retirando el disolvente (agua o disolvente orgánico) por evaporación a vacío a temperatura moderada (no más alta que 50°C) o con equipos de membrana compatibles y concentrar la disolución resultante para dar una concentración prescrita. Este jarabe se puede secar (liofilización, secado por pulverización o cualquier otra manera de secar que preserve la integridad de las moléculas) para obtener un polvo.

25 La resina adsorbente macroporosa sintética se puede usar bien en un tanque (se usará un tamiz con una malla conveniente dependiendo de la granulometría de la resina para recuperar la resina) o situada en una columna alimentada con una bomba. Por resina adsorbente macroporosa sintética se entiende resinas sintéticas no iónicas y porosas que tienen un área superficial relativamente grande, tales como las que contienen copolímero de estireno-divinilbenceno, polímeros de fenol-formaldehído, polímero acrílico y polímero metacrílico. Los ejemplos de tales resinas son Amberlite del tipo XAD (Rohm and Haas Company, EE.UU.), y Diaion de la familia HP (Mitsubishi Chemical Industries, Japón).

30 La descripción se refiere a O- α -glucósidos de compuestos fenólicos que contienen una estructura de catecol y por ejemplo seleccionados entre ácido protocatecuico y sus derivados ésteres, ácido cafeico y sus derivados ésteres, especialmente ácido rosmarínico, ácido clorogénico y éster fenílico de ácido cafeico y ácido hidrocafeico o ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico, ácido 3,4-dihidroxifenilacético y 3,4-dihidroxifenilglicol, esculetina, taxifolina, fustina, eriodictiol, fisetina y ramnetina. En particular, la descripción se refiere a O- α -glucósidos de compuestos fenólicos que contienen una estructura de catecol y seleccionados del grupo que consiste en el galato de epicatequina, el eriodictiol, la esculetina, el O- α -glucósido de fisetina, la fustina, el ácido homoprotocatecuico, el ácido protocatecuico, el éster etílico del ácido protocatecuico, el hidroxitiroso, la maclurina, el ácido nordihidroguaiarético, la oleuropeína, el pirocatecol, la ramnetina, el ácido rosmarínico, la taxifolina, la 3-hidroxiidzeína, la 3,4-dihidroxibenzofenona, el ácido cafeico, el ácido dihidrocafeico, el éster fenílico de ácido cafeico, el cirsiol, el cósido de ácido clorogénico, la antrarobina, la epigalocatequina, la dihidrorobinetina, la galocatequina, el ácido gálico, el galato de propilo y la robinetina. Estos nuevos derivados de compuestos fenólicos tienen una mejor biodisponibilidad mediante una solubilidad en agua mejorada y/o una liberación *in situ* de las agliconas durante su uso mediante su hidrólisis por microbios naturales humanos, y más específicamente de microorganismos de la piel humana, o por una α -glucosidasa seleccionada tal como la α -glucosidasa producida por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

45 En particular, la presente descripción se refiere a un O- α -glucósido fenólico que tiene la siguiente fórmula:



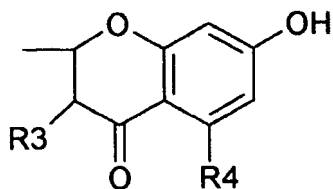
en la que

50 A y B, idénticos o diferentes, son H o un residuo - α -glucosilo, a condición de que al menos uno de A y B es un residuo - α -glucosilo;

R2 es H o OH; y,

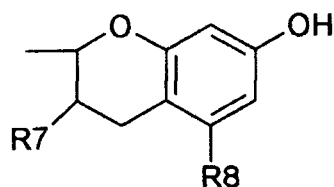
R1 se selecciona del grupo que consiste en

-



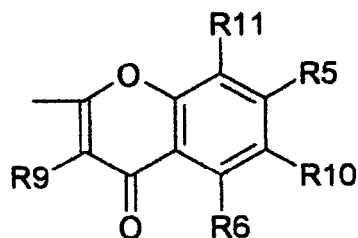
5 en donde R3 y R4, independientemente, son H o OH, a condición de que al menos uno entre R3 y R4 representa OH;

-



10 en donde R7 se selecciona del grupo que consiste en H, -OH o -OCOR, y R8 es H o OH, a condición de que, cuando R2 es H, R7 y R8 no son ambos OH, y al menos uno entre R7 y R8 es OH;

-



15 en donde R5 es OH o OCH₃; R6 es H o OH, R9 es H o OH, R10 es H, OCH₃ o C₆H₁₁O₅, y R11 es H, OH o C₆H₁₁O₅, a condición de que R10 y R11 no pueden ser ambos H cuando R5 y R6 son ambos OH, y que cuando R10 es C₆H₁₁O₅ entonces R11 es H;

- (CH₂)_n-COOR o -(CH₂)_n-CONHR, siendo n un número entero de 0 a 2;

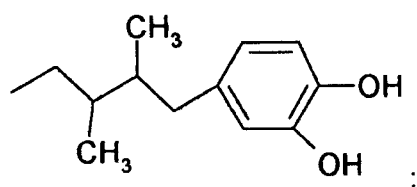
- (CR₁₂=CH)-COOR o -(CR₁₂=CH)-CONHR, siendo R₁₂ H o un alquilo o alqueno C₁-C₆ lineal, ramificado o cíclico, preferiblemente metilo, etilo, propilo, ciclohexilo o fenilo, más preferiblemente metilo o fenilo;

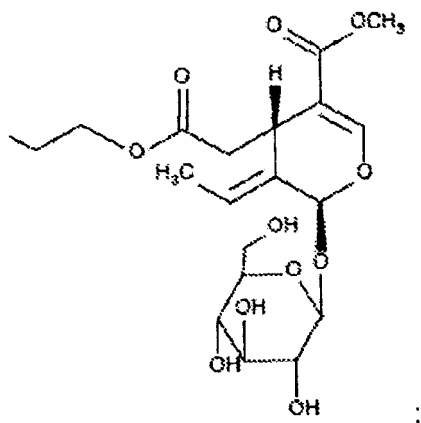
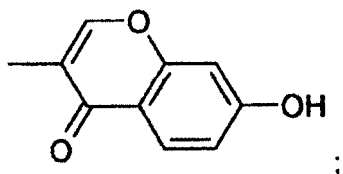
- (CH₂)_n-OR o -(CH₂)_n-NHR, siendo n un número entero de 0 a 2;

20 - (CH₂)_n-COR o -(CH=CH)_n-COR siendo n un número entero de 0 a 2;

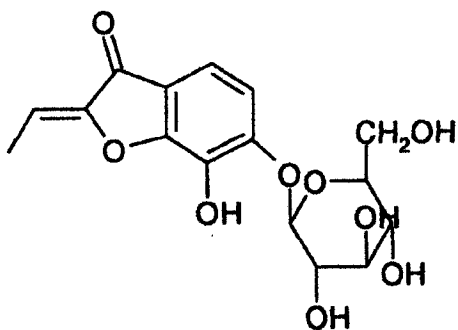
- H;

-





5



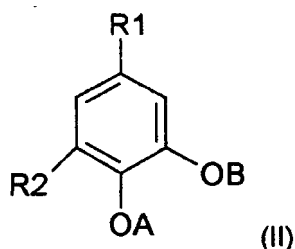
- un grupo hidrocarbonado C₁-C₁₀ que forma con el anillo representado de la fórmula (I) un anillo condensado (bi o tricíclico) junto con el carbono orto de R₁, estando dicho anillo opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo;

10 en donde R es H o un grupo hidrocarbonado C₁-C₁₀ lineal, ramificado o cíclico, aromático o no, saturado o insaturado, opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo, en donde dicho grupo hidrocarbonado comprende un alquilo, un alquenilo o un alquinilo, preferiblemente un alquilo o un alquenilo, que puede estar
 15 sustituido por uno o varios sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en: un arilo (C₅-C₉), un heterociclo (C₄-C₉), un alcoxi (C₁-C₃), un acilo (C₂-C₃), un alcohol (C₁-C₃), un grupo carboxílico (-COOH), un éster (C₂-C₃), una amina (C₁-C₃), un grupo amino (-NH₂), una amida (-CONH₂), una imina (C₁-C₃), un nitrilo, un hidroxilo (-OH), un grupo aldehído (-CHO), un halógeno, un halogenoalquilo (C₁-C₃), un tiol (-SH), un tioalquilo (C₁-C₃), una sulfona (C₁-C₃), un sulfóxido (C₁-C₃), y una combinación de los mismos.

En un primer aspecto de la descripción, R₂ es H. En este aspecto, el O- α -glucósido fenólico puede ser por ejemplo
 20 el O- α -glucósido de galato de epicatequina, el O- α -glucósido de eriodictiol, el O- α -glucósido de esculetina, el O- α -glucósido de fisetina, el O- α -glucósido de fustina, el O- α -glucósido de ácido homoprotocatecuico, el O- α -glucósido de ácido protocatecuico, el O- α -glucósido de éster etílico de ácido protocatecuico, el O- α -glucósido de hidroxitirosol, el O- α -glucósido de maclurina, el O- α -glucósido de ácido nordihidroguaiarético, el O- α -glucósido de oleuropeína, el O- α -glucósido de pirocatecol, el O- α -glucósido de ramnetina, el O- α -glucósido de ácido rosmarínico, el O- α -glucósido de taxifolina, el O- α -glucósido de 3-hidroxidaidzeína, el O- α -glucósido de 3,4-dihidroxibenzofenona, el O- α -glucósido de ácido cafeico, el O- α -glucósido de ácido dihidrocafeico, el O- α -glucósido de éster fenético de ácido
 25 cafeico, el O- α -glucósido de cirsiol, el O- α -glucósido de ácido clorogénico y el O- α -glucósido de antrarobina.

En un aspecto alternativo de la descripción, R2 es OH. En este aspecto, el O- α -glucósido fenólico puede ser por ejemplo el O- α -glucósido de epigalocatequina, el O- α -glucósido de dihidrorobinetina, el O- α -glucósido de galocatequina, el O- α -glucósido de ácido gálico, el O- α -glucósido de galato de propilo, y el O- α -glucósido de robinetina.

- 5 En un aspecto particular de la presente descripción, el O- α -glucósido fenólico tiene la siguiente fórmula:

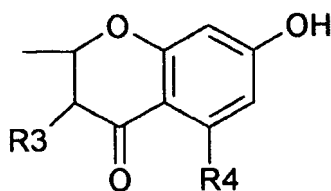


en la que

A y B, idénticos o diferentes, son H o un residuo - α -glucosilo, a condición de que al menos uno de A y B es un residuo - α -glucosilo;

- 10 R2 es H o OH; y

R1 es



en donde R3 y R4, independientemente, son H o OH, a condición de que al menos uno entre R3 y R4 representa OH.

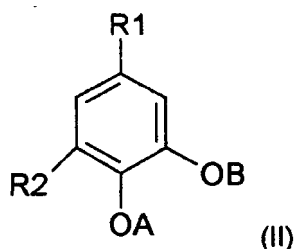
- 15 En un aspecto particular de la descripción, R2 es H. En otro aspecto, R2 es OH.

En un aspecto preferido de la descripción, R3 y R4 son OH. En otro aspecto preferido, R3 es H y R4 es OH. En un aspecto preferido adicional, R3 es OH y R4 es H. En un aspecto particularmente preferido, R2 es H y R3/R4 se seleccionan en las siguientes combinaciones: OH/OH; H/OH; OH/H. En otro aspecto preferido, R2 es OH y R3/R4 se seleccionan en las siguientes combinaciones: OH/OH; H/OH; OH/H.

- 20 En particular, R2 es H, R3 es H y R4 es OH (dando como resultado O- α -glucósido de eriodictiol). Alternativamente, R2 es H, R3 es OH y R4 es H (dando como resultado O- α -glucósido de fustina). En un aspecto preferido, R2 es H, y tanto R3 como R4 son OH (dando como resultado O- α -glucósido de taxifolina).

Preferiblemente, el O- α -glucósido fenólico se selecciona del grupo que consiste en el O- α -glucósido de taxifolina, el O- α -glucósido de eriodictiol, el O- α -glucósido de dihidrorobinetina y el O- α -glucósido de fustina.

- 25 En otro aspecto particular de la presente descripción, el O- α -glucósido fenólico tiene la siguiente fórmula:

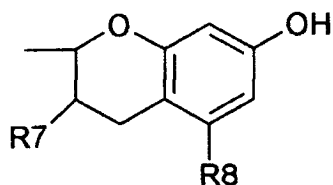


en la que

A y B, idénticos o diferentes, son H o un residuo - α -glucosilo, a condición de que al menos uno de A y B es un residuo - α -glucosilo;

R2 es H o OH; y

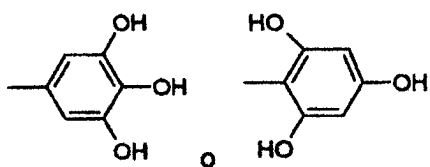
R1 es



5 en donde R7 se selecciona del grupo que consiste en H, -OH o -OCOR y R8 es H o OH, a condición de que, cuando R2 es H, R7 y R8 no son ambos OH, y al menos uno entre R7 y R8 representa OH.

En un aspecto particular de la descripción, R2 es H. En otro aspecto, R2 es OH.

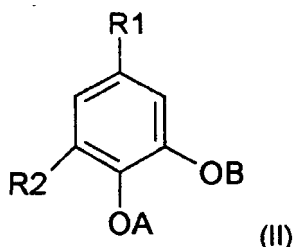
En un aspecto preferido de la descripción, R2 es OH, R8 es OH y R7 es OH o OCOR. En un aspecto más preferido, R7 y R8 son ambos OH. En otro aspecto preferido, R2 es H, R8 es OH y R7 es OCOR. En un aspecto preferido adicional, R2 es H o OH, R7 es -OCOR y R8 es OH. Más preferiblemente, R es



10

Preferiblemente, la O- α -glucosa fenólica se selecciona del grupo que consiste en la O- α -glucosa de epigalocatequina, la O- α -glucosa de galocatequina y la O- α -glucosa de galato de epicatequina.

En un aspecto particular adicional de la presente descripción, la O- α -glucosa fenólica tiene la siguiente fórmula:

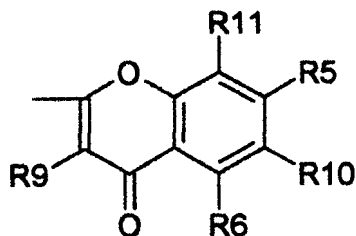


15 en la que

A y B, idénticos o diferentes, son H o un residuo - α -glucosilo, a condición de que al menos uno de A y B es un residuo - α -glucosilo;

R2 es H o OH; y

R1 es



20

en donde R5 es OH o OCH₃; R6 es H o OH, R9 es H o OH, R10 es H, OCH₃ o C₆H₁₁O₅, y R11 es H, OH o C₆H₁₁O₅, a condición de que R10 y R11 no pueden ser ambos H cuando R5 y R6 son ambos OH, y que cuando R10 es C₆H₁₁O₅ entonces R11 es H. En particular, R6, R5 y R11 se pueden seleccionar de las siguientes combinaciones:

a) R6 es OH y R5 es OCH₃ y R11 es H;

25 b) R6 es OH y R5 es OH y R11 es OH;

c) R6 es OH y R5 es OH y R11 es C₆H₁₁O₅; y

d) R6 es H y R5 es OH y R11 es H; y

R9 es H o OH, y R10 es H o OCH₃ o C₆H₁₁O₅,

a condición de que cuando R10 es C₆H₁₁O₅, R11 es H.

5 En un aspecto particular, R2 es H. en otro aspecto, R2 es OH.

En un aspecto preferido, R9 es OH, R10 es H y R11 es H, mientras que R6 es OH y R5 es OCH₃, o R6 es H y R5 es OH. Preferiblemente, R2 es H. Alternativamente, R2 es OH.

En otro aspecto preferido, R9 es H y R10 es OCH₃ o C₆H₁₁O₅. En un aspecto particular de este aspecto, R9 y R11 son H, R10 y R5 son OCH₃, y R6 es OH.

10 En un aspecto preferido adicional, R5 y R6 son ambos OH, R9 es H o OH, R10 es OH o C₆H₁₁O₅, y R11 es H, OH o C₆H₁₁O₅, a condición de que cuando R10 es C₆H₁₁O₅ entonces R11 es H. En otro aspecto preferido, R5 y R6 son ambos OH, R9 es H o OH, R10 es H, y R11 es OH o C₆H₁₁O₅.

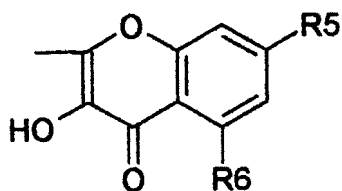
En otro aspecto preferido, R9 es H y R10 es H. En un aspecto preferido adicional, R9 es H, R10 y R5 son OCH₃, y R6 es OH.

15 En un aspecto particular, R2, R5, R6, R9, R10 y R11 se pueden seleccionar de las siguientes combinaciones.

R2	R5	R6	R9	R10	R11
H	OCH ₃	OH	H	H	H
H	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	H
H	OCH ₃	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
H	OCH ₃	OH	OH	H	H
H	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	H
H	OCH ₃	OH	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
H	OH	OH	H	H	OH
H	OH	OH	H	OCH ₃	OH
H	OH	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
H	OH	OH	OH	H	OH
H	OH	OH	OH	OCH ₃	OH
H	OH	OH	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
H	OH	OH	H	H	C ₆ H ₁₁ O ₅
H	OH	OH	H	OCH ₃	C ₆ H ₁₁ O ₅
H	OH	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
H	OH	OH	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅
H	OH	OH	OH	OCH ₃	C ₆ H ₁₁ O ₅
H	OH	OH	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
H	OH	H	H	H	H
H	OH	H	H	OCH ₃	H

R2	R5	R6	R9	R10	R11
H	OH	H	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
H	OH	H	OH	H	H
H	OH	H	OH	OCH ₃	H
H	OH	H	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OCH ₃	OH	H	H	H
OH	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	H
OH	OCH ₃	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OCH ₃	OH	OH	H	H
OH	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	H
OH	OCH ₃	OH	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OH	OH	H	H	OH
OH	OH	OH	H	OCH ₃	OH
OH	OH	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OH	OH	OH	H	OH
OH	OH	OH	OH	OCH ₃	OH
OH	OH	OH	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OH	OH	H	H	C ₆ H ₁₁ O ₅
OH	OH	OH	H	OCH ₃	C ₆ H ₁₁ O ₅
OH	OH	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OH	OH	OH	H	C ₆ H ₁₁ O ₅
OH	OH	OH	OH	OCH ₃	C ₆ H ₁₁ O ₅
OH	OH	OH	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OH	H	H	H	H
OH	OH	H	H	OCH ₃	H
OH	OH	H	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H
OH	OH	H	OH	H	H
OH	OH	H	OH	OCH ₃	H
OH	OH	H	OH	C ₆ H ₁₁ O ₅	H

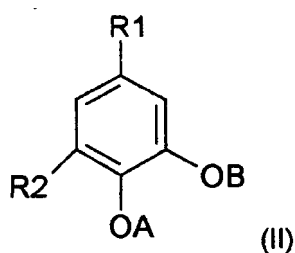
En un aspecto particular de la descripción, R2 es H y R1 es



en donde o bien R6 es OH y R5 es OCH₃ (dando como resultado O- α -glucósido de ramnetina), o bien R6 es H y R5 es OH (dando como resultado O- α -glucósido de fisetina).

- 5 Preferiblemente, la O- α -glucosa fenólica se selecciona del grupo que consiste en la O- α -glucosa de ramnetina, la O- α -glucosa de fisetina, la O- α -glucosa de robinetina, la O- α -glucosa de gosipetina, la O- α -glucosa de orientina, la O- α -glucosa de homoorientina y la O- α -glucosa de circsiliol.

En un aspecto particular adicional de la presente descripción, la O- α -glucosa fenólica tiene la siguiente fórmula:



en la que

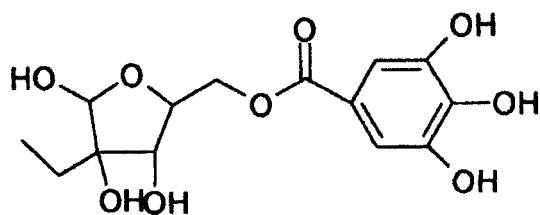
- 10 A y B, idénticos o diferentes, son H o un residuo - α -glucosilo, a condición de que al menos uno de A y B es un residuo - α -glucosilo;

R2 es H o OH; y

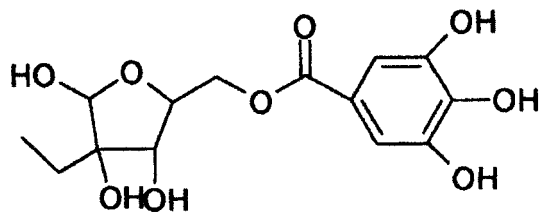
R1 es -(CH₂)_n-COOR o -(CH₂)_n-CONHR, siendo n un número entero de 0 a 2.

