(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 564 088**

(21) Número de solicitud: 201500145

(51) Int. CI.:

C07H 3/04 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A2

(22) Fecha de presentación:

05.05.2014

(30) Prioridad:

05.05.2014 ES 201400374

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

17.03.2016

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE SEVILLA (100.0%)
Secretariado de Transferencia de conocimiento y Emprendimiento, Pabellón de Brasil,
Paseo de las Delicias s/n
41013 Sevilla ES

(72) Inventor/es:

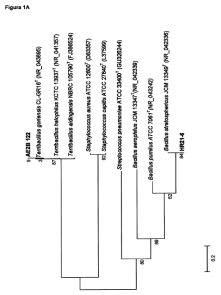
MELLADO DURÁN, Encarnación;
FERNÁNDEZ-BOLAÑOS GUZMÁN, José María;
MAYA CASTILLA, Inés;
ESCOBAR NIÑO, Almudena;
SÁNCHEZ BARRIONUEVO, Leyre;
CÁNOVAS LÓPEZ, David;
GONZÁLEZ BENJUMEA, Alejandro y
LÓPEZ LÓPEZ , Oscar

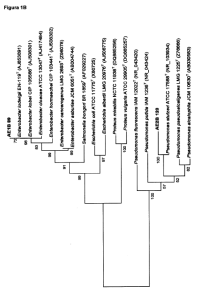
(54) Título: **Derivados acilados de carbohidratos, métodos de obtención y usos de los mismos**

(57) Resumen:

Derivados acilados de carbohidratos, métodos de obtención y usos de los mismos.

La presente invención describe derivados acilados de carbohidratos, preferentemente a los compuestos de fórmula 2,3,4,6,6'-penta-O-acetil-α,α-D-trehalosa o 2,3,4,6-tetra-O-acetil-α,α-D-trehalosa, así como el uso de los mismos como intermedios de reacción para la síntesis de derivados de trehalosa o para la elaboración de análogos de glicolípidos presentes en *Mycobacterium tuberculosis,* y que son de interés en la industria farmacéutica y alimentaria. La presente invención se refiere también al procedimiento de obtención de los análogos de glicolípidos presentes en *Mycobacterium tuberculosis,* que se lleva a cabo en presencia de un extracto enzimático obtenible a partir de un cultivo de cualquiera de las cepas bacterianas seleccionadas de entre: *Bacillus* CECT 8464, *Enterobacter* CECT 8462, *Pseudomonas* CECT 8463 y *Terribacillus* CECT 8231.





ES 2 564 088 A2

DERIVADOS ACILADOS DE CARBOHIDRATOS, MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y USOS DE LOS MISMOS

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a las cepas microbianas de los géneros *Terribacillus* denominada *Terribacillus* sp. AE2B122, *Bacillus*, denominada *Bacillus* sp. HR21-6, *Enterobacter*, denominada *Enterobacter* sp. AE1B89 y *Pseudomonas*, denominada *Pseudomonas* sp. AE2B120 con capacidad de llevar a cabo reacciones de alcoholisis y esterificación regioselectivas y el uso de las mismas en reacciones de acilación y/o desacilación, en general y más específicamente, en reacciones de acilación y/o desacilación para la producción de carbohidratos y polifenoles lipófilos de interés en la industria farmacéutica y alimentaria. Asimismo, la invención también se refiere a un método para obtener estas cepas microbianas con capacidad de llevar a cabo estas reacciones. Así como la obtención de regioisómeros de los azúcares y polifenoles parcialmente acilados. Por lo tanto, la invención es de utilidad en los campos de la Microbiología Industrial e Ingeniería Química, en particular, en el sector de la producción de compuestos de interés en la industria farmacéutica y alimentaria.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La protección y desprotección quimio-, regio- y estereoselectiva constituye una de las estrategias más utilizadas en síntesis orgánica, especialmente valiosa en la síntesis de moléculas complejas y polifuncionales, entre las que se encuentran los carbohidratos y los polifenoles. Aunque son muchos los avances que se han conseguido en este campo en las últimas décadas, aún se está muy lejos de alcanzar la perfección de las reacciones naturales, por lo que este aspecto sigue siendo hoy en día uno de los grandes retos en síntesis orgánica.