En un aspecto particular de la descripción, R2 es H. En otro aspecto, R2 es OH.

- 15 Preferiblemente, R se selecciona del grupo que consiste en H, un alquilo C₁-C₃, preferiblemente metilo, etilo o propilo, y



- 20 En un primer aspecto más preferido, n es 0 y R es preferiblemente H. En un segundo aspecto más preferido, n es 1 y R es preferiblemente H. En un tercer aspecto más preferido, n es 2 y R es preferiblemente H. En otro aspecto preferido, n es 0 y R es un alquilo C₁-C₃, preferiblemente metilo, etilo o propilo, o



En un aspecto preferido de la descripción, R1 es -(CH₂)_n-COOR. En un aspecto preferido, R es H.

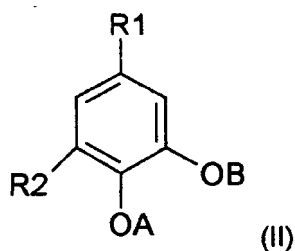
- 25 Preferiblemente, el compuesto fenólico se selecciona del grupo que consiste en el ácido homoprotocatecuico, el ácido dihidrocaféico, el éster etílico del ácido protocatecuico, el galato de propilo, el ácido gálico, la hamamelitanina (2',5-di-O-galoil-hamamelosa) y el ácido protocatecuico.

En un aspecto particular de la descripción, R2 es H y R1 es -COOH (dando como resultado O- α -glucósido de ácido protocatecuico). En otro aspecto particular, R2 es H y R1 es $-(CH_2)_n-COOH$ (dando como resultado O- α -glucósido de ácido hidrocafeico).

El presente aspecto contempla el éster de los mismos y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

- 5 Preferiblemente, el compuesto fenólico se selecciona del grupo que consiste en el O- α -glucósido de ácido homoprotocatecuico, el O- α -glucósido de ácido dihidrocafeico, el O- α -glucósido del éster etílico del ácido protocatecuico, el O- α -glucósido de galato de propilo, el O- α -glucósido de ácido gálico, el O- α -glucósido de hamamelitanina (2',5-di-O-galoil-hamamelosa) y el O- α -glucósido de ácido protocatecuico.

En un aspecto particular adicional de la presente descripción, la O- α -glucosa fenólica tiene la siguiente fórmula:

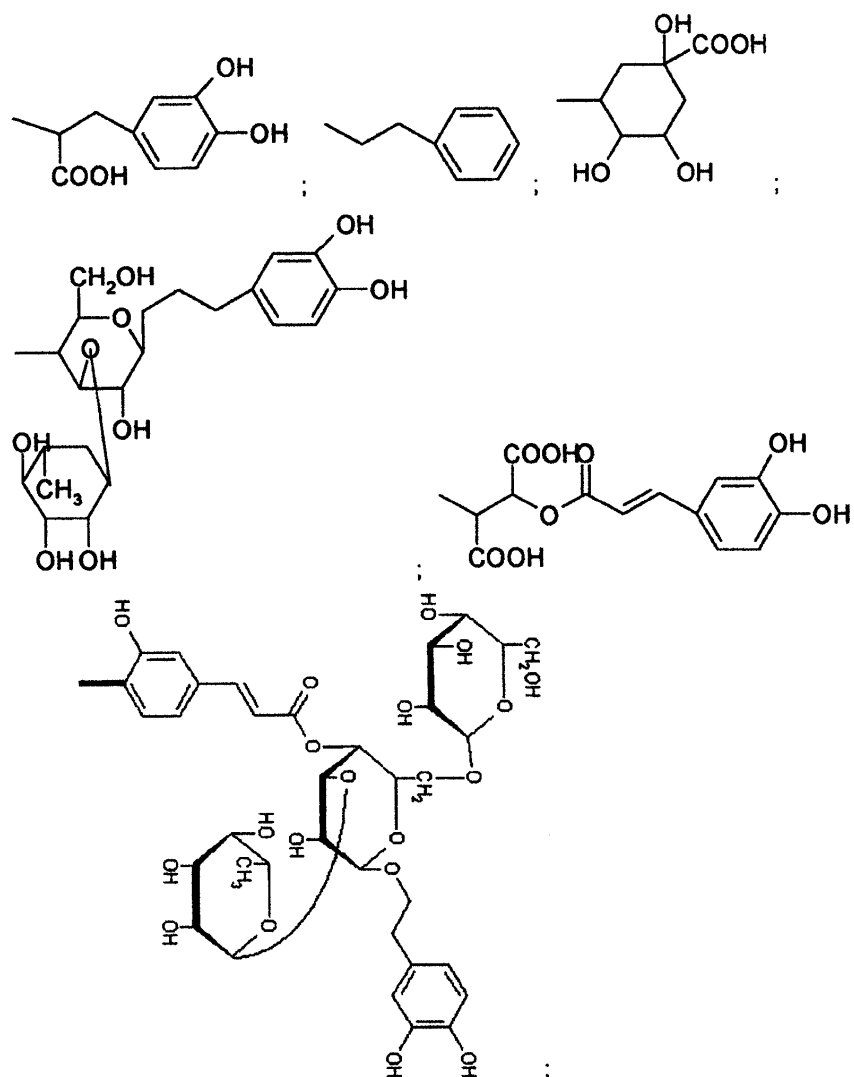


en la que

A y B, idénticos o diferentes, son H o un residuo - α -glucosilo, a condición de que al menos uno de A y B es un residuo - α -glucosilo;

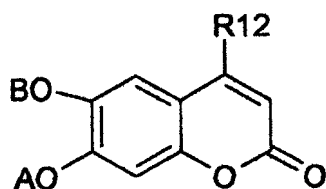
R2 es H o OH; y

- 15 R1 es $-(CR_{12}=CH)-COOR$ o $-(CR_{12}=CH)-CONHR$, siendo R12 H o un alquilo o alqueno C₁-C₆ lineal o cíclico, preferiblemente metilo, etilo, propilo, ciclohexilo o fenilo, más preferiblemente metilo o fenilo. Preferiblemente R1 es $-(CH=CH)-COOR$ o $-(CH=CH)-CONHR$. En un aspecto preferido, R2 es H. Alternativamente, R2 es OH. En un aspecto preferido, R1 es $-(CH=CH)-COOR$. En un aspecto preferido, R se selecciona en el grupo que consiste en H;



y un enlace unido al grupo fenilo de la fórmula (I) en el carbono en orto de R1.

En un aspecto particular de la descripción, R2 es H y R1 es $-(CH=CH)-COOH$ (dando como resultado O- α -glucósido de ácido cafeico). La presente descripción contempla el éster del mismo y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo. En particular, cuando R1 es $-(CH=CH)-COOR$, R se selecciona de ácido 1,3,4,5-tetrahidroxyciclohexanocarboxílico, y que está unido en la posición 3 (dando como resultado O- α -glucósido de ácido clorogénico), (R)-1-carboxi-2-(3,4-dihidroxifenil)etil (dando como resultado O- α -glucósido de ácido rosmarínico), y fenetilo (dando como resultado O- α -glucósido de éster fenetílico de ácido cafeico). En particular, cuando R1 es $-(CR_{12}=CH)-COOR$, R es un enlace unido al grupo fenilo de la fórmula (II) por el carbono en meta de OB dando la siguiente fórmula:

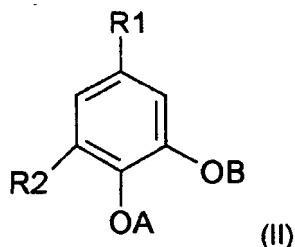


(es decir, cuando R12 es H, entonces O- α -glucósido de esculetina, cuando R12 es metilo, entonces O- α -glucósido de 4-metilesculetina, y cuando R12 es fenilo, entonces O- α -glucósido de nordalbergina). En un aspecto particular, R12 es H.

Preferiblemente, la O- α -glucosa fenólica se selecciona del grupo que consiste en el O- α -glucósido de ácido cafeico, el O- α -glucósido de ácido rosmarínico, el O- α -glucósido de esculetina, el O- α -glucósido de 4-metilesculetina, el O- α -glucósido de nordalbergina (6,7-dihidroxifenilcumarina), el O- α -glucósido de ácido clorogénico, el O- α -glucósido del

éster fenílico del ácido cafeico, el O- α -glucósido de ácido chicórico (ácido dicafeoiltartárico), el O- α -glucósido de equinacósido (O-6-desoxi-alfa-L-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O-(beta-D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6))-, 4-(3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoato de 2-(3,4-dihidroxifenil)etilo), beta-D-glucopiranosido) y el O- α -glucósido de verbascósido.

En un aspecto particular adicional de la presente descripción, la O- α -glucosa fenólica tiene la siguiente fórmula:



5

en la que

A y B, idénticos o diferentes, son H o un residuo - α -glucosilo, a condición de que al menos uno de A y B es un residuo - α -glucosilo;

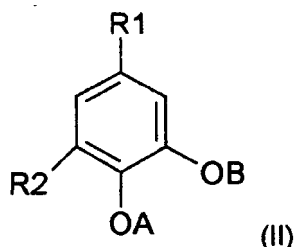
R2 es H o OH; y

10 R1 es $-(CH_2)_n-OR$, siendo n un número entero de 0 a 2.

En un aspecto particular, R2 es H. En otro aspecto, R2 es OH.

En un aspecto preferido n es 2. Preferiblemente, el O- α -glucósido fenólico es el O- α -glucósido de hidroxitirosol.

En un aspecto particular adicional de la presente descripción, el O- α -glucósido fenólico tiene la siguiente fórmula:



15 en la que

A y B, idénticos o diferentes, son H o un residuo - α -glucosilo, a condición de que al menos uno de A y B es un residuo - α -glucosilo;

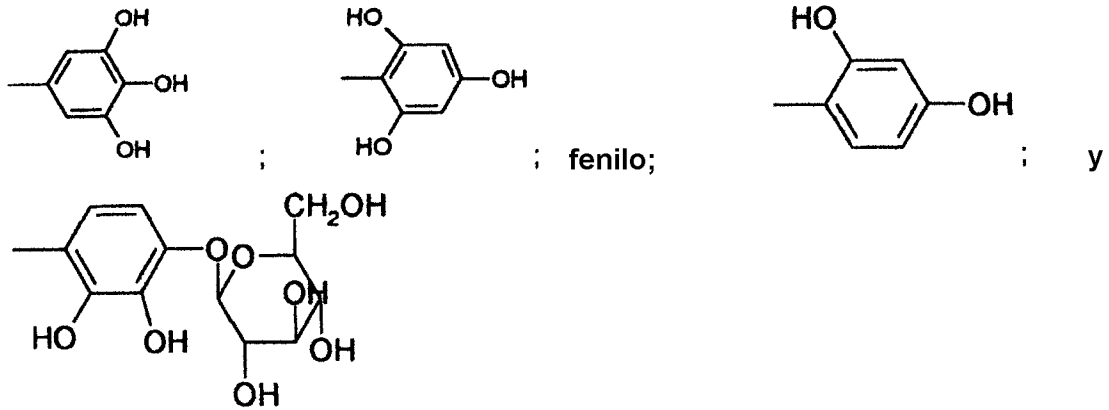
R2 es H o OH; y

R1 es $-(CH_2)_n-COR$ o $-(CH=CH)_n-COR$, siendo n un número entero de 0 a 2.

20 En un aspecto particular, R2 es H. En otro aspecto, R2 es OH.

En un aspecto preferido, n es 0 o 1 y R se selecciona en el grupo que consiste en

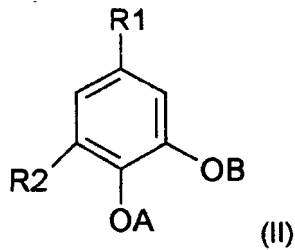
H; un alquilo C₁-C₃, preferiblemente metilo, etilo o propilo, más preferiblemente un metilo;



Preferiblemente, n es 0. Alternativamente, n es 1.

5 Preferiblemente, el O- α -glucósido fenólico se selecciona del grupo que consiste en el O- α -glucósido de maclurina, el O- α -glucósido de 3,4-dihidroxibenzaldehído, el O- α -glucósido de 3,4-dihidroxibenzofenona, el O- α -glucósido de buteína (2,3,4,4'-tetrahidroxichalcona), el O- α -glucósido de 3,4-dihidroxiacetofenona, el O- α -glucósido de mareína (2',3,3',4,4'-pentahidroxichalcona), y el O- α -glucósido de eriodictiolchalcona (2',4',6',3,4-pentahidroxichalcona).

En un aspecto particular adicional de la presente descripción, el O- α -glucósido fenólico tiene la siguiente fórmula:

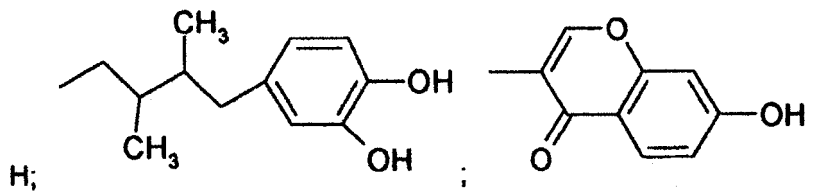


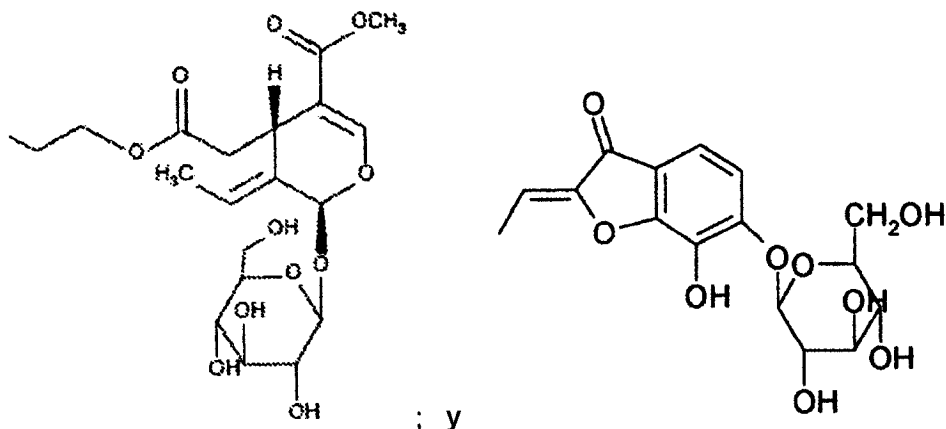
en la que

10 A y B, idénticos o diferentes, son H o un residuo - α -glucosilo, a condición de que al menos uno de A y B es un residuo - α -glucosilo;

R2 es H o OH; y

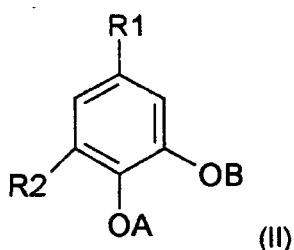
R1 se selecciona del grupo que consiste en





Preferiblemente, el O- α -glucósido fenólico se selecciona del grupo que consiste en el O- α -glucósido de oleuropeína, el O- α -glucósido de ácido nordihidroguaiarético, el O- α -glucósido de pirocatecol, el O- α -glucósido de 3-hidroxidaidzeína y el O- α -glucósido de maritimaína (3',4',6,7-tetrahidroxi-6-O-glucosilaurona).

5 En un aspecto particular adicional de la presente descripción, el O- α -glucósido fenólico tiene la siguiente fórmula:

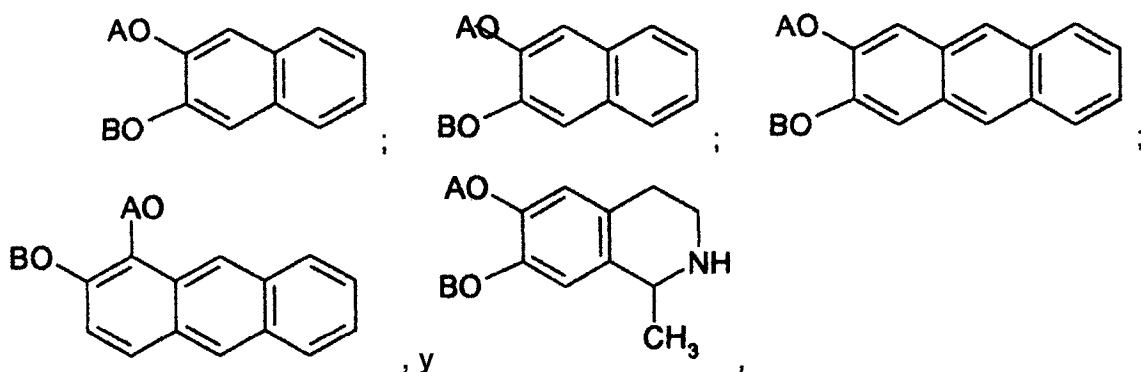


en la que

A y B, idénticos o diferentes, son H o un residuo - α -glucosilo, a condición de que al menos uno de A y B es un residuo - α -glucosilo;

10 R2 es H o OH; y

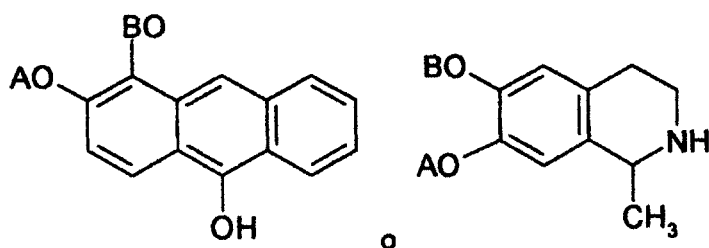
R1 es un grupo hidrocarbonado C₁-C₁₀ que forma con el anillo representado de la fórmula (I) un anillo aromático condensado (bi- o tricíclico) junto con el carbono orto de R1. En particular, el O- α -glucósido fenólico se puede seleccionar del grupo que consiste en



15 dicho anillo condensado puede estar opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo y puede estar sustituido por uno o varios sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en: un alcoxi (C₁-C₃), un acilo (C₂-C₃), un alcohol (C₁-C₃), un grupo carboxílico (-COOH), un éster (C₂-C₃), una amina (C₁-C₃), un grupo amino (-NH₂), una amida (-CONH₂), una imina (C₁-C₃), un nitrilo, un hidroxilo (-OH), un grupo aldehído (-CHO), un halógeno, un halogenoalquilo (C₁-C₃), un tiol (-SH), un tioalquilo (C₁-C₃), una sulfona (C₁-C₃), un sulfóxido (C₁-C₃), y una combinación de los mismos.

20

En un aspecto preferido particular, el O- α -glucósido del compuesto fenólico es



El residuo O- α -glucosilo se refiere en la presente memoria a un monómero, dímero, trímero, tetrámero, pentámero o más de glucosa. Preferiblemente, el residuo O- α -glucosilo es un monómero, dímero o trímero, a saber glucosilo, diglucosilo o triglucosilo. Aún más preferiblemente, el residuo O- α -glucosilo es un monómero de glucosa. En un aspecto particular el residuo O- α -glucosilo está unido al compuesto fenólico por el carbono en la posición 1. En un aspecto preferido, OA es OH y OB es un residuo O- α -glucosilo. En otro aspecto preferido, OB es OH y OA es un residuo O- α -glucosilo.

En un aspecto particular, R puede ser un monosacárido. En otro aspecto particular, R es un alquilo (C₁-C₆) o un alquilo (C₁-C₃).

Tales sales incluyen sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables, sales de adición de base farmacéuticamente aceptables, sales metálicas farmacéuticamente aceptables, sales de amonio y amonio alquilado. Las sales de adición de ácido incluyen sales de ácidos inorgánicos así como de ácidos orgánicos. Los ejemplos representativos de ácidos inorgánicos adecuados incluyen clorhídrico, bromhídrico, yodhídrico, fosfórico, sulfúrico, perclórico, y similares. Los ejemplos representativos de ácidos orgánicos adecuados incluyen fórmico, acético, tricloroacético, trifluoroacético, propiónico, benzoico, cinámico, cítrico, fumárico, y similares. Ejemplos adicionales de sales de adición de ácido inorgánico u orgánico farmacéuticamente aceptables incluyen las sales farmacéuticamente aceptables enumeradas en J. Pharm. Sci. 1977, 66, 2, y en Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use editado por P. Heinrich stahl y Camille G. Wermuth 2002. Los ejemplos de sales metálicas incluyen sales de litio, sodio, potasio, magnesio y similares. Los ejemplos de sales de amonio y de amonio alquilado incluyen sales de amonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, etilamonio, hidroxietilamonio, dietilamonio, butilamonio, tetrametilamonio y similares. Los ejemplos de bases orgánicas incluyen lisina, arginina, guanidina, dietanolaminolina y similares.

Liberación *in situ* de las agliconas.

Sorprendentemente, los inventores encontraron que los O- α -glucósidos fenólicos de la presente descripción pueden ser escindidos por α -glucosidasas conduciendo a la liberación *in situ* de los compuestos fenólicos.

Todos los O- α -glucósidos fenólicos de la presente descripción tienen al menos un enlace O- α -glucósido. Este enlace puede ser hidrolizado específicamente por enzimas, tales como α -glucosidasas (EC 3.2.1.20) para liberar el residuo glucosilo y la parte aglicona. Cuando se consigue *in situ*, esta liberación tiene varias ventajas:

- permite liberar la aglicona escasamente soluble (que puede ser más activa que el derivado glicósido) después de su administración/inyección/aplicación bajo una forma de glicósido soluble, y/o
- la liberación *in situ* puede ser dependiente del tiempo (si se consigue mediante enzimas expresadas por microorganismos: cuanto más densa sea la población bacteriana, más liberación de agliconas ocurrirá), y/o
- la liberación *in situ* puede ser controlada por una administración/inyección/aplicación *in situ* de una α -glucosidasa o de un microorganismo que expresa tal actividad enzimática.

Estas ventajas son importantes en la formulación de fenólicos en preparaciones cosméticas o dermocosméticas. En un aspecto preferido de la presente descripción, dichos O- α -glucósidos fenólicos pueden ser activados *in situ* por enzima(s) expresadas por microorganismos asociados a humanos, y más preferiblemente por microorganismos asociados a la piel humana. Los ejemplos conocidos y no exhaustivos de tales microorganismos comensales o no comensales humanos incluyen *Streptococcus Species*, *Staphylococcus Species*, *Enterococcus Species*, *Escherichia Coli*, *Bacilli*, *Corynebacterium Species*, *Propionibacterium Species*. Cuando se aplican sobre la piel, los O- α -glucósidos fenólicos de la presente descripción son convertidos por microorganismos asociados a la piel en la parte aglicona y el residuo glucosilo. Tales bacterias se pueden encontrar en los seres humanos en la boca, tracto intestinal, tracto genital y sistema respiratorio superior.

En otro aspecto preferido de la presente descripción, dichos O- α -glucósidos fenólicos pueden ser activados *in situ* por una α -glucosidasa (EC 3.2.1.20), tal como α -glucosidasa de *Saccharomyces Cerevisiae*.

Así, los O- α -glucósidos fenólicos de la presente descripción tienen un status de pro-fármaco, ya que la parte activa de la molécula (las agliconas) puede ser liberada *in situ*.

Por lo tanto, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica o cosmética que comprende un O- α -glucósido fenólico de la presente descripción o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La presente descripción también se refiere a O- α -glucósidos fenólicos de la presente descripción o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como medicamento. El medicamento puede ser terapéutico o profiláctico. Los O- α -glucósidos fenólicos de la presente descripción tienen varias actividades, entre las cuales hay acciones antivirales, antibacterianas, estimulantes del sistema inmune, antialérgicas, antihipertensivas, antiisquémicas, antiaritmias, antitrombóticas, hipocolesterolémicas, antilipoperoxidantes, hepatoprotectoras, antiinflamatorias, anticarcinogénicas, antimutagénicas, antineoplásicas, antitrombóticas y vasodilatadoras.

En un aspecto particular, la composición puede comprender además una O- α -glucosidasa (EC 3.2.1.20) o un microorganismo que expresa actividad O- α -glucosidasa. Preferiblemente, la O- α -glucosidasa es de *Saccharomyces Cerevisiae*. En particular, la O- α -glucosidasa (ES 3.2.1.20) o un microorganismo que exprese actividad O- α -glucosidasa está presente en la composición en una forma inactiva y la O- α -glucosidasa es activada justo en el momento de administración. Por ejemplo, la composición puede ser formulada en forma seca, conduciendo la ausencia de agua a la inactivación de la O- α -glucosidasa; después de la adición de agua, la enzima se hará activa y será capaz entonces de hidrolizar el enlace glucosídico. La enzima y los O- α -glucósidos fenólicos pueden ser puestos en dos preparaciones líquidas diferentes que serán mezcladas justo en el momento de administración. Si la enzima y los O- α -glucósidos fenólicos son puestos en la misma disolución, es posible usar un inhibidor reversible de la enzima que será diluido después de la administración, permitiendo así que la enzima recupere su capacidad de hidrolizar los O- α -glucósidos fenólicos. Los O- α -glucósidos fenólicos de la presente descripción y la O- α -glucosidasa o un microorganismo que exprese actividad O- α -glucosidasa también pueden estar separados físicamente (p.ej., microcápsula).

La presente descripción se refiere al uso de un O- α -glucósido fenólico de la presente descripción o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para preparar una composición farmacéutica o cosmética para tratar o prevenir un cáncer, una enfermedad cardiovascular, una infección bacteriana, un eritema inducido por UVB, una alergia, un trastorno inflamatorio o inmune. En particular, el cáncer es un tumor sólido, por ejemplo un cáncer de mama o colon. En particular, la alergia puede ser rinoconjuntivitis alérgica. Por lo tanto, la presente descripción también se refiere a un método para tratar o prevenir un cáncer, una enfermedad cardiovascular, una infección bacteriana, un eritema inducido por UVB, una alergia, un trastorno inflamatorio o inmune, que comprende administrar un O- α -glucósido fenólico de la presente descripción o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Además, el método puede comprender adicionalmente la etapa de administrar secuencial o simultáneamente una O- α -glucosidasa (EC 3.2.1.20) o un microorganismo que expresa actividad O- α -glucosidasa. Preferiblemente, la O- α -glucosidasa (EC 3.2.1.20) o un microorganismo que expresa actividad O- α -glucosidasa es administrada por la misma ruta.

En un aspecto particular, la presente descripción se refiere al uso de un O- α -glucósido fenólico de la presente descripción para preparar una composición farmacéutica o cosmética para ser administrada por vía tópica (es decir, sobre la piel), en donde enzimas emitidas por microorganismos asociados a la piel liberan la correspondiente aglicona. Además, la presente descripción se refiere al uso de un O- α -glucósido fenólico de la presente descripción para preparar una composición farmacéutica o cosmética para ser administrada por vía oral, en donde enzimas emitidas por microorganismos asociados a la boca y al tracto intestinal liberan la correspondiente aglicona. La presente descripción también se refiere al uso de un O- α -glucósido fenólico de la presente descripción para preparar una composición farmacéutica o cosmética para ser administrada por vía rectal, en donde enzimas emitidas por microorganismos asociados al tracto intestinal liberan la correspondiente aglicona. La presente descripción se refiere además al uso de un O- α -glucósido fenólico de la presente descripción para preparar una composición farmacéutica o cosmética para ser administrada por vía nasal, en donde enzimas emitidas por microorganismos asociados al sistema respiratorio superior liberan la correspondiente aglicona. La presente descripción se refiere además al uso de un O- α -glucósido fenólico de la presente descripción para preparar una composición farmacéutica o cosmética para ser administrada por vía vaginal, en donde enzimas emitidas por microorganismos asociados al tracto genital femenino liberan la correspondiente aglicona.

La presente descripción también se refiere a una combinación de un O- α -glucósido fenólico de la presente descripción o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con una O- α -glucosidasa (EC 3.2.1.20) o un microorganismo que expresa actividad O- α -glucosidasa para una administración simultánea o secuencial. Cuando se realiza una administración simultánea, los O- α -glucósidos fenólicos de la presente descripción o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos y la O- α -glucosidasa (EC 3.2.1.20) o un microorganismo que expresa actividad O- α -glucosidasa pueden ser administrados en la misma o diferentes composiciones.

Tal composición puede comprender vehículos, estabilizantes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Uso de compuestos fenólicos como intermedios clave para el desarrollo de otros derivados

Los O- α -glucósidos fenólicos de la presente descripción se pueden usar directamente como ingredientes activos como cosméticos o como sustancias activas, solos o en combinación con otros productos, que incluyen otras moléculas activas con actividades sinérgicas o complementarias, o con estabilizantes o excipientes. Estos derivados de compuestos fenólicos también se pueden usar como materiales de partida para modificaciones

químicas, físicas o enzimáticas adicionales, a fin de producir una segunda generación de derivados. Como la reacción enzimática usada en la presente descripción se refiere a posiciones específicas del hidroxilo en el anillo de catecol del compuesto fenólico, los otros grupos hidroxilo se pueden usar por ejemplo en una reacción química para crear enlaces éster, enlaces acilo, enlaces sulfato o fosfato. Tales modificaciones pueden mejorar propiedades ya existentes de los O- α -glucósidos fenólicos de la presente descripción, o proporcionar nuevas propiedades para aplicaciones específicas (eficacia terapéutica superior, menor citotoxicidad, mayor estabilidad tras la liberación de la parte glicona por microorganismos...).

Formulación de dichos derivados para aplicaciones cosméticas o terapéuticas

Las composiciones de la presente descripción se pueden administrar por vía oral, parenteral, por pulverizador de inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un reservorio implantado. El término "parenteral", como se emplea en la presente memoria, incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intrasinoval, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Preferiblemente, la composición de la presente descripción se administra por vía oral, mediante pulverizador de inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal o vaginal. En un aspecto preferido, la composición farmacéutica o cosmética se administra por vía tópica.

Se están desarrollando constantemente nuevos tipos de productos cosméticos, y se están añadiendo nuevas materias primas a la selección de ingredientes para el cuidado personal del farmacéutico cosmético. Los O- α -glucósidos fenólicos descritos en la presente descripción pueden ser incorporados fácilmente en un gran conjunto de productos cosméticos. Tales preparaciones son bien conocidas por el experto en la técnica: pueden ser cremas, barras, champús, geles de ducha, lociones, jabones, emulsiones, geles. Estas formulaciones pueden incluir otros ingredientes tales como, pero que no se limitan a: agua desionizada, silicato de magnesio, silicato de aluminio, goma xantana, nylon-12, PCA de sodio, propilenglicol, óxidos de hierro rojos, talco, óxidos de hierro amarillos, óxidos de hierro negros, dióxido de titanio, estearato de glicerilo, ácido esteárico, fosfato de DEA-cetilo, metilparabeno, butilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, neopentanoato de isotearilo, palmitato de isopropilo, copolímeros de etileno/propileno/estireno, copolímero de butileno/etileno/estireno, palmitato de isopropilo, tocoferilacetato de fenoxietanol, glicerina, trietanolamina, ácido esteárico, estearato de propilenglicol, aceite mineral, copolímero de butileno/etileno/estireno, diazolidinilurea, poliisobuteno hidrogenado, palmitato de octilo, neopentanoato de tridecilo, isotearato de isoestearilo, isopropilparabeno, isobutilparabeno, neopentanoato de octildodecilo, acetato de tocoferilo, fragancia, metoxicinamato de octilo, benzofenona, salicilato de octilo, isoestearato de isopropilo, isoceteth-3-acetato de propilenglicol, o cualesquiera combinaciones de los mismos.

Para su uso en aplicaciones terapéuticas, los O- α -glucósidos fenólicos de la presente descripción pueden ser incorporados en diferentes preparaciones galénicas, tales como píldoras, comprimidos, jarabes, cremas, lociones, geles, usando por ejemplo envasado, estandarización, mezcla/homogeneización, micronización estéril y no estéril, granulización/compactación, tamizado o cualquier combinación de los mismos. Las preparaciones de dichos O- α -glucósidos fenólicos pueden incluir algunos excipientes de la siguientes lista no exhaustiva: talco, lactosa, estearato de magnesio, monoestearato de glicerol, dióxido de silicio coloidal, dióxido de silicio precipitado, polivinilpirrolidona reticulada, fosfato dibásico de calcio dihidrato, celulosa microcristalina, almidón de maíz, povidona, carboximetilcelulosa de sodio, polisorbato 80, ácido láctico, carbómero, alcohol cetílico, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, glucosa, dextrosa, trietanolamina, glicerina, fructosa, sacarosa, polímeros, nanoestructuras.

Las composiciones de esta descripción se pueden administrar por vía oral en cualquier forma de dosificación oral aceptable que incluye, pero no se limita a, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los excipientes usados comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. También se añaden típicamente agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio. Para administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

Alternativamente, las composiciones de esta descripción se pueden administrar en la forma de supositorios para administración rectal. Estos se pueden preparar mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal, y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

Las composiciones de esta descripción también se pueden administrar por vía tópica, especialmente cuando el objetivo del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica, incluyendo enfermedades del ojo, la piel, o el tracto intestinal inferior. Se preparan fácilmente formulaciones tópicas adecuadas para cada una de estas áreas u órganos.

Para aplicaciones tópicas, las composiciones se pueden formular en una pomada adecuada que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más excipientes. Los excipientes para administración tópica de los compuestos de esta descripción incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, las composiciones se pueden formular en una loción o crema adecuada que contiene los componentes activos

suspendidos o disueltos en uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

5 Para uso oftálmico, las composiciones se pueden formular como suspensiones micronizadas en suero salino estéril de pH ajustado, isotónico, o, preferiblemente, como disoluciones en suero salino estéril de pH ajustado, isotónico, bien con o bien sin un conservante tal como cloruro de benzalconio. Alternativamente, para usos oftálmicos, las composiciones se pueden formular en una pomada tal como vaselina.

10 Las composiciones de esta descripción también se pueden administrar por aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones se preparan según técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica, y se pueden preparar como disoluciones en suero salino, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/o otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

15 Las formas inyectables estériles de las composiciones de esta descripción pueden ser suspensiones acuosas u oleaginosas. Estas suspensiones se pueden formular según técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo como una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, disolución de Ringer y disolución de cloruro de sodio isotónica. Además, se emplean convencionalmente aceites estériles, no volátiles, como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite no volátil suave, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, tales como ácido oleico y sus derivados glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, ya que son aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante alcohólico de cadena larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables, que incluyen emulsiones y suspensiones. Otros tensioactivos usados comúnmente, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas de dosificación sólidas, líquidas u otras, también se pueden usar para los fines de la formulación.

Ventajas de la presente descripción

30 Las ventajas del método de la presente descripción sobre los métodos preexistentes aparecen claramente a partir de las descripciones y aspectos previos. Se describe a continuación una lista no exhaustiva de otras ventajas de la presente descripción.

La presente descripción describe O- α -glucósidos fenólicos de

- ácido protocatecuico y sus derivados ésteres,
- 35 - ácido cafeico y sus derivados ésteres, especialmente éster fenílico del ácido rosmarínico, ácido clorogénico y ácido cafeico, y ácido hidrocafeico o ácido 3,4-dihidroxihipocinámico, ácido 3,4-dihidroxihipocinámico y ácido 3,4-dihidroxihipocinámico,
- esculetina,
- taxifolina,
- 40 - fustina,
- eriodictiol,
- fisetina,
- y ramnetina.

45 Preferiblemente, los O- α -glucósidos fenólicos de la presente descripción se seleccionan en el grupo que consiste en el O- α -glucósido de galato de epicatequina, el O- α -glucósido de eriodictiol, el O- α -glucósido de esculetina, el O- α -glucósido de fisetina, el O- α -glucósido de fustina, el O- α -glucósido de ácido homoprotocatecuico, el O- α -glucósido de ácido protocatecuico, el O- α -glucósido de éster etílico de ácido protocatecuico, el O- α -glucósido de hidroxitirosol, el O- α -glucósido de maclurina, el O- α -glucósido de ácido nordihidroguaiarético, el O- α -glucósido de oleuropeína, el O- α -glucósido de pirocatecol, el O- α -glucósido de ramnetina, el O- α -glucósido de ácido rosmarínico, el O- α -glucósido de taxifolina, el O- α -glucósido de 3-hidroxiidaizeína, el O- α -glucósido de 3,4-dihidroxibenzofenona, el O- α -glucósido de ácido cafeico, el O- α -glucósido de ácido dihidrocafeico, el O- α -glucósido de éster fenílico de ácido cafeico, el O- α -glucósido de cirsiolol, el O- α -glucósido de ácido clorogénico y el O- α -glucósido de antrabina, el O- α -glucósido de epigalocatequina, el O- α -glucósido de dihidrorobinetina, el O- α -glucósido de galocatequina, el O- α -glucósido de ácido gálico, el O- α -glucósido de galato de propilo, y el O- α -glucósido de robinetina.

Estos O- α -glucósidos fenólicos de alto interés en los campos de la cosmética y la terapia muestran una solubilidad en agua mejorada. En efecto, se ha observado un aumento hasta en al menos 20, 30 o 50 veces de la solubilidad en comparación con la correspondiente aglicona en las mismas condiciones fisiológicas.

5 Estos O- α -glucósidos fenólicos tienen una biodisponibilidad aumentada. Estos O- α -glucósidos fenólicos pueden ser "activados *in situ*" mediante su hidrólisis en la estructura fenólica inicial por microorganismos comensales humanos, dándoles un status de "profármaco" de alto interés para aplicaciones tanto de cosmética como de terapia. También pueden ser activados con una α -glucosidasa, tal como la α -glucosidasa producida por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

10 Estos O- α -glucósidos fenólicos se obtienen mediante un procedimiento enzimático de "química verde", de bajo coste, fiable, probado, que asegura una alta calidad de estos productos (debido a la especificidad y selectividad de la enzima usada).

EJEMPLOS

Cualesquiera otros aspectos y ventajas de la presente descripción aparecerán a partir de los siguientes ejemplos, que son ilustrativos de aspectos de la descripción.

15 **EJEMPLO 1 : Síntesis de taxifolina glucosilada; solubilidad en agua de taxifolina glucosilada altamente purificada y estabilidad de la molécula derivada glucosilada a temperaturas que oscilan de 4°C a 45°C**

Las condiciones que se llevaron a cabo para la síntesis de taxifolina glucosilada son como sigue (cantidades para 1 litro de medio de reacción):

ingrediente	Origen	Cantidad	Concentración
Disolución de taxifolina a 90 g/L en DMSO puro	Taxifolina: SIGMA T 4512	100 ml	Taxifolina: 9 g/L
DMSO	Riedel de Haën 60153	250 ml	DMSO total: 350 ml/L
Tampón acetato de sodio 500 mM pH 5,2	Ácido acético: Prolabo 20104.298 Hidróxido de sodio: Riedel de Haën 6203	40 ml	Acetato de sodio: 20 mM
Sacarosa a 500 g/L (1,462 M)	Prolabo 27478.296	300 ml	150 g/L 0,439 M
Agua	Desionizada	QSP 1,00 L	#
Cloruro de calcio, dihidrato	Merck 1.02382.0500 (también se puede introducir en el medio de reacción en la forma de una disolución a 2 g/L; la dosis es entonces 5 ml/L)	10 mg	10 mg/L
Preparación de dextranosa (18 U/ml)	Purificada de caldo de cultivo de <i>L. mesenteroides</i> NRRL B-512F	170 ml	3,1 U/ml

20 Se obtuvo primero el medio de reacción sin la enzima mezclando las diversas disoluciones en el orden indicado en la tabla. La mezcla se incubó a 30°C durante un periodo de tiempo suficiente para alcanzar la temperatura deseada de 30°C (más o menos 0,2°C). Después, la reacción se inició introduciendo la preparación de la enzima. El medio de reacción puede ser agitado moderadamente.