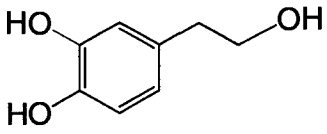
La biocatálisis, y particularmente el uso de enzimas hidrolíticas como las lipasas, constituye una alternativa a los métodos convencionales en síntesis orgánica y puede ser útil para realizar protecciones y desprotecciones estéreo- y regioselectivas en carbohidratos (Filice, M. et al. *Nat. Protoc.* 7, 1783-1796; 2012) y polifenoles (Torres, P. et al. *J. Agric. Food Chem.* 58, 807-813; 2010). Determinados carbohidratos y polifenoles son de interés en la industria farmacéutica y alimentaria como se explica a continuación.

Diversos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto los efectos beneficiosos para la salud que se derivan del consumo de alimentos ricos en antioxidantes, ya que previenen el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas, incluidas enfermedades cardiovasculares y cáncer (Grez et al., *Curr Opin Pharmacol* 104, 362-368; 2010). Dichos compuestos evitan los daños producidos por el estrés oxidativo en ciertas biomoléculas (ADN, lípidos, proteínas), que se encuentran asociados con un incremento en el riesgo de problemas cardiovasculares, cáncer y otras enfermedades crónicas (Cilla et al., *Ann Nutr Metab* 54, 35-42; 2009).

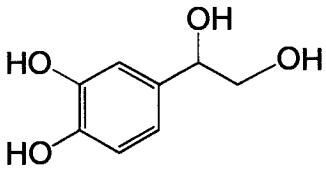
Algunos estudios demuestran que los compuestos polifenólicos naturales son, *in vitro*, más efectivos como antioxidantes que la vitamina A o C (Miller et al., *J Nutr Environ Med* 12, 39-51; 2002), por lo que existe un creciente interés de este tipo de compuestos, en especial aquellos que pueden ser obtenidos a partir de subproductos generados en la industria alimentaria. En este contexto, destaca el hidroxitirosol, que predomina en el olivo (*Olea europea*), tanto en las hojas como en su fruto, ya sea libre o en forma de derivado, y que es un compuesto fenólico de una reconocida eficacia como antioxidante (Fernández-Bolaños et al., *Curr Org Chem* 12, 442-463; 2008).

En los últimos años, se ha comprobado que este antioxidante natural posee además importantes propiedades biológicas: antiagregante plaquetario (González Correa et al. *Br J Nutr*, 101, 1157-1164, 2009), antiinflamatorio (Gong et al., *Phytother Res* 23, 646-650, 2009), cardioprotector (Poudyal, H.J. *Nutrition* 140, 946-953; 2010), antimicrobiano (Medina et al. *J Agric Food Chem* 55, 9817-9823; 2007), y anti-VIH (Lee-Huang et al., *Biochem Biophys Res Commun* 354, 872-878; 2007). Actualmente, son numerosas las investigaciones que intentan demostrar el beneficio de este compuesto en el tratamiento de ciertas enfermedades neurodegenerativas (Schaffer et al., *J Agric Food Chem* 55, 5043-5049, 2007), y de la piel (Guo et al,. *Phytother Res* 24, 352-359; 2010), en la prevención del ictus cerebral isquémico y en la prevención y tratamiento del cáncer (Sirianni et al., *Mol Nutr Food Res* 54, 833-840, 2010).

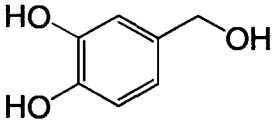
La aceituna contiene, además de hidroxitirosol, una amplia variedad de compuestos fenólicos, tales como el 3,4-dihidroxifenilglicol (Brenes, M.J. *Agric Food Chem* 47, 3535-3540; 1999) y el alcohol protocatecuico (Saitta, M. et al. *Food Chem* 112, 525-532, 2009).