25 La preparación de la enzima se ha obtenido como sigue: el caldo de cultivo de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512-F, que titulaba una actividad enzimática que oscilaba de 4 a 6 U/ml, se centrifuga a fin de separar completamente las células microbianas del líquido que contiene la enzima. El sobrenadante de la centrifugación se concentró después 4 a 10 veces por ultrafiltración tangencial (corte de peso molecular de 100 kDa). El retenido se

- diluyó después 4 veces con tampón acetato 20 mM, pH 5,2, que contenía cloruro de calcio dihidrato a 10 mg/l, y después se concentro 4 veces a fin de retirar extensivamente los componentes de bajo peso molecular residuales del medio de cultivo celular que contenía la enzima. La preparación de enzima purificada se ha almacenado después en forma congelada (-20°C) o liofilizada hasta varios meses sin pérdida de actividad. Como procedimiento general, la actividad de la preparación de enzima se ajusta intensificando la concentración del retenido para que el volumen de la preparación de enzima no sea más alto que 20% del volumen final del medio de reacción de síntesis.
- El medio de reacción se incubó a 30°C (más o menos 0,2°C) durante 22 horas. Se tomó una alícuota del medio de reacción y se diluyó 50 veces con una disolución que contenía metanol y agua en las proporciones 40/60. Después la disolución metanólica se analizó por HPLC.
- Las condiciones de análisis fueron las que se describieron previamente, excepto que el perfil de la concentración de metanol fue como sigue (Método 2):
- disolvente A: agua desionizada que contiene ácido acético al 1% v/v
 - disolvente B: metanol de grado HPLC que contiene ácido acético al 1% v/v
 - 0 a 10 minutos: 60% A; 40% B; 1 ml/minuto
 - 10 a 12 minutos: 60% a 20% A (lineal); 40% a 80% B (lineal); 1 ml/minuto
 - 12 a 14 minutos: 20% A; 80% B; 1 ml/minuto
 - 14 a 16 minutos: 20% a 60% A (lineal); 80% a 40% B (lineal); 1 ml/minuto
 - 16 a 25 minutos: 60% A; 40% B; 1 ml/minuto
 - 25 minutos: siguiente inyección
- La Figura 7 muestra el cromatograma de HPLC del medio de reacción que contiene taxifolina como aceptor de glucósido (289 nm) justo en el comienzo de la incubación. El pico principal a 8,15 minutos corresponde a taxifolina.
- La Figura 8 muestra el cromatograma de HPLC del medio de reacción que contiene taxifolina como aceptor de glucósido (289 nm) después de 22 horas de incubación. Se observó un pico con un tiempo de retención de 6,15 minutos.
- La Figura 9 muestra el espectro de masas y la Figura 10 el espectro UV del pico eluido a alrededor de 8,15 minutos: la sustancia es taxifolina (m/z [M-H]: 302,96 y m/z [M-H₂O]: 284,96) cuyo peso molecular es 304.
- La Figura 11 muestra el espectro de masas y la Figura 12 el espectro UV del pico eluido a alrededor de 6,15 minutos: la sustancia correspondiente es glucósido de taxifolina (m/z [M-H]: 464,98) dado que su peso molecular es 466.
- Las sustancias eluidas a 9,33 y 12,75 minutos son sustancias polifenólicas encontradas en la preparación de taxifolina.
- La Figura 13 muestra el cromatograma de HPLC de una disolución acuosa que contiene taxifolina y glucósido de taxifolina después de llevar a cabo la purificación para retirar la enzima, dextrano, fructosa y DMSO y una fracción de taxifolina residual. Las condiciones de elución son las descritas previamente, en las que el contenido inicial de metanol es 10% (método 1). La taxifolina es eluida a 24,01 minutos y el glucósido de taxifolina a 22,33 minutos.
- El glucósido de taxifolina ha sido purificado extensivamente para reducir tanto como fuera posible la concentración de taxifolina. Se obtuvo finalmente una disolución que titulaba más que 93 mM de glucósido de taxifolina con una concentración residual de taxifolina menor que 2 mM (Figura 14; la taxifolina eluyó a 8,95 minutos y el glucósido de taxifolina eluyó a 6,55 minutos).
- Las concentraciones de glucósido de taxifolina se determinaron con sigue: después de haber establecido la relación entre la concentración molar de taxifolina y las áreas de picos con una preparación de taxifolina caracterizada con precisión (SIGMA), las concentraciones de glucósido de taxifolina se determinaron aplicando la relación entre área y concentración al glucósido de taxifolina, dado que la taxifolina y el glucósido de taxifolina tienen los mismos espectros UV. Después, se obtuvieron las concentraciones en g/L multiplicando la concentración molar por el valor del peso molecular del glucósido de taxifolina (466). Mientras que la solubilidad de la taxifolina en agua a 25°C se mide a 1,19 g/L (3,91 mM), la solubilidad del glucósido de taxifolina en agua a 25°C es mayor que 43,5 g/L (93,2 mM).
- Es posible, por tanto, según el método descrito, sintetizar una nueva sustancia, glucósido de taxifolina, con un peso molecular de 466 y una solubilidad en agua a alrededor de 25°C mayor que 93 mM, que corresponde a un

aumento en la solubilidad en agua con respecto al residuo de taxifolina superior a 23. El glucósido de taxifolina se puede purificar según técnicas mencionadas previamente (adsorción en resinas, elución, concentración, extracción líquido líquido, retirada de disolvente y concentración y eventualmente secado).

5 La disolución de glucósido de taxifolina se puede almacenar durante un periodo de tiempo largo sin pérdida del enlace glucosídico y con una resistencia a la oxidación muy satisfactoria.

Se realizaron estudios de periodo de conservación acelerado usando cámaras de temperatura a 4°C, 22°C, 37°C y 45°C durante 4 meses. El contenido de glucósido de taxifolina se midió frecuentemente, y el color y olor se controlaron de manera somera. El contenido de glucósido de taxifolina se determinó por HPLC como se describió anteriormente (dilución 500 veces de una alícuota de la disolución y análisis usando el método 2; detección: 210-400 nm).

La siguiente tabla describe la cantidad observada de glucósido de taxifolina frente al tiempo de almacenamiento a diferentes temperaturas de almacenamiento.

Días	Cantidad medida de glucósido de taxifolina (en % de la cantidad inicial)			
	Almacenado a +4°C	Almacenado a +22°C	Almacenado a +37°C	Almacenado a +45°C
0	100	100	100	100
9	100	100	100	100
23	100	100	100	91
37	100	100	100	94
63	100	95	96	79
118	100	100	91	73

No se han observado cambios de color ni olor cualquiera que fuera la temperatura de almacenamiento.

15 Por lo tanto, el enlace glucosídico entre la taxifolina y el resto de glucosa es estable en las condiciones ensayadas anteriormente. A 37°C y 45°C, se ha observado una ligera degradación para el glucósido de taxifolina, debida probablemente a oxidación: en efecto, no se observó un aumento de la concentración de taxifolina que indicara una hidrólisis del enlace glucosídico en las correspondientes disoluciones. En las condiciones mencionadas anteriormente, la semivida del glucósido de taxifolina se estima en 1,6 años a 37°C, y 0,67 años a 45°C.

20 Este ejemplo demuestra que el glucósido de taxifolina tiene una alta estabilidad química, incluso en condiciones de almacenamiento duras.

EJEMPLO 2 : Influencia de la concentración de DMSO sobre la eficacia de las síntesis de glucósido de taxifolina

25 Se llevó a cabo la síntesis enzimática de glucósido de taxifolina como se describe en el Ejemplo 1, con las siguientes excepciones:

- la concentración de enzima fue 1 U/ml
- la concentración de DMSO fue 35%, 25%, 15% ó 5%.

Después de 22 horas de incubación, las concentraciones relativas de glucósido de taxifolina en los cuatro medios de reacción se presentan en la siguiente tabla.

DMSO, %	35	25	15	5
Glucósido de taxifolina (concentración relativa), %	100	133	161	17

30 La concentración de DMSO óptima para la síntesis de glucósido de taxifolina parece estar en un valor

significativamente más bajo que 30% y cercano a 15%.

EJEMPLO 3 : Activación del glucósido de taxifolina por microflora de piel humana

5 Se recogió por separado flora cutánea de 5 donantes. Los antebrazos y frente de cada donante fueron raspados con un hisopo de algodón-lana saturado con una disolución de NaCl ($v = 5 \text{ ml}$, 8 g/l). Después de cada raspado, el hisopo fue dividido en la disolución de NaCl restante y exprimido para entregar el material muestreado. Después de dos ciclos de raspado/exprimido sobre ambos antebrazos y tres sobre la frente, la preparación problema obtenida se filtró ($40 \mu\text{m}$) para eliminar las escamas y finalmente se centrifugó (4°C , 5000 g , 16 min). Los gránulos microbianos fueron resuspendidos en una disolución de NaCl ($v = 1 \text{ ml}$, 8 g/l) y se caracterizaron por OD a 600 nm .

10 Las cinco muestras microbianas se mezclaron para formar la suspensión microbiana final usada para el ensayo. Se cultivaron células microbianas usando el medio de cultivo Hickey-Tresner (extracto de levadura a $1,0 \text{ g/L}$, extracto de carne a $1,0 \text{ g/L}$, peptona de caseína a $2,0 \text{ g/L}$, almidón a $10,0 \text{ g/L}$, cloruro de cobalto hexahidrato a 20 mg/L ; $\text{pH}=6$). El crecimiento microbiano se llevó a cabo en matraces Erlenmeyer de 100 ml a 37°C bajo agitación continua (100 rpm). El caldo de cultivo estéril (20 ml) fue inoculado con $0,1 \text{ mL}$ de suspensión. El crecimiento microbiano fue controlado midiendo la OD a 600 nm .

15 Se obtuvo glucósido de taxifolina como se describe en el ejemplo 1 (preparación altamente purificada correspondiente al cromatograma APLC presentado en la Figura 14). El glucósido de taxifolina se añadió o no en el día 0 ($V = 0,5 \text{ ml}$ de $0,20 \mu\text{m}$ de disolución esterilizada). El control se hizo cultivando la suspensión microbiana final sin glucósido de taxifolina.

20 Después de la centrifugación de una alícuota de medio de cultivo celular, el sobrenadante se diluyó 4 veces con una disolución que contenía metanol y agua en las proporciones de 40/60. las concentraciones de glucósido de taxifolina y taxifolina en los sobrenadantes se determinaron por HPLC (método 2).

25 La Figura 15 muestra el crecimiento bacteriano aparente durante una semana en el medio de cultivo de Hickey-Tresner. Del día 3 al día 7, la producción de biomasa aparente es más alta en presencia de glucósido de taxifolina que en su ausencia. Esto se podría explicar por una concentración más alta de fuente de carbono y energía debido a la liberación de la glucosa del glucósido de taxifolina bajo la hidrólisis bacteriana.

30 En la Figura 16, la hidrólisis del glucósido de taxifolina no se puede detectar durante los primeros tres días. Después de tres días de incubación, probablemente cuando la fuente de carbono y energía llega a ser limitante, la concentración de glucósido de taxifolina disminuye de una manera significativa y el flavonoide aglicona, taxifolina, aparece concomitantemente. La tensión nutricional sufrida por la comunidad bacteriana que se origina de la flora cutánea humana podría estimular la liberación del residuo glucosilo mediante la acción de las enzimas secretadas.

Este ejemplo demuestra que la flora cutánea humana reconoce y es capaz de hidrolizar el enlace glucosídico flavonoide con un alto rendimiento, ofreciendo una nueva vía para la entrega de ingredientes activos.

EJEMPLO 4 : Activación del glucósido de taxifolina por una preparación de α -glucosidasa

Se incubó glucósido de taxifolina en presencia de una enzima α -glucosidasa en las siguientes condiciones:

- 35
- Glucósido de taxifolina obtenido como se describe en el ejemplo 1 (preparación altamente purificada correspondiente al cromatograma de HPLC presentado en la Figura 14): $0,25 \text{ ml}$;
 - α -glucosidasa (de *Saccharomyces cerevisiae*; FLUKA 70797; lote 0641337/1; actividad: $5,8 \text{ U/mg}$): $50,1 \text{ mg}$ en 5 ml de tampón fosfato de potasio $0,1 \text{ M}$, $\text{pH } 7,3$; sin enzima en el medio de control;
 - Temperatura: 30°C ;
 - 40 - Agitación moderada.

Los medios de reacción se analizaron por HPLC (método 2) después de una dilución a 2 veces de una alícuota con metanol.

45 Después de 18 horas de incubación, la molécula de glucósido de taxifolina permaneció sin cambios en el medio que no contenía la enzima α -glucosidasa, mientras que la molécula de glucósido de taxifolina fue convertida totalmente en taxifolina en presencia de la enzima α -glucosidasa.

50 Estos resultados muestran que una enzima aislada específica para la hidrólisis de enlaces α -glucosídicos es capaz de hidrolizar la molécula de glucósido de taxifolina: esto indica que la molécula de glucósido de taxifolina contiene taxifolina y glucosa, estando la glucosa enlazada a un grupo hidroxilo de la taxifolina mediante un enlace α -glucosídico. Por esta razón, los nuevos derivados glucosídicos sintetizados son derivados de O- α -D-glucósido reivindicados.

EJEMPLO 5 : Síntesis enzimática de O- α -D-glicósidos de pirocatecol, ácido protocatecuico y éster etílico de

ácido protocatecuico.

Se prepararon medios de reacción como se describe en el Ejemplo 1, siendo la taxifolina reemplazada por pirocatecol (SIGMA, referencia C 9510), o por ácido protocatecuico (ALDRICH, referencia D10,980-0) o por éster etílico de ácido protocatecuico (ALDRICH, referencia E 2,485-9).

- 5 Después de 21 horas de incubación, se diluyó una muestra de cada medio de reacción 5 veces con una disolución que contenía metanol y agua en las proporciones de 40/60 y después se analizó por HPLC (método 1).

Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Aceptor de glucosilo	Tiempo de retención, minutos	m/z [M-H]	Identificación (peso molecular teórico)
Pirocatecol (cromatograma a 276 nm en la Figura 17)	13,78	108,74	Pirocatecol (110)
	16,80	271,01	Monoglucósido de pirocatecol (272)
	14,88	433,05	Diglucósido de pirocatecol (434)
	13,22	595,06	Triglucósido de pirocatecol (596)
	11,87	919,35	Pentaglucósido de pirocatecol (920)
Ácido protocatecuico (cromatograma a 294 nm en la Figura 18)	11,26	152,88	Ácido protocatecuico (154)
	8,25	315,05	Monoglucósido de ácido protocatecuico (316)
	7,89	477,00	Diglucósido de ácido protocatecuico (478)
	7,15	801,26	Tetraglucósido de ácido protocatecuico (802)
Éster etílico del ácido protocatecuico (cromatograma a 295 nm en la Figura 19)	28,28	180,96	Éster etílico del ácido protocatecuico (182)
	27,30	343,02	Monoglucósido de éster etílico de ácido protocatecuico (344)
	24,99	505,05	Diglucósido de éster etílico de ácido protocatecuico (506)
	20,54	829,30	Tetraglucósido de éster etílico de ácido protocatecuico (830)

- 10 Es posible por tanto, según el método descrito, sintetizar los nuevos derivados glucosilados de pirocatecol, ácido protocatecuico y éster etílico de ácido protocatecuico: los productos resultantes son una familia de sustancias que contienen al menos derivados monoglucosilados, diglucosilados, triglucosilados y tetraglucosilados.

EJEMPLO 6 : Síntesis enzimática de O- α -D-glicósidos de ácido cafeico, ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico (ácido hidrocafeico) y ácido rosmarínico.

- 15 Se prepararon medios de reacción como se describe en ejemplo 1, siendo reemplazada la taxifolina por ácido cafeico (SIGMA, referencia C 0625), o por ácido 3,4-dihidroxihidrocinámico (ALDRICH, referencia D10,980-0) o por ácido rosmarínico (FLUKA, referencia 44699; la concentración de ácido rosmarínico en el medio de reacción fue 1 g/L).

Después de 21 horas de incubación, una muestra de cada medio de reacción se diluyó 5 veces con una disolución que contenía metanol y agua en las proporciones de 40/60 y después se analizó por HPLC (método 1).

- 20 Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Aceptor de glucosilo	Tiempo de retención, minutos	m/z [M-H]	Identificación (peso molecular teórico)
----------------------	------------------------------	-----------	---

Ácido cafeico (cromatograma a 322 nm en la Figura 20)	19,53	178,97	Ácido cafeico (180)
	15,46	341,09	Monoglucósido de ácido cafeico (342)
	14,62	503,16	Diglucósido de ácido cafeico (504)
Ácido 3,4- dihidroxihipocinámico (ácido hidrocafeico) (cromatograma a 278 nm en la Figura 21)	18,72	343,02	Monoglucósido de ácido hidrocafeico (344)
	17,93	505,05	Diglucósido de ácido hidrocafeico (506)
	17,80	180,96	Ácido hidrocafeico (182)
	17,50	343,02	Monoglucósido de ácido hidrocafeico (344)
	17,06	667,21	Triglucósido de ácido hidrocafeico (668)
	16,23	829,25	Tetraglucósido de ácido hidrocafeico (830)
	16,01	505,05	Diglucósido de ácido hidrocafeico (506)
	15,70	992,36	Pentaglucósido de ácido hidrocafeico (992)
	14,70	667,21	Triglucósido de ácido hidrocafeico (668)
	13,92	829,39	Tetraglucósido de ácido hidrocafeico (830)
	13,22	991,50	Pentaglucósido de ácido hidrocafeico (992)
Ácido rosmarínico (cromatograma a 295 nm en la Figura 22)	28,36	359,09	Ácido rosmarínico (360)
	27,18	521,16	Monoglucósido de ácido rosmarínico (522)
	21,61	1153,60	Hexaglucósido de ácido hidrocafeico (1154)
	12,08, 11,21	#	Grado de polimerización mayor que 6

5 Es posible por tanto, según el método descrito, sintetizar derivados glucosilados de ácido cafeico, ácido hidrocafeico y ácido rosmarínico: los productos resultantes son una familia de sustancias que contienen derivados al menos monoglucosilados, diglucosilados, triglucosilados y tetraglucosilados. En lo que se refiere al ácido hidrocafeico, aparece claramente que ambos grupos hidroxilo han sido sustituidos: de hecho, se pueden ver dos series de derivados, que contienen ambos, derivados al menos monoglucosilados (344), diglucosilados (506), triglucosilados (668), tetraglucosilados (830) y pentaglucosilados (992). Esto muestra que, en algunos casos que no pueden ser predichos por un experto, ambos grupos hidroxilados pueden aceptar un resto de glucosa.

EJEMPLO 7 : Síntesis enzimática de O- α -D-glicósidos de ácido 3,4-dihidroxihipocinámico, esculetina y esculina.

10 Se prepararon medios de reacción como se describe en el ejemplo 1, siendo reemplazada la taxifolina por ácido 3,4-dihidroxihipocinámico (ALDRICH, referencia 151610), o por esculetina (ALDRICH, referencia 24,657-3) o esculina (SIGMA, referencia E 8250).

Después de 21 horas de incubación, una muestra de cada medio de reacción se diluyó 5 veces con una disolución que contenía metanol y agua en las proporciones de 40/60 y después se analizó por HPLC (método 1).

15 Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Aceptor de glucosilo	Tiempo de retención, minutos	m/z [M-H]	Identificación (peso molecular teórico)
Ácido 3,4- dihidroxihipocinámico (cromatograma a 322 nm en la Figura 23)	14,68	136,82	Desconocido
	5,32	136/164	Desconocido
	4,10	182,95	Ácido 3,4-dihidroxihipocinámico (184)
	3,45	341,03	Desconocido

	2,79	341,03	Desconocido
	2,49	140,80	Desconocido
Esculetina (cromatograma a 346 nm en la Figura 24)	18,36	176,91	Esculetina (178)
	15,65	339,03	Monoglucósido de esculetina (340)
	14,74	501,06	Diglucósido de esculetina (502)
	12,25	987,40	Pentaglucósido de esculetina (988)
	11,686	1149,55	Hexaglucósido de esculetina (1150)
Esculina o 6-O- β -D- piranosido de esculetina (cromatograma a 343 nm en la Figura 25)	18,30	176,91	Esculetina (178)
	13,69	338,99	Esculina o 6-O- β -D-piranosido de esculetina
	11,38	501,06	Monoglucósido de esculina (502)
	10,73	663,15	Diglucósido de esculina (664)
	9,38	1149,48	Tetraglucósido de esculina (1150)

El ácido 3,4-dihidroxi mandélico contiene una estructura de pirocatecol como la taxifolina, el pirocatecol, el ácido protocatecuico, el ácido cafeico: no obstante, no se ha sintetizado ningún derivado glucosilado del ácido 3,4-dihidroxi mandélico en las presentes condiciones.

- 5 De manera inesperada, la cadena principal de la 6,7-dihidroxicumarina es también un aceptor de glucósido que conduce a una serie de esculetinas glucosiladas. Se tiene que subrayar que el monoglucósido de esculetina sintetizado tiene un tiempo de retención de 15,65 minutos, mientras que la esculetina glucosilada natural (6-O- β -D-glucopiranosido de esculina o esculetina) tiene un tiempo de retención de 13,69 minutos: esto tiene que ser atribuido a que el enlace osídico en el caso de la molécula natural es del tipo α mientras que el enlace osídico en la esculina es del tipo β .

De manera inesperada, la esculina es un aceptor de glucósido, probablemente por su resto de glucosa.

EJEMPLO 8 : Síntesis enzimática de O- α -D-glicósidos de ácido gálico, galato de propilo y galato de epigalocatequina.

- 15 Se prepararon medios de reacción como se describe en el ejemplo 1, siendo reemplazada la taxifolina por ácido gálico (FLUKA, referencia 48630), o por galato de propilo (SIGMA, referencia P3130) o por galato de epigalocatequina (SIGMA, referencia 44699) y siendo la concentración de DMSO reducida a 15% v/v.

- 20 Después de 6 horas de incubación, una muestra de cada medio de reacción se diluyó 5 veces con una disolución que contenía metanol y agua en las proporciones de 40/60 y después se analizó usando el equipo de HPLC descrito anteriormente con una combinación de eluyente A (agua desionizada que contiene ácido acético al 1% v/v) y eluyente B (metanol de grado HPLC que contiene ácido acético al 1% v/v) como se indica a continuación.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Aceptor de glucosilo	Tiempo de retención, min Identificación	Tiempo de retención, min Identificación	Condiciones del análisis
Ácido gálico	7,92 Ácido gálico	10,40 O- α -D-glicósido de ácido gálico	G6
	5,95 Ácido gálico	6,75 O- α -D-glicósido de ácido gálico	G1

Galato de propilo	27,22 Galato de propilo	25,35 O- α -D-glucósido de galato de propilo	G1
Galato de epigalocatequina	17,03 Galato de epigalocatequina	18,30 y 17,60 O- α -D-glucósido de galato de epigalocatequina y di-O- α -D-glucósido de galato de epigalocatequina	G1

Condiciones del análisis:

G1: caudal 1 ml/min; de 0 a 10 min: B aumenta linealmente de 10 a 20%; de 10 a 25 min: B aumenta linealmente de 20 a 50%; de 25 a 30 min: B es estable a 50%; de 30 a 35 min: B disminuye linealmente de 50 a 10%.

- 5 G6: caudal 1 ml/min; de 0 a 20 min: B aumenta linealmente de 2,5 a 25%; de 20 a 25 min: B es estable a 25%; de 25 a 28 min: B disminuye linealmente de 25 a 2,5%.

Es posible por tanto, según el método descrito, sintetizar los nuevos derivados glucosilados de ácido gálico, galato de propilo y galato de epigalocatequina: los productos resultantes son una familia de sustancias que contienen al menos un derivado monoglucosilado.

10 **EJEMPLO 9 : Síntesis enzimática de O- α -D-glicósidos de éster fenílico de ácido cafeico, ácido clorogénico y 3,4-dihidroxibenzofenona.**

Se prepararon medios de reacción como se describe en el ejemplo 1, siendo reemplazada la taxifolina por éster fenílico de ácido cafeico (SIGMA, referencia C8221), o por ácido clorogénico (SIGMA, referencia C3878) o por 3,4-dihidroxibenzofenona (ALDRICH, referencia 579815) y las concentraciones de DMSO fueron 15% y 25% v/v.

- 15 Después de 6 horas de incubación, una muestra de cada medio de reacción se diluyó 5 veces con una disolución que contenía metanol y agua en las proporciones de 40/60 y después se analizó usando el equipo de HPLC descrito anteriormente con una combinación de eluente A (agua desionizada que contiene ácido acético al 1% v/v) y eluente B (metanol de grado HPLC que contiene ácido acético al 1% v/v) como se indica a continuación.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Aceptor de glucosilo (DMSO 15 y 25%)	Tiempo de retención, min Identificación	Tiempo de retención, min Identificación	Condiciones del análisis
Éster fenílico del ácido cafeico	20,15 Éster fenílico del ácido cafeico	17,42 y 16,88: productos mayoritarios 18,42, 15,65, 14,22 y 13,77 O- α -glucósidos de éster fenílico del ácido cafeico	G2
Ácido clorogénico	15,53 Ácido clorogénico	11,00 y 10,67 Mono-O- α -glucósido de ácido clorogénico y di-O- α -glucósido de ácido clorogénico	G1
3,4-Dihidroxibenzofenona	32,35 3,4-Dihidroxibenzofenona	27,98 y 27,68 O- α -glucósido de 3,4-Dihidroxibenzofenona y di-O- α -glucósido de 3,4-Dihidroxibenzofenona	G1

20

Condiciones del análisis:

G1: véase el ejemplo 8

G2: caudal 1 ml/min; de 0 a 20 min: B aumenta linealmente de 40 a 80%; de 20 a 22 min: B es estable a 80%; de 22 a 27 min: B disminuye linealmente de 80 a 40%.

5 Es posible por tanto, según el método descrito, sintetizar los nuevos derivados glucosilados de éster fenílico de ácido cafeico, ácido clorogénico y 3,4-dihidroxibenzofenona: los productos resultantes son una familia de sustancias que contienen al menos un derivado monoglucosilado.

EJEMPLO 10 : Síntesis enzimática de O- α -D-glicósidos de catequina, eriodictiol, fisetina, oleuropeína y ácido nordihidroguaiarético.

10 Se prepararon medios de reacción como se describe en el ejemplo 1, siendo reemplazada la taxifolina por catequina (FLUKA, referencia 22110), o por eriodictiol (EXTRASYNTHÈSE, referencia 0056) o por fisetina (SIGMA, referencia F4043), o por oleuropeína (EXTRASYNTHÈSE, referencia 0204) o por ácido nordihidroguaiarético (EXTRASYNTHÈSE, referencia 6135) y las concentraciones de DMSO fueron 15% y 25% v/v.

15 Después de 6 horas de incubación, una muestra de cada medio de reacción se diluyó 5 veces con una disolución que contenía metanol y agua en las proporciones de 40/60 y después se analizó usando el equipo de HPLC descrito anteriormente con una combinación de eluente A (agua desionizada que contiene ácido acético al 1% v/v) y eluente B (metanol de grado HPLC que contiene ácido acético al 1% v/v) como se indica a continuación.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Aceptor de glucosilo (DMSO 15 y 25%)	Tiempo de retención, min Identificación	Tiempo de retención, min Identificación	Condiciones del análisis
Catequina	14,07	12,60 O- α -glucósido de catequina	G1
Eriodictiol	30,10 Eriodictiol	27,18 y 26,90 O- α -glucósido de eriodictiol y di-O- α -glucósido de eriodictiol	G1
Fisetina	29,37 Fisetina	26,05 O- α -glucósido de fisetina	G1
Oleuropeína	28,28 Oleuropeína	26,45 y 24,68 O- α -glucósido de oleuropeína y di-O- α - glucósido de oleuropeína	G1
Ácido nordihidroguaiarético	18,53 Ácido nordihidroguaiarético	16,97 y 16,40: productos mayoritarios 15,53 O- α -glucósidos de ácido nordihidroguaiarético	G2

Condiciones del análisis:

20 G1: véase el ejemplo 8

G2: véase el ejemplo 9

Es posible por tanto, según el método descrito, sintetizar los nuevos derivados glucosilados de catequina, eriodictiol, fisetina, oleuropeína y ácido nordihidroguaiarético: los productos resultantes son una familia de sustancias que contienen al menos un derivado monoglucosilado.

25 **EJEMPLO 11 : Síntesis enzimática de O- α -D-glicósidos de catequina, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido**

gálico, ácido rosmarínico, ácido cafeico y ácido clorogénico en medios estrictamente acuosos.

5 Se prepararon medios de reacción como se describe en el ejemplo 1, siendo reemplazada la taxifolina por catequina (FLUKA, referencia 22110), a una concentración de 7,5 g/L, o por ácido 3,4-dihidroxibenzoico (ALDRICH, referencia D10,980-0) a una concentración de 9,0 g/L, o por ácido gálico (FLUKA, referencia 48630) a una concentración de 9,0 g/L, o por ácido rosmarínico (FLUKA, referencia 44699) a una concentración de 7,5 g/L, o por ácido cafeico (SIGMA, referencia C0625) a una concentración de 9,0 g/L, o por ácido clorogénico (SIGMA, referencia C3878) a una concentración de 7,5 g/L. El DMSO fue omitido, mientras que la concentración de tampón acetato de sodio fue aumentado hasta 100 mM y la actividad enzimática fue reducida a 1,0 U/ml.

10 Después de 6 horas de incubación, una muestra de cada medio de reacción se diluyó 5 veces con una disolución que contenía metanol y agua en las proporciones de 40/60 y después se analizó usando el equipo de HPLC descrito anteriormente con una combinación de eluyente A (agua desionizada que contiene ácido acético al 1% v/v) y eluyente B (metanol de grado HPLC que contiene ácido acético al 1% v/v) como se indica a continuación.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Aceptor de glucosilo	Tiempo de retención, min Identificación	Tiempo de retención, min Identificación	Condiciones del análisis
Catequina	13,57 Catequina	12,57 O- α -glucósido de catequina	G1
Ácido gálico	5,95 Ácido gálico	6,75 O- α -glucósido de ácido gálico	G1
Ácido cafeico	18,62 Ácido cafeico	14,27 O- α -glucósido de ácido cafeico	G1
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	10,58 Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	6,83 O- α -glucósido de ácido 3,4-dihidroxibenzoico	G1
Ácido rosmarínico	27,65 Ácido rosmarínico	26,42, 25,15 y 24,33: O- α -glucósidos de ácido rosmarínico	G1
Ácido clorogénico	15,63 Ácido clorogénico	10,95 O- α -glucósidos de ácido clorogénico	G1

15 Condiciones del análisis:

G1: véase el ejemplo 8

20 Es posible por tanto, según el método descrito, sintetizar los nuevos derivados glucosilados de catequina, ácido gálico, ácido cafeico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido rosmarínico y ácido clorogénico en ausencia de disolvente orgánico: los productos resultantes son una familia de sustancias que contienen al menos un derivado monoglucosilado.

EJEMPLO 12 : Intento para la síntesis enzimática de O- α -D-glicósidos de ácido elágico, alizarina, epinefrina, rutina y baicaleína.

25 Se prepararon medios de reacción como se describe en el ejemplo 1, siendo reemplazada la taxifolina por ácido elágico (FLUKA, referencia 45140), o por rutina (SIGMA, referencia R5143), o por alizarina (EXTRASYNTHESE, referencia 0411), o por epinefrina (SIGMA, referencia E4250), o por baicaleína (FLUKA, referencia 11712). La concentración de DMSO fue 25% v/v.

Después de 6 horas y 21 horas de incubación, una muestra de cada medio de reacción se diluyó 5 veces con una disolución que contenía metanol y agua en las proporciones de 40/60 y después se analizó usando el equipo de HPLC descrito anteriormente con una combinación de eluyente A (agua desionizada que contiene ácido acético al 1% v/v) y eluyente B (metanol de grado HPLC que contiene ácido acético al 1% v/v) como se indica a continuación.

5 Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Aceptor de glucosilo	Tiempo de retención, min Identificación	Tiempo de retención, min Identificación	Condiciones del análisis
Ácido elágico	27,42 Ácido elágico	Ningún otro pico y por tanto ningún O- α -glucósido de ácido elágico	G1
Rutina	26,33 Rutina	Ningún otro pico y por tanto ningún O- α -glucósido de ácido elágico	G1
Alizarina	19,17 Alizarina	Ningún otro pico y por tanto ningún O- α -glucósido de ácido elágico	G2
Epinefrina	5,96 Epinefrina	Ningún otro pico y por tanto ningún O- α -glucósido de ácido elágico	G6
Baicaleína	11,60 Baicaleína	Ningún otro pico y por tanto ningún O- α -glucósido de ácido elágico	G4

Condiciones del análisis:

G1: véase el ejemplo 8

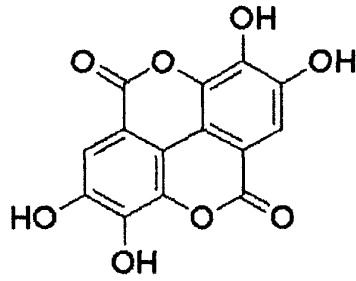
G2: véase el ejemplo 9

10 G6: véase el ejemplo 8

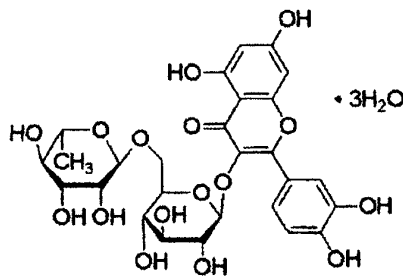
G4: caudal 1 ml/min; de 0 a 10 min: B aumenta linealmente de 40 a 80%; de 10 a 15 min: b es estable a 80%; de 15 a 20 min: B disminuye linealmente de 80 las sustancias ensayadas contienen una estructura de pirocatecol, los sustituyentes del anillo no permiten su reconocimiento por la enzima. En el caso de la rutina, la parte sacárida del 3-O-rutinósido de quercetina parece ser muy importante para el reconocimiento de la enzima, dado que la quercetina está glucosilada en la posición 3' y/o 4' (BERTRAND et al.) mientras que la rutina no lo está.

15

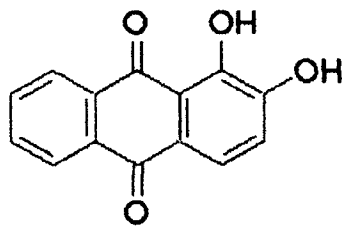
Ácido elágico



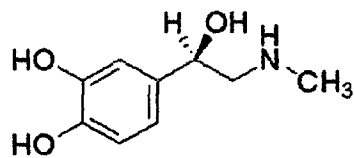
Rutina



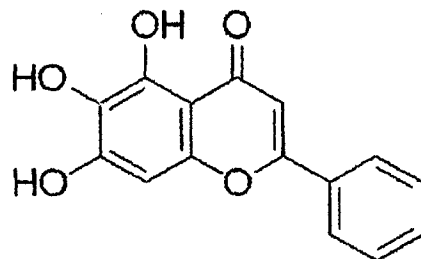
Alizarina



Epinefrina

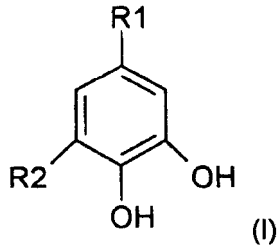


Baicaleína



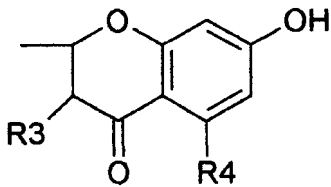
REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un O- α -glucósido fenólico, que comprende incubar sacarosa y una glucansacarasa de *Leuconostoc species* con un compuesto fenólico que tiene la siguiente fórmula:



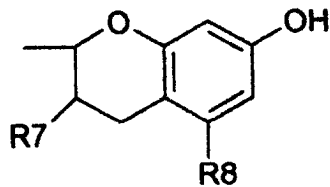
5 en la que
 R2 es H o OH; y
 R1 se selecciona del grupo que consiste en

-



10 en donde R3 y R4, independientemente, son H o OH, a condición de que al menos uno entre R3 y R4 representa OH;

-

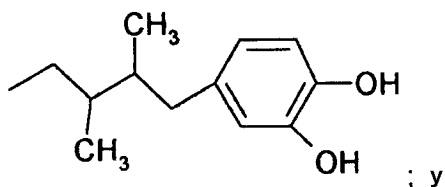


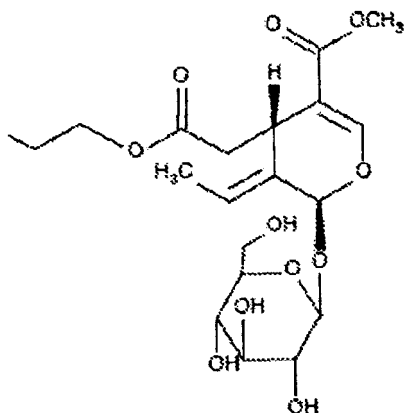
15 en donde R7 se selecciona del grupo que consiste en H, -OH o -OCOR, y R8 es H o OH, a condición de que al menos uno entre R7 y R8 representa OH;

- $-(CH_2)_n-COOR$ o $-(CH_2)_n-CONHR$, siendo n un número entero de 0 a 2;
- $-(CR^{12}=CH)-COOR$ o $-(CR^{12}=CH)-CONHR$, siendo R¹² H o un alquilo o alqueno C₁-C₆ lineal, ramificado o cíclico;
- $-(CH_2)_n-COR$ o $-(CH=CH)_n-COR$, siendo n un número entero de 0 a 2;

20 - H;

-

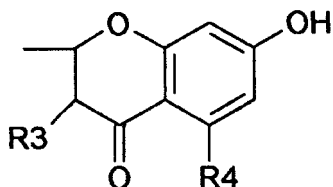




5 en donde R es H o un grupo hidrocarbonado C₁-C₁₀ lineal, ramificado o cíclico, aromático o no, saturado o insaturado, opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo, en donde dicho grupo hidrocarbonado comprende un alquilo, un alquenoilo o un alquínilo, que puede estar sustituido por uno o varios sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en: un arilo (C₅-C₉), un heterociclo (C₄-C₉), un alcoxi (C₁-C₃), un acilo (C₂-C₃), un alcohol (C₁-C₃), un grupo carboxílico (-COOH), un éster (C₂-C₃), una amina (C₁-C₃), un grupo amino (-NH₂), una amida (-CONH₂), una imina (C₁-C₃), un nitrilo, un hidroxilo (-OH), un grupo aldehído (-CHO), un halógeno, un halogenoalquilo (C₁-C₃), un tiol (-SH), un tioalquilo (C₁-C₃), una sulfona (C₁-C₃), un sulfóxido (C₁-C₃), y una combinación de los mismos.

10

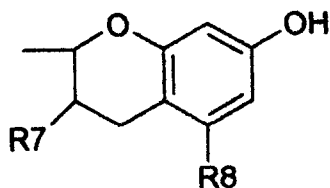
2. Método según la reivindicación 1, en donde R1 del compuesto fenólico es



en donde R3 y R4, independientemente, son H o OH, a condición de que al menos uno entre R3 y R4 representa OH.

15

3. Método según la reivindicación 1, en donde R1 del compuesto fenólico es



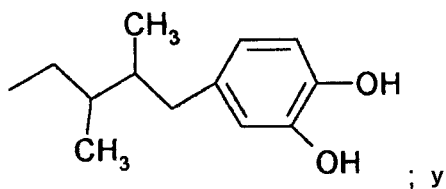
en donde R7 se selecciona del grupo que consiste en H, -OH o -OCOR, y R8 es H o OH, a condición de que al menos uno entre R7 y R8 representa OH.

20

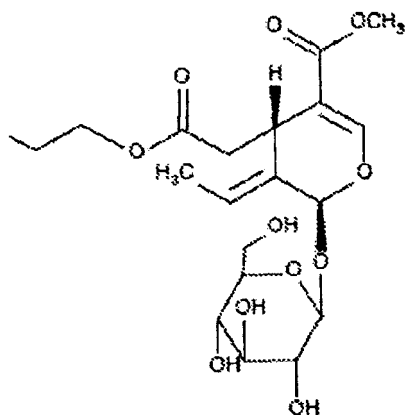
4. Método según la reivindicación 1, en donde R1 del compuesto fenólico se selecciona del grupo que consiste en

- a) $-(CH_2)_n-COOR$ o $-(CH_2)_n-CONHR$, siendo n un número entero de 0 a 2;
- b) $-(CR_{12}=CH)-COOR$ o $-(CR_{12}=CH)-CONHR$, siendo R₁₂ H o un alquilo o alquenoilo C₁-C₆ lineal, ramificado o cíclico;
- c) $-(CH_2)_n-COR$ o $-(CH=CH)_n-COR$, siendo n un número entero de 0 a 2;
- d) H;
- e)

25



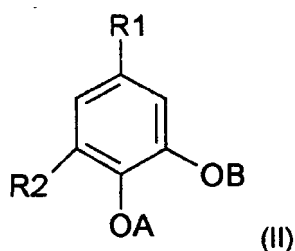
f)



5. Método según la reivindicación 1, en donde el compuesto fenólico se selecciona del grupo que consiste en la taxifolina, el eriodictiol, la dihidrorobinetina, la fustina, la catequina, la epicatequina, el galato de catequina, el galato de epicatequina, la galocatequina, la epigalocatequina, el galato de galocatequina, el galato de epigalocatequina, el ácido homoprotocatecuico, el ácido dihidrocafeico, el éster etílico del ácido protocatecuico, el galato de propilo, el ácido gálico, la hamamelitanina (2',5-di-O-galoil-hamamelosa), el ácido protocatecuico, el ácido cafeico, el ácido rosmarínico, la esculetina, la 4-metilesculetina, la nordalbergina (6,7-dihidroxifenilcumarina), el ácido clorogénico, el éster fenílico del ácido cafeico, el ácido chicórico (ácido dicafeoiltartárico), el equinacósido (2-(3,4-dihidroxifenil)etil) O-6-desoxi-alfa-L-manopiranosil-(1→3)-O-(beta-D-glucopiranosil-(1→6))-, 4-(3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoato, beta-D-glucopiranosido), el verbascósido, la maclurina, el 3,4-dihidroxibenzaldehído, la 3,4-dihidroxibenzofenona, la buteína (2',3,4,4'-tetrahidroxichalcona), la 3,4-dihidroxiacetofenona, la mareína (2',3,3',4,4'-pentahidroxi-4'-glucosilchalcona), la eriodictiolchalcona (2',4',6',3,4-pentahidroxichalcona), el pirocatecol, el ácido nordihidroguaiarético, la oleuropeína.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la glucansacarasa es de *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F.