Hidroxitirosol



3,4-Dihidroxifenilglicol



Alcohol protocatecuico

Diversos estudios sobre los compuestos fenólicos del olivo muestran la importancia de los acil derivados en la cadena lateral de estos compuestos polifenólicos naturales, ya que el carácter lipófilo permite su dispersión en aceite, el atravesar membranas celulares y la captación por las células, y la protección de constituyentes de membrana y de LDL (Gupta et al., *Adv. Food Nutr.* Res. 69, 183-217; 2013). Es decir, se mejoran las propiedades físico-químicas y se conservan las propiedades antioxidantes. Por lo tanto, es de gran interés para la industria alimentaria la obtención de nuevos antioxidantes lipofílicos mediante modificación de polifenoles naturales. Estos análogos estructurales lipófilos tienen una mejor biodisponibilidad, son más eficaces que los polifenoles naturales utilizados como material de partida, y son útiles en la formulación de "alimentos funcionales" que presentan efectos beneficiosos para la salud.

Bouallagui y colaboradores (Bouallagui et al., *Appl Biochem Biotechnol* 163, 592-599, 2011) han descrito la producción enzimática de hidroxitirosol acetato e hidroxitirosol oleato usando la lipasa de *C. antarctica* (Novozym 435), obteniendo compuestos con actividades biológicas optimizadas en cuanto a la biodisponibilidad y actividad antioxidante. La acilación catalizada con lipasa de *C. antarctica* B tiene lugar quimioselectivamente sobre el hidroxilo de la cadena alifática frente a los hidroxilos aromáticos (Torres de Pinedo et al., *Tetrahedron* 61, 7654-7660; 2005).

Por otra parte, azúcares esterificados parcialmente o con diferentes funciones en los distintos carbonos, constituyen importantes "*building blocks*" para la síntesis de una amplia variedad de derivados más complejos. Así por ejemplo, los monosacáridos y oligosacáridos con un único hidroxilo libre son compuestos intermedios para la síntesis de heterooligosacáridos de interés biomédico y actividad farmacológica como antitumorales, antiinflamatorios, etc. (Plou et al., *J Biotechnol* 96, 55-66; 2002).

Desafortunadamente, el elevado número de grupos hidroxilo en los azúcares y su similar reactividad hace que en muchos casos no sea posible introducir regioselectivamente determinadas funciones, o requiera recurrir a una larga y costosa secuencia de síntesis, para llevar a cabo transformaciones en solo alguno de los grupos hidroxilo.

A pesar del interés de las reacciones de carbohidratos biocatalizadas con lipasas, los antecedentes de casos de protección o desprotección regioselectiva de monosacáridos en posiciones distintas a C-1 y C-6 son muy escasos. Asimismo, son también muy pocos los ejemplos en los que se describen reacciones de protección/desprotección regioselectiva en uno de los dos carbonos primarios (C-6 y C-6´) de disacáridos de hexosas.

Por lo tanto, existe en el estado de la técnica la necesidad de encontrar nuevas enzimas capaces de llevar a cabo reacciones de acilación y/o desacilación regioselectivas con la finalidad de obtener nuevos compuestos de interés en la industria farmacéutica y alimentaria.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Para superar los problemas existentes en el estado de la técnica mencionados previamente, un primer aspecto de la presente invención describe cepas microbianas seleccionada de la lista que comprende cepa de *Bacillus* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 8464, cepa de *Enterobacter* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 8462, cepa de *Pseudomonas* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 8463 y cepa de *Terribacillus* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número de acceso CECT 8231 que tienen la capacidad de llevar a cabo reacciones regioselectivas de acilación (esterificación) y/o desacilación (alcoholisis), preferentemente sobre polifenoles y/o carbohidratos, preferentemente naturales, lo que permite la obtención de una colección de compuestos de interés acilados y/o eterificados en diferentes posiciones. Así, en base a la capacidad de estas bacterias de llevar a cabo estas reacciones de esterificación y alcoholisis, se han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán explicados en detalle a continuación.