7. Un O- α -glucósido fenólico que tiene la siguiente fórmula:



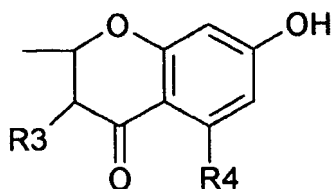
20 en la que

A y B, idénticos o diferentes, son H o un residuo - α -glucosilo, a condición de que al menos uno de A y B es un residuo - α -glucosilo;

R2 es H o OH; y,

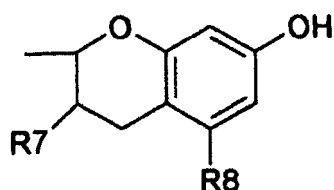
R1 se selecciona del grupo que consiste en

25 -



en donde R3 y R4, independientemente, son H o OH, a condición de que al menos uno entre R3 y R4 representa OH; y,

-



5

en donde R7 se selecciona del grupo que consiste en H, -OH o -OCOR, y R8 es H o OH, a condición de que, cuando R2 es H, R7 y R8 no son ambos OH, y al menos uno entre R7 y R8 es OH;

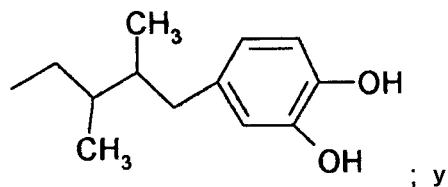
- $-(CH_2)_n-COOR$ o $-(CH_2)_n-CONHR$, siendo n un número entero de 0 a 2;

10 - $-(CR_{12}=CH)-COOR$ o $-(CR_{12}=CH)-CONHR$, siendo R12 H o un alquilo o alqueniilo C₁-C₆ lineal, ramificado o cíclico;

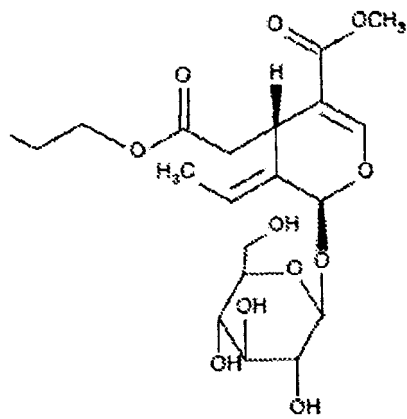
- $-(CH_2)_n-COR$ o $-(CH=CH)_n-COR$, siendo n un número entero de 0 a 2;

- H;

-



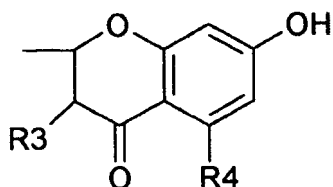
15 -



20 en donde R es H o un grupo hidrocarbonado C₁-C₁₀ lineal, ramificado o cíclico, aromático o no, saturado o insaturado, opcionalmente interrumpido por al menos un heteroátomo, en donde dicho grupo hidrocarbonado comprende un alquilo, un alqueniilo o un alquinilo, que puede estar sustituido por uno o varios sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en: un arilo (C₅-C₉), un heterociclo (C₄-C₉), un alcoxi (C₁-C₃), un acilo (C₂-C₃), un alcohol (C₁-C₃), un grupo carboxílico (-COOH), un éster (C₂-C₃), una amina (C₁-C₃), un grupo amino (-NH₂), una

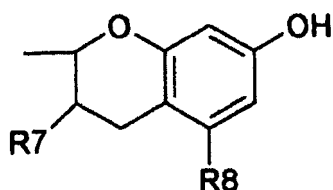
amida (-CONH₂), una imina (C₁-C₃), un nitrilo, un hidroxilo (-OH), un grupo aldehído (-CHO), un halógeno, un halogenoalquilo (C₁-C₃), un tiol (-SH), un tioalquilo (C₁-C₃), una sulfona (C₁-C₃), un sulfóxido (C₁-C₃), y una combinación de los mismos.

8. O- α -glucósido fenólico según la reivindicación 7, en el que R1 es



5

9. O- α -glucósido fenólico según la reivindicación 7, en el que R1 es

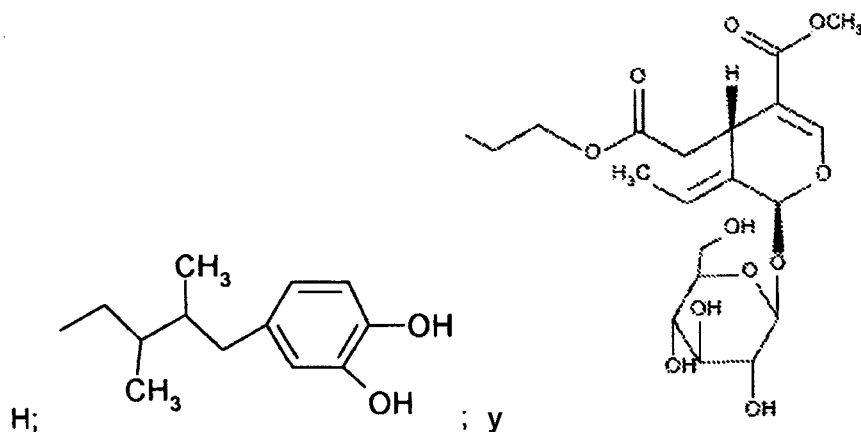


10. O- α -glucósido fenólico según la reivindicación 7, en el que R1 se selecciona del grupo que consiste en

- a) $-(CH_2)_n-COOR$ o $-(CH_2)_n-CONHR$, siendo n un número entero de 0 a 2;
- b) $-(CR_{12}=CH)-COOR$ o $-(CR_{12}=CH)-CONHR$, siendo R₁₂ H o un alquilo o alqueniilo C₁-C₆ lineal o cíclico;
- c) $-(CH_2)_n-COR$ o $-(CH=CH)_n-COR$, siendo n un número entero de 0 a 2.

10

11. O- α -glucósido fenólico según la reivindicación 7, en el que R1 se selecciona del grupo que consiste en



H;

; y

12. O- α -glucósido fenólico según la reivindicación 7, en donde el O- α -glucósido fenólico se selecciona del grupo que consiste en O- α -glucósido de taxifolina, el O- α -glucósido de eriodictiol, el O- α -glucósido de dihidro-robinetina, el O- α -glucósido de fustina, el O- α -glucósido de galato de catequina, O- α -glucósido de galato de epicatequina, el O- α -glucósido de galocatequina, el O- α -glucósido de epigalocatequina, el O- α -glucósido de galato de galocatequina y el O- α -glucósido de galato de epigalocatequina, el O- α -glucósido de ácido homoprotocatecuico, el O- α -glucósido de ácido dihidrocafeico, el O- α -glucósido del éster etílico del ácido protocatecuico, el O- α -glucósido de galato de propilo, el O- α -glucósido de ácido gálico, el O- α -glucósido de hamamelitanina, el O- α -glucósido de ácido protocatecuico, el O- α -glucósido de ácido cafeico, el O- α -glucósido de ácido rosmarínico, el O- α -glucósido de esculetina, el O- α -glucósido de 4-metilesculetina, el O- α -glucósido de nordalbergina (6,7-dihidroxifenilcumarina), el O- α -glucósido de ácido clorogénico, el O- α -glucósido del éster fenético del ácido cafeico, el O- α -glucósido de ácido chicórico (ácido dicafeoiltartárico), el O- α -glucósido de equinacósido (2-(3,4-dihidroxifenil)etil O-6-desoxi-alfa-L-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O-(beta-D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 6))), el O- α -glucósido de 4-(3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoato), el O- α -glucósido de beta-D-glucopiranosido, el O- α -glucósido de verbascósido, el O- α -glucósido de maclurina, el O- α -glucósido de 3,4-dihidroxibenzaldehído, el O- α -glucósido de 3,4-dihidroxibenzofenona, el O- α -glucósido de buteína (2',3,4,4'-tetrahidroxichalcona), el O- α -glucósido de 3,4-dihidroxiacetofenona, el O- α -glucósido de mareína (2',3,3',4,4'-

15

20

25

pentahidroxi-4'-glucosilchalcona), el O- α -glucósido de eriodictiolchalcona (2',4',6',3,4-pentahidroxichalcona), el O- α -glucósido de pirocatecol, el O- α -glucósido de ácido nordihydroguaiarético, el O- α -glucósido de 3-hidroxidaidzeína, el O- α -glucósido de oleuropeína y el O- α -glucósido de maritimeína (3',4',6,7-tetrahidroxi-6-O-glucosilaurona).

- 5 13. O- α -glucósido fenólico según una cualquiera de las reivindicaciones 7-12, en donde dicho residuo de O- α -glucosilo es un monómero de glucosa.
14. O- α -glucósido fenólico según una cualquiera de las reivindicaciones 7-13, que tiene una solubilidad 20 veces más alta que la correspondiente aglicona en las mismas condiciones fisiológicas.
15. O- α -glucósido fenólico según una cualquiera de las reivindicaciones 7-14, en donde dicho O- α -glucósido fenólico puede ser escindido por una enzima para liberar la correspondiente aglicona.
- 10 16. O- α -glucósido fenólico según una cualquiera de las reivindicaciones 7-15 como medicamento.
17. Una composición farmacéutica o cosmética que comprende un O- α -glucósido fenólico según una cualquiera de las reivindicaciones 7-15.
18. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además usar el O- α -glucósido fenólico para preparar una composición farmacéutica o cosmética.
- 15 19. Uso de un O- α -glucósido fenólico según una cualquiera de las reivindicaciones 7-15 para preparar una composición farmacéutica o cosmética para ser administrada por vía tópica, oral, rectal, nasal o vaginal, en donde enzimas emitidas por microorganismos asociados a la piel, boca, tracto intestinal, sistema respiratorio superior o tracto genital femenino liberan la correspondiente aglicona.
- 20 20. Uso de un O- α -glucósido fenólico según una cualquiera de las reivindicaciones 7-15 para preparar una composición farmacéutica o cosmética para tratar o prevenir un cáncer, una enfermedad cardiovascular, una infección bacteriana, un eritema inducido por UVB, una alergia, un trastorno inflamatorio o inmune.

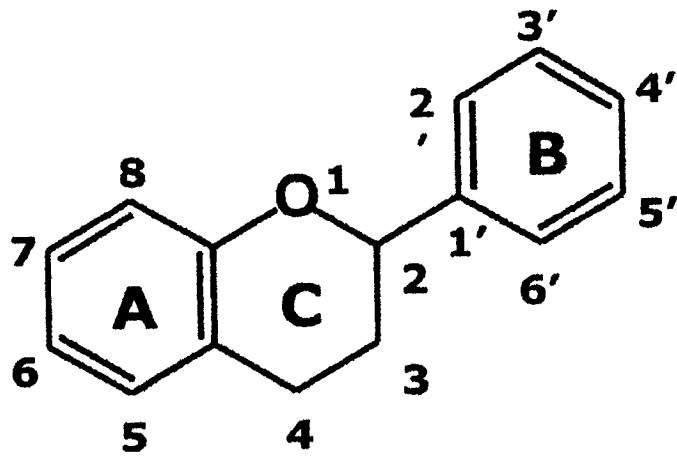


FIGURA 1

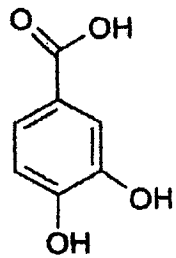


FIGURA 2

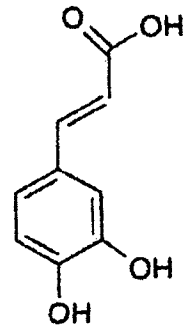


FIGURA 3

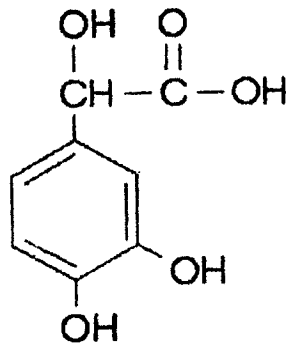


FIGURA 4

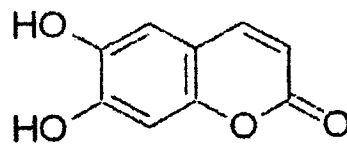


FIGURA 5

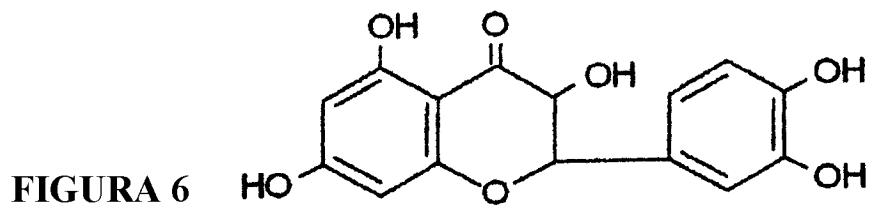


FIGURA 6

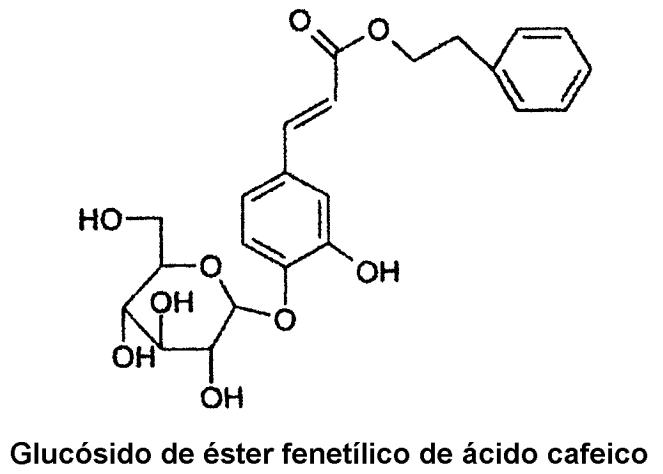
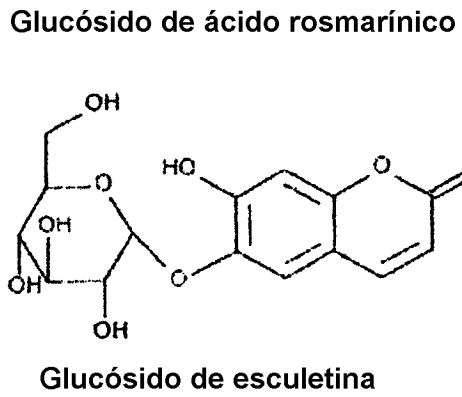
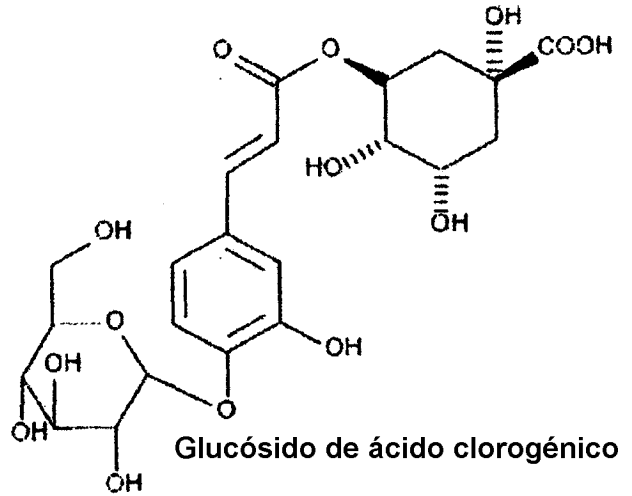
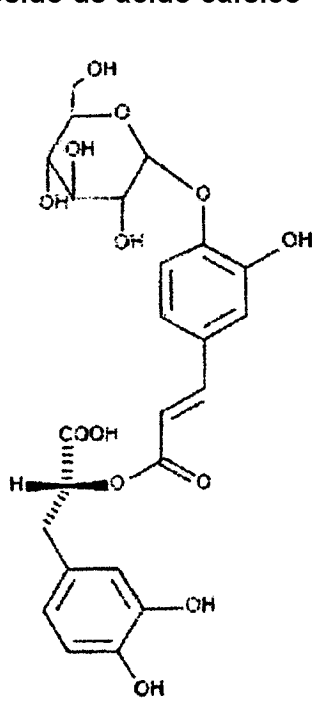
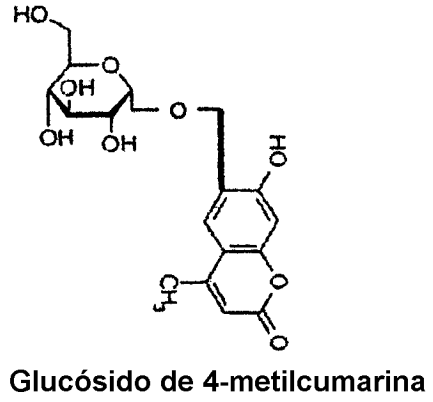
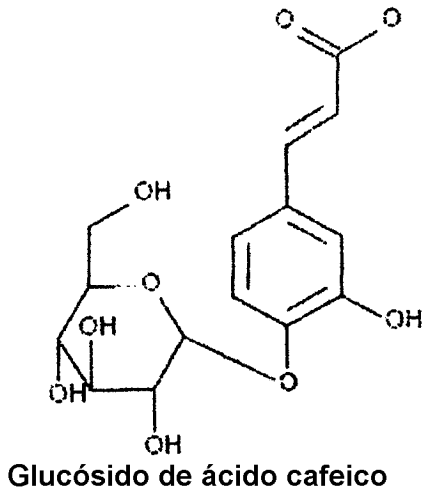
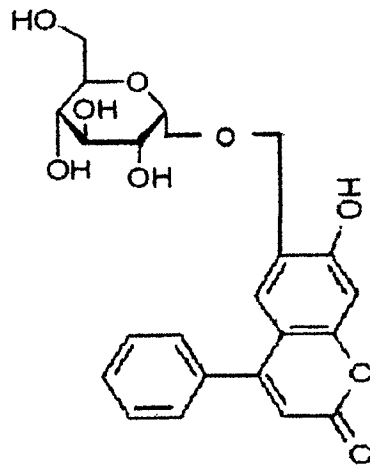
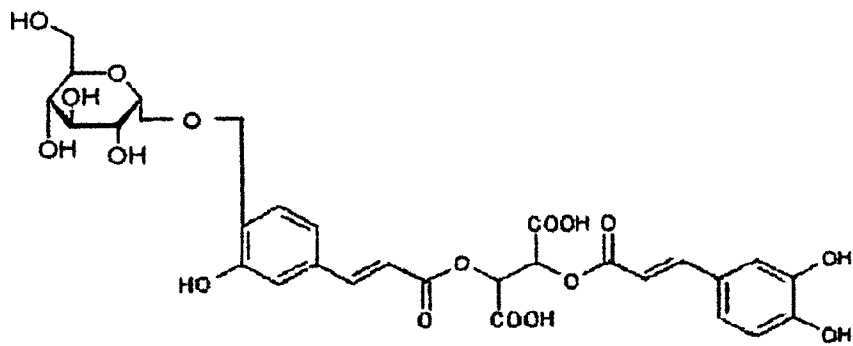


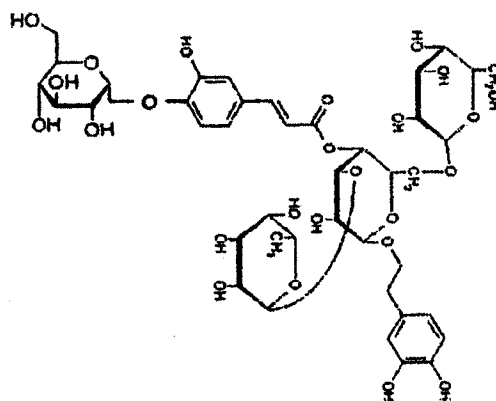
FIGURA 7



Glucósido de nardalbergina

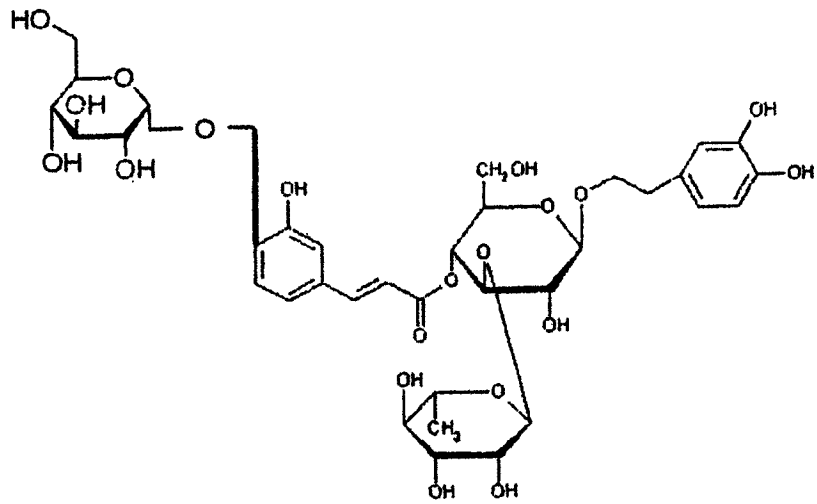


Glucósido de ácido chicórico



Glucósido de equinacósido

FIGURA 7 (continuación)



O- α -D-glucósido de verbascósido

FIGURA 7 (continuación)

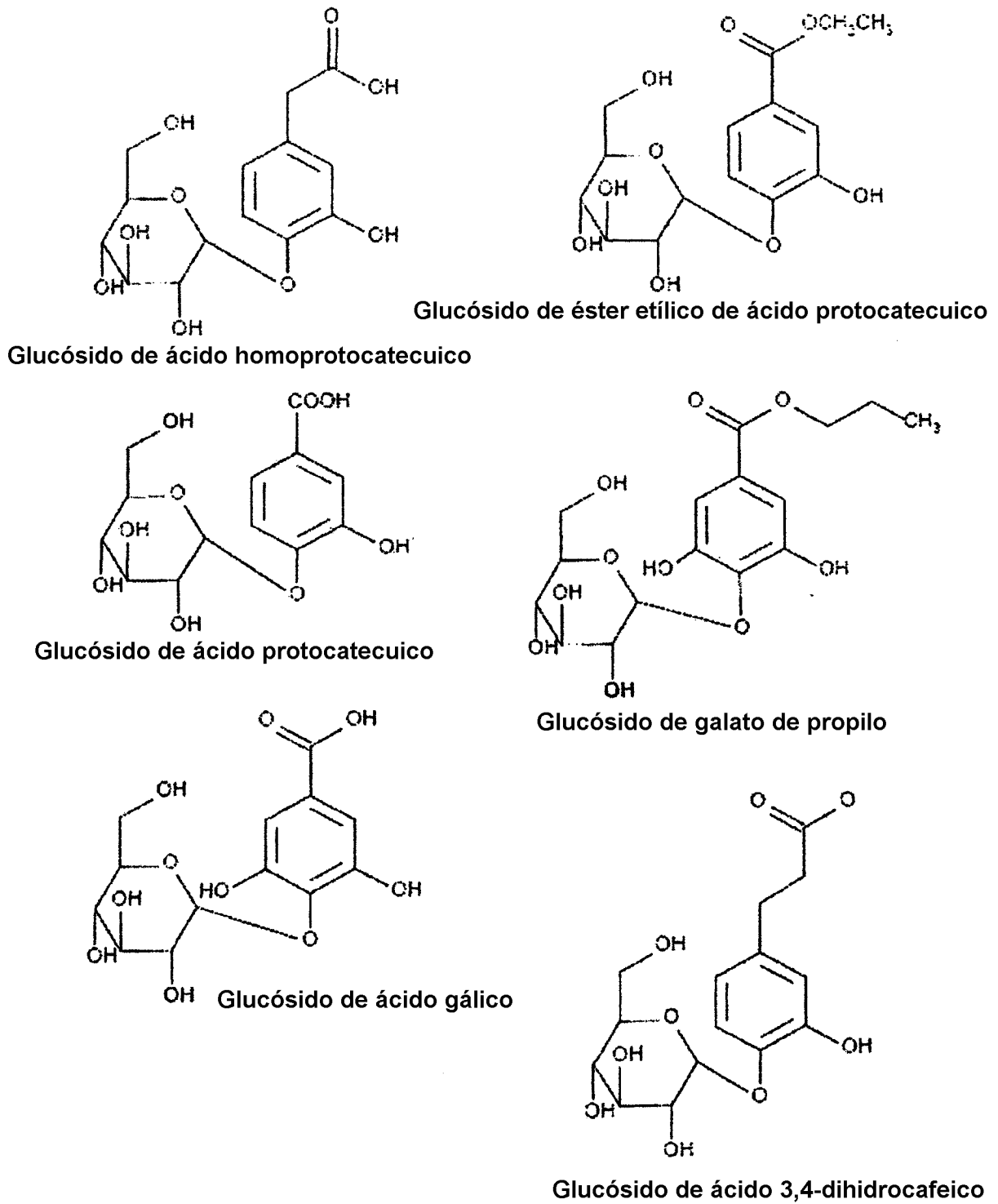
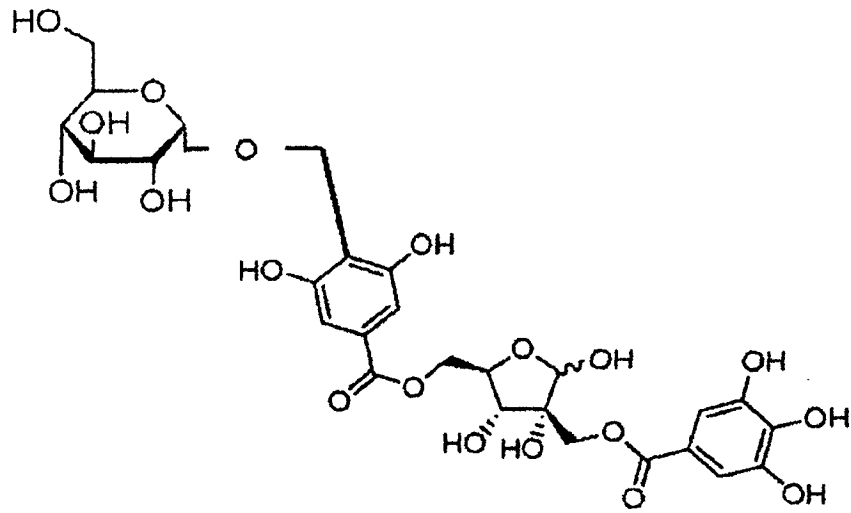


FIGURA 8



Glucósido de hamamelitina

FIGURA 8 (continuación)

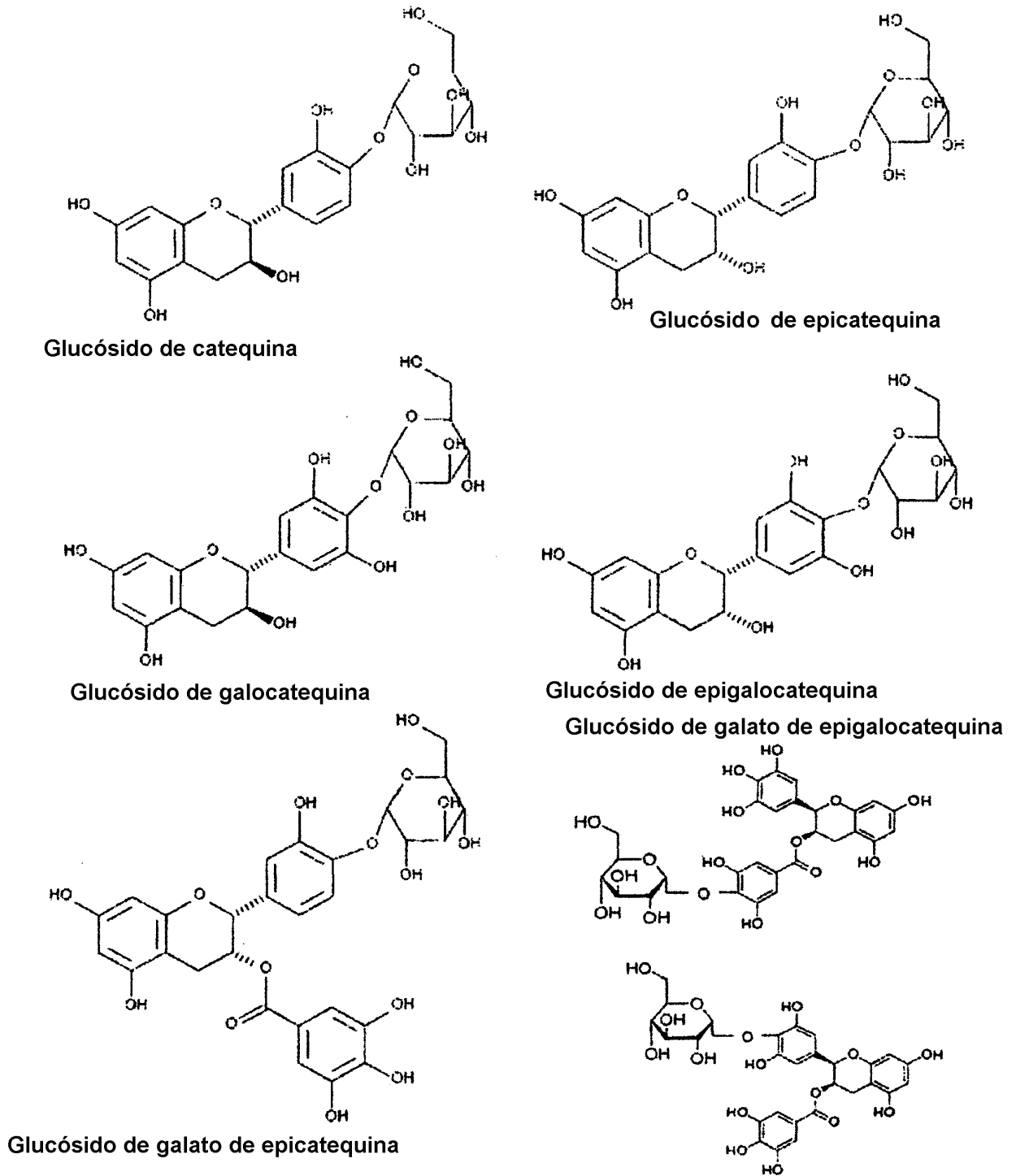


FIGURA 9

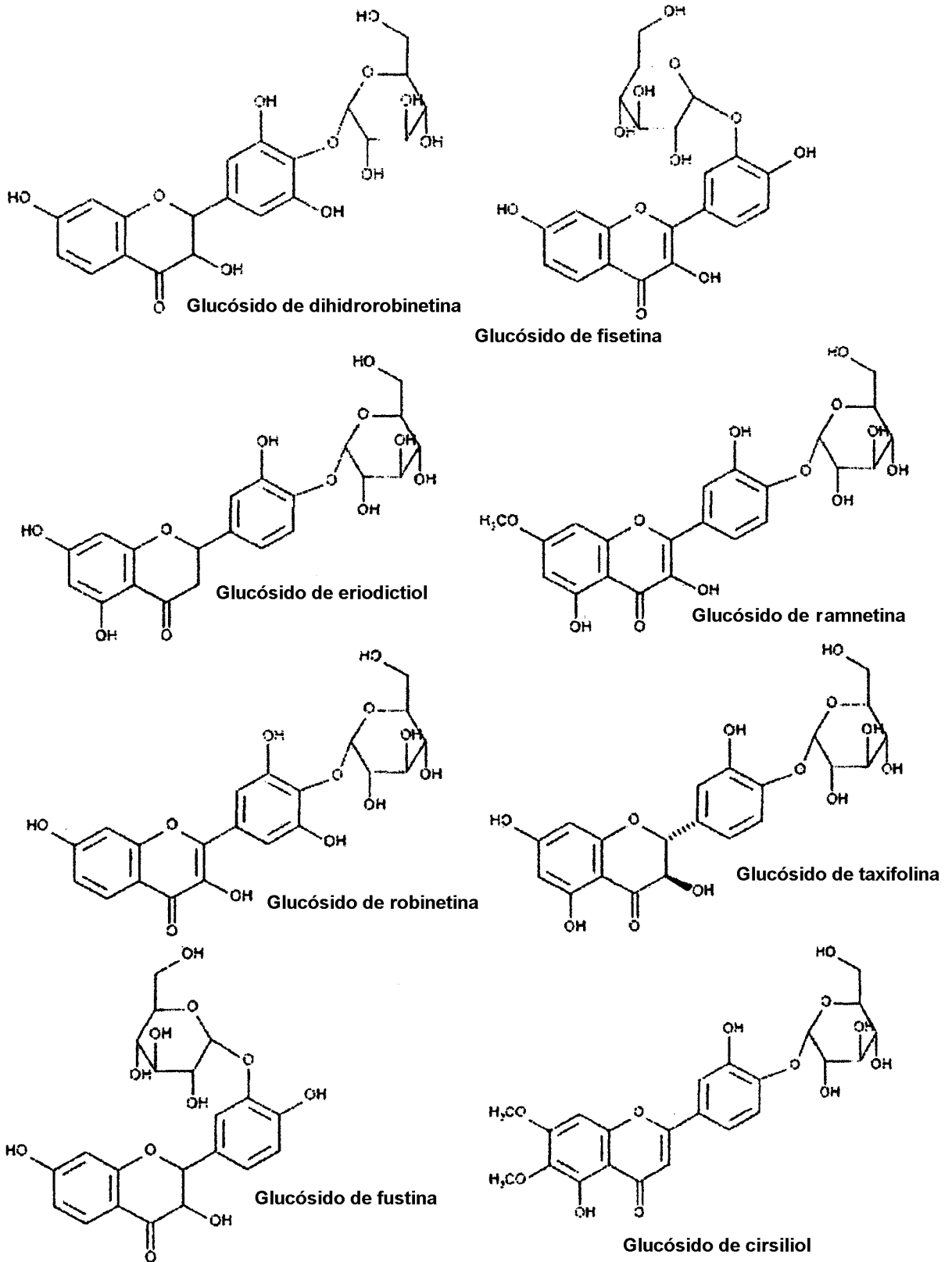
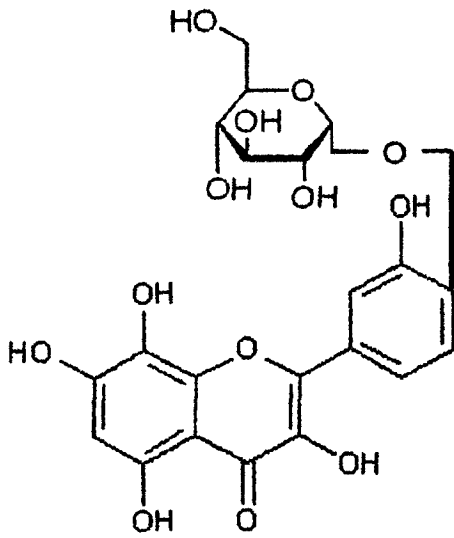
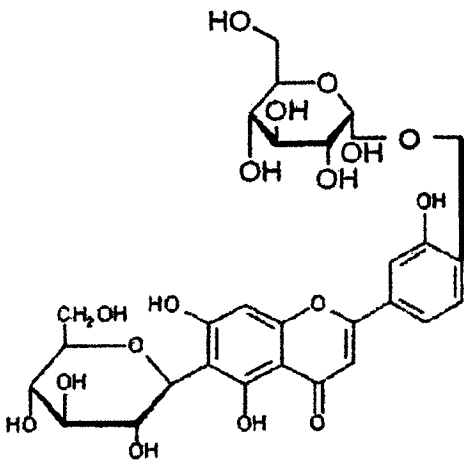


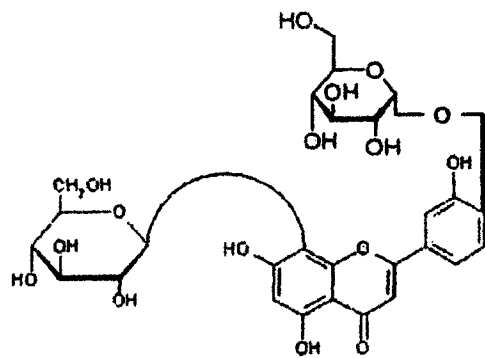
FIGURA 10



Glucósido de gosipetina



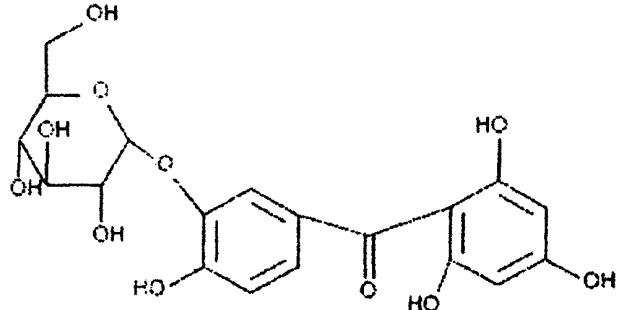
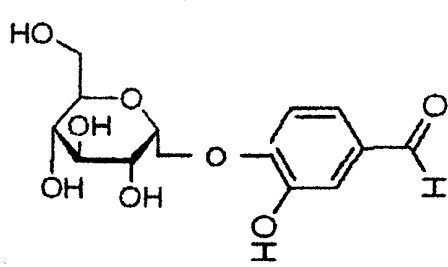
Glucósido de homoorientina



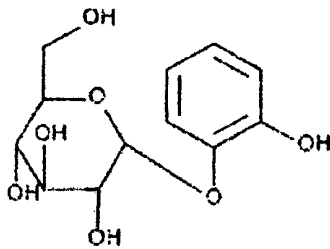
Glucósido de orientina

FIGURA 10 (continuación)

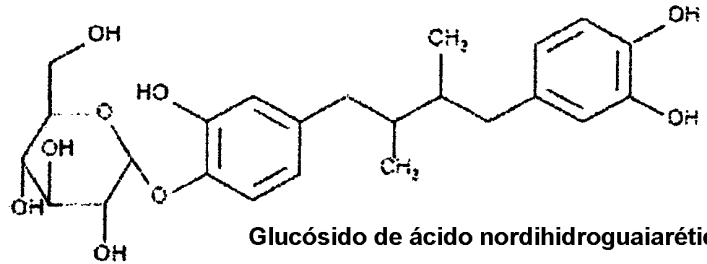
Glucósido de 3,4-dihidroxibenzaldehído



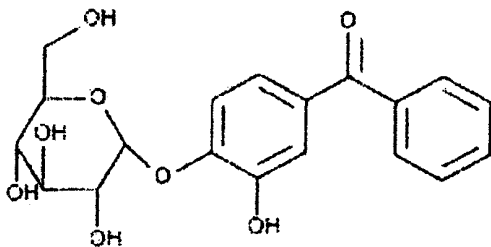
Glucósido de maclurina



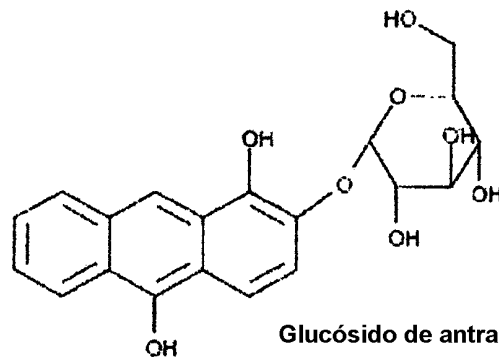
Glucósido de pirocatecol



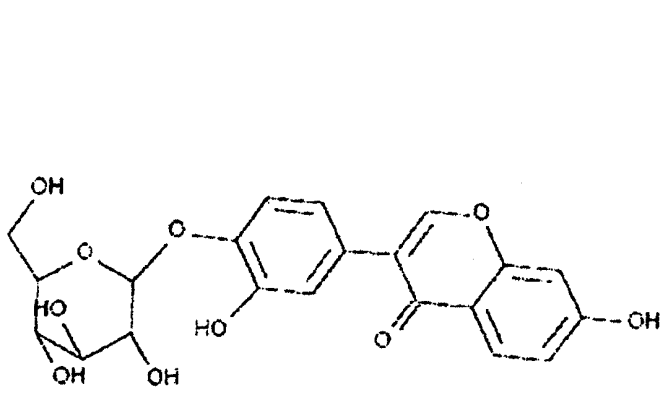
Glucósido de ácido nordihidroguaiarético