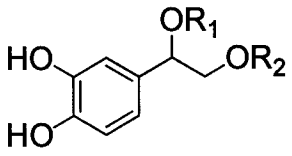
Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere al extracto enzimático obtenible a partir del cultivo de cualquiera de las cepas bacterianas descritas en la presente invención.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere al uso de las cepas bacterianas o al uso del extracto enzimático de la invención como catalizadores para las reacciones enzimáticas de acilación y/o desacilación de compuestos, siendo preferidos los compuestos polifenoles y/o carbohidratos o sus derivados acilados.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere a un método para obtener derivados acilados de polifenoles y/o carbohidratos mediante reacciones enzimáticas de acilación o desacilación sobre polifenoles y/o carbohidratos, que comprende las siguientes etapas:

a) poner el extracto enzimático según se describe en la presente invención, en contacto con polifenoles, carbohidratos o cualquiera de sus derivados acilados, en presencia de un agente acilante o un alcohol alifático para llevar a cabo reacciones enzimáticas de acilación o desacilación, respectivamente; y
b) purificar los derivados acilados de polifenoles y/o carbohidratos obtenidos en la etapa (a).

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere al compuesto de fórmula general (I)



(I)

donde: R_1 es un grupo alquilo (C_1-C_{20}), un grupo alquenilo (C_2-C_{20}), un grupo alquinilo (C_2-C_{20}), o un grupo arilalquilo; y
R_2 es un grupo acilo (-COR_3), donde R_3 es un grupo alquilo C_1-C_{20}, o un hidrógeno.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere al uso del compuesto de fórmula general (I) descrito previamente para la elaboración de un medicamento.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) según se ha descrito previamente junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto descrito en la presente invención hace referencia al uso de al menos un compuesto de fórmula general (I) según se ha descrito previamente para la elaboración de una composición alimenticia.

Otro aspecto descrito en la presente invención hace referencia al uso no terapéutico de al menos un compuesto de fórmula general (I) según se ha descrito previamente, como antioxidante, preferiblemente alimentario, o como componente de composiciones cosméticas.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere a una composición alimenticia o cosmética que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I) según se ha descrito previamente.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula (I) según se ha descrito previamente a lo largo de la presente invención, que comprende:

a. la reacción enzimática del compuesto 3,4-dihidroxifenilglicol peracilado con R_1OH; o
b. la reacción enzimática del compuesto 3,4-dihidroxifenilglicol peracilado con R_1OH y posteriormente la reacción con metanol del compuesto obtenido en el paso (a) bajo catálisis básica;

donde R_1 es un grupo alquilo (C_1-C_{20}), un grupo alquenilo (C_2-C_{20}), un grupo alquinilo (C_2-C_{20}), o un grupo arilalquilo; según se ha definido para el sustituyente R_1 del compuesto general de fórmula (I).

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa o 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa, así como al uso de dichos compuestos como intermediarios de reacción para la síntesis de derivados de trehalosa, así como en la preparación de análogos de glicolípidos presentes en *Mycobacterium tuberculosis*.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de los compuestos 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa o 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa que comprende:

a. la reacción enzimática de per-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa con metanol o metanol deuterado a una temperatura de entre 16-28ºC.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Relación filogenética de las cepas *Terribacillus* sp. AE2B 122, *Bacillus* sp. HR21-6 con otras bacterias Gram positivas **(A)**, y las cepas *Enterobacter* sp. AE1B89 y *Pseudomonas* sp. AE2B120 con otras bacterias Gram negativas **(B)** filogenéticamente relacionadas. Para su realización se ha utilizado el método de *Neighbor-Joining*. Junto a las ramas se muestra el porcentaje de réplicas de los árboles que presentan esos taxones juntos en un mismo agrupamiento en el test estadístico *bootstrap* (500 réplicas). Las distancias evolutivas se han calculado con el método *Maximum Composite Likelihood*, y se expresa en unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Las secuencias comprendían entre 640 y 650 posiciones. Para los análisis filogenéticos se ha usado el programa MEGA4 (http://www.megasoftware.net/mega4/mega.html).

Figura 2. Se representa la actividad antirradicalaria (captación de radicales libres mediante donación de átomos de hidrógeno) frente al radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) expresada en valores de EC_{50} (μM) del acetato de hidroxitirosilo **2,** de los éteres fenólicos **4a-4d**, **5a-5d**, y del 3,4-dihidroxifenilglicol **14**.

Figura 3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (^{1}H-RMN) **(A)** y espectro de resonancia magnética nuclear (1H-RMN) ampliado **(B)** del procedimiento de desacilación del compuesto **27** (metil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-glucopiranósido) mediante el extracto enzimático de la invención.

Figura 4. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (^{1}H-RMN) **(A)** y espectro de resonancia magnética nuclear (1H-RMN) ampliado **(B)** del procedimiento de desacilación del compuesto **30** (per-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa) mediante el extracto enzimático de la presente invención.

Figura 5. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (^{1}H-RMN) **(A)** y espectro de resonancia magnética nuclear (1H-RMN) ampliado **(B)** del procedimiento de desacilación del compuesto **34** (per-*O*-acetilsacarosa) mediante el extracto enzimático de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los inventores de la presente invención han identificado una serie de cepas microbianas, en particular, las cepas bacterianas *Terribacillus* sp. AE2B 122, *Bacillus* sp. HR21-6, *Enterobacter* sp. AE1B89 y *Pseudomonas* sp. AE2B120 depositadas en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con los números de registro 8231 (con fecha de depósito 20.11.2012), 8464, 8462, 8463 (con fecha de depósito de 22 de Octubre de 2013), respectivamente, que tienen la capacidad de llevar a cabo reacciones regioselectivas de acilación (por ejemplo esterificación) y/o desacilación (por ejemplo alcoholisis). Dichas reacciones de acilación y/o desacilación se llevan a cabo preferentemente sobre polifenoles y/o carbohidratos naturales, y de eterificación en posiciones bencílicas de polifenoles durante la alcoholisis de ésteres de hidroxilos fenólicos, lo que permite la obtención de una colección de compuestos de interés acilados y/o eterificados en diferentes posiciones. Así, en base a la capacidad de estas bacterias de llevar a cabo estas reacciones de esterificación y alcoholisis, se han desarrollado una serie de aspectos inventivos que serán explicados en detalle a continuación.

Cepas microbianas de la invención y sus usos

Mediante métodos de *screening* sobre muestras obtenidas de diferentes lugares de procedencia, como por ejemplo almazaras, industrias de conservas de pescado, etc, se han seleccionado una serie de cepas microbianas con actividad lipolítica y capacidad de llevar a cabo reacciones regioselectivas de esterificación (acilación) y/o alcoholisis (desacilación), en particular sobre carbohidratos y/o polifenoles, preferentemente naturales.

Estas cepas microbianas fueron sometidas a un análisis filogenético mediante el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr. De este análisis se identificaron las cepas con las que

mayor valor de identidad presentaban las cepas microbianas de la invención, siendo *Terribacillus goriensis* CL-GR16 (número de acceso a GeneBank: NR_043895), *Bacillus stratosphericus* JCM 13349 (número de acceso a GeneBank NR_042336), *Enterobacter ludwigii* EN-119 (número de acceso a GeneBank AJ853891) y *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588 (número de acceso a GeneBank NR_103934).

Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a las cepas microbianas de la invención, que pertenecen a los géneros