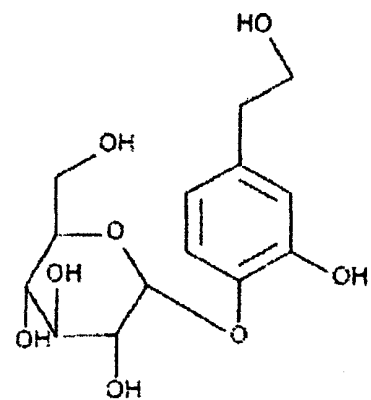
Glucósido de 3,4-dihidroxibenzofenona



Glucósido de antrarobina



Glucósido de 3-hidroxidaidzeína



Glucósido de hidroxitirosol

FIGURA 11

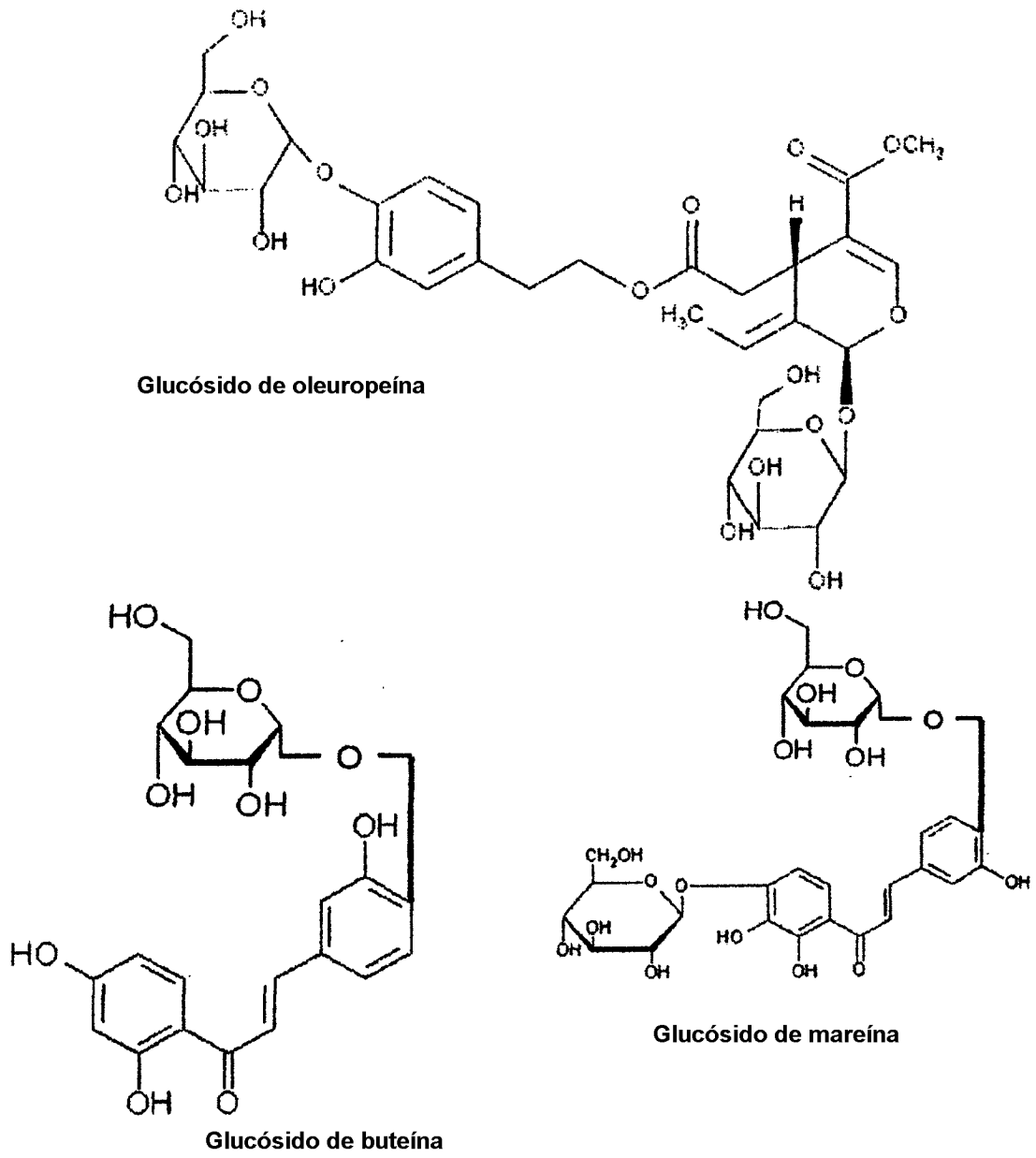
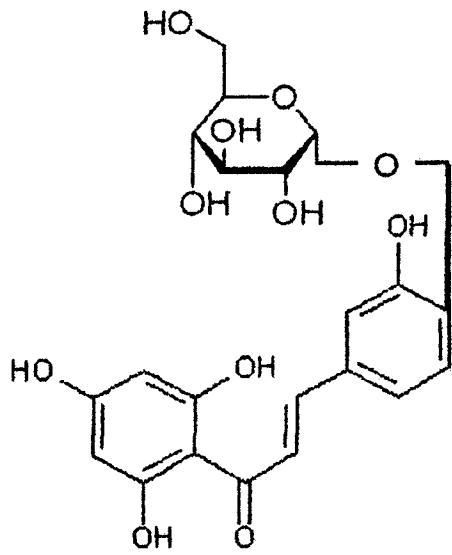
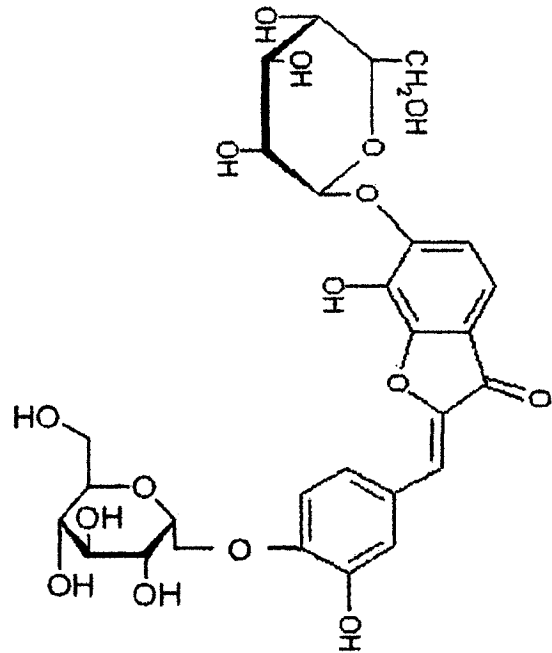


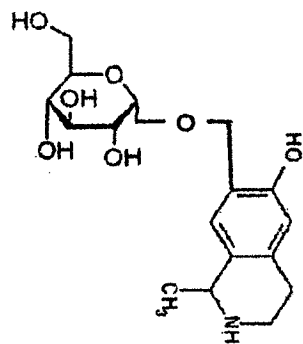
FIGURA 11 (continuación)



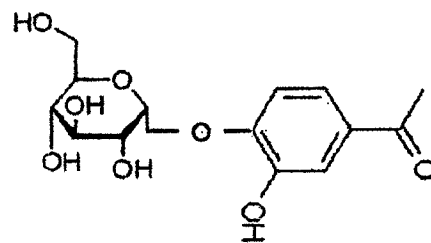
Glucósido de eriodictiolchalcona



Glucósido de maritimaína



Glucósido de salsolinol



Glucósido de 3,4-dihidroxiacetofenona

FIGURA 11 (continuación)

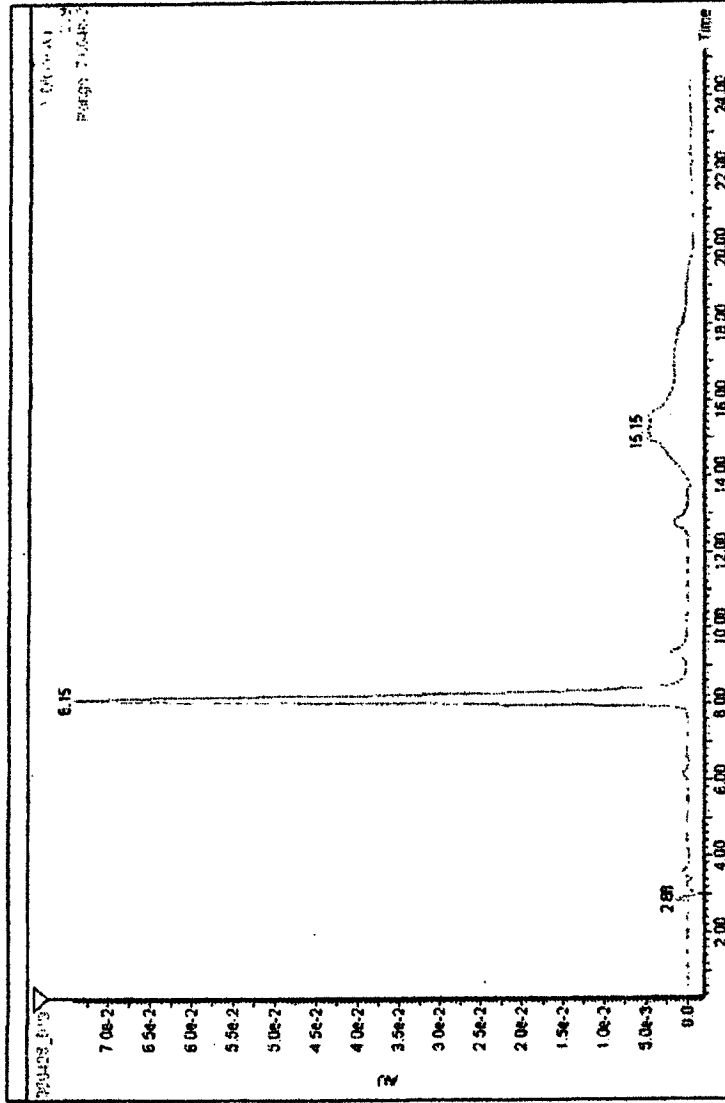


Figura 12

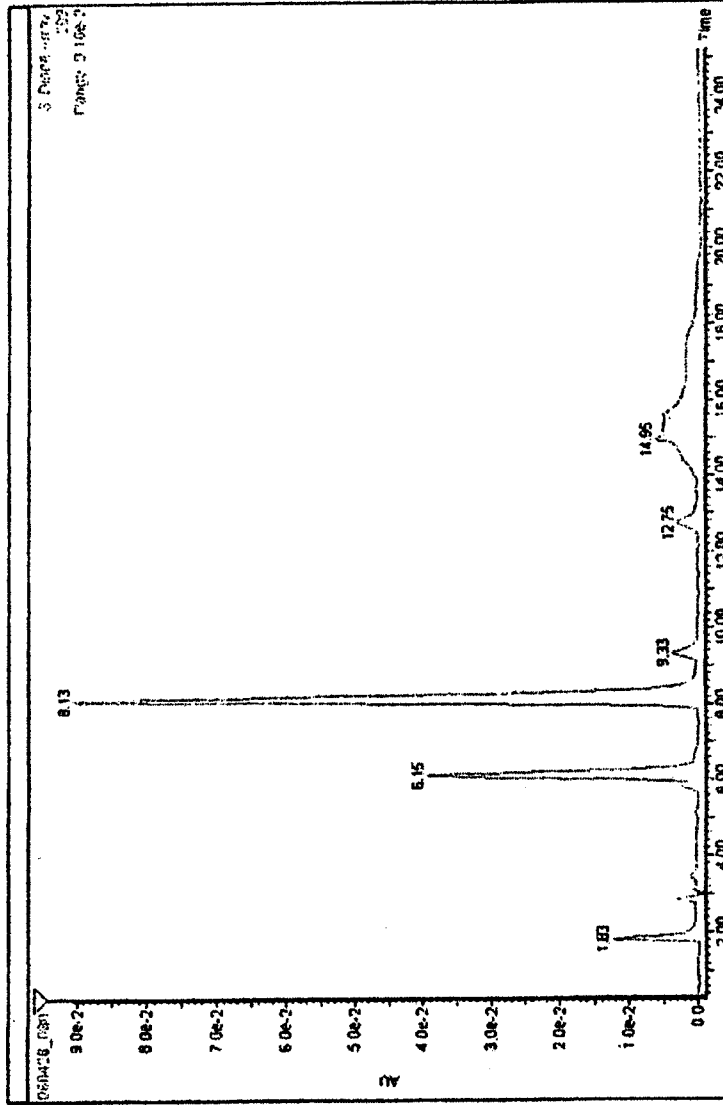


Figura 13

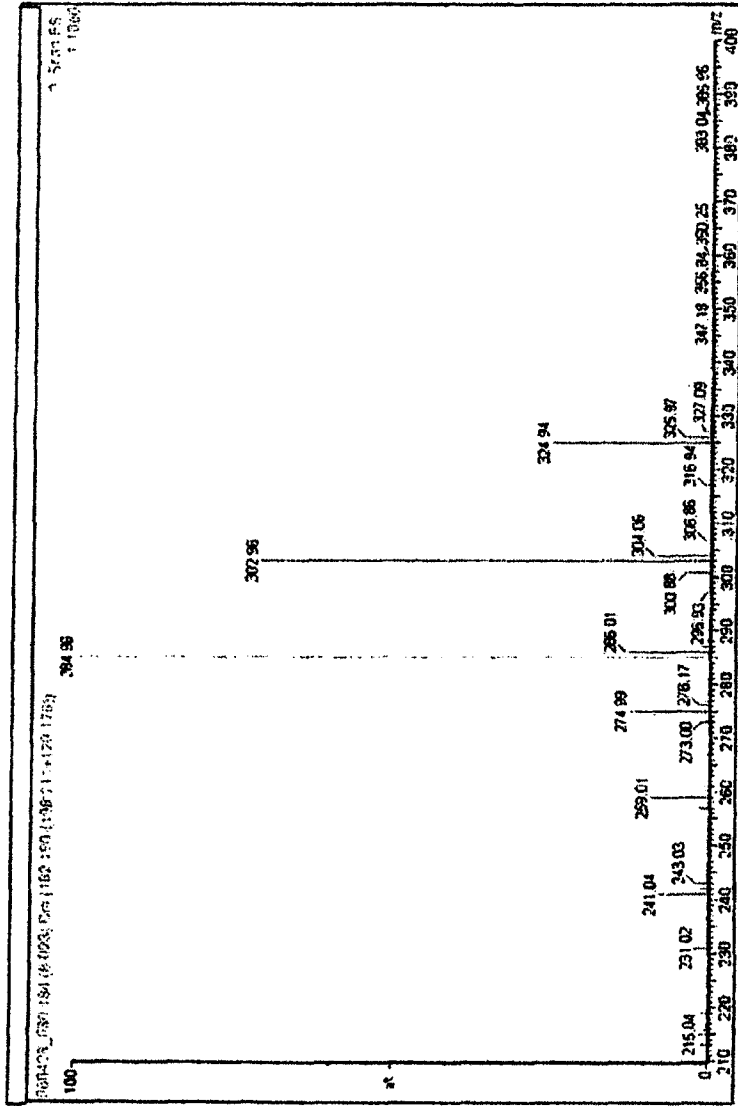


Figura 14

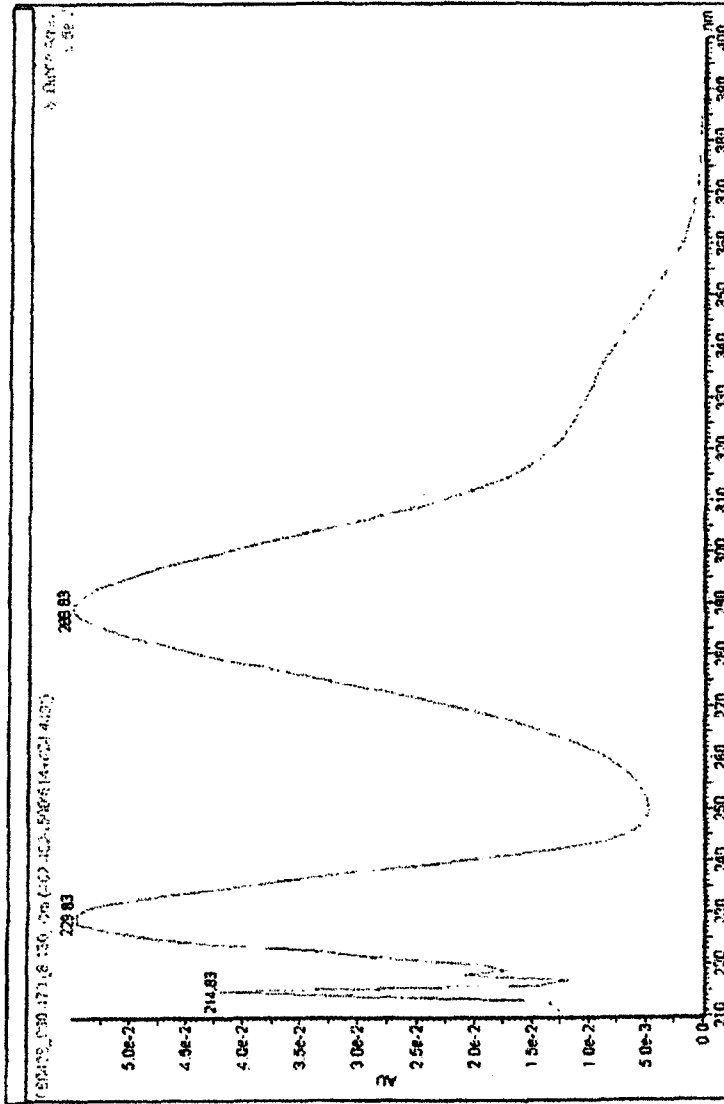


Figura 15

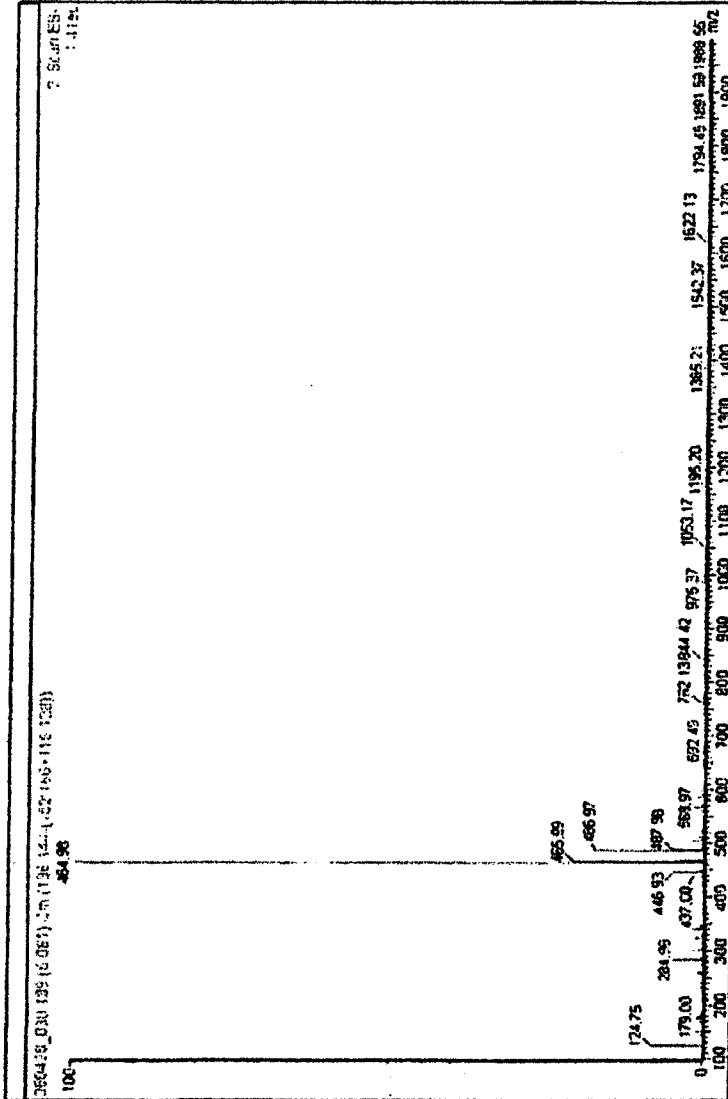


Figura 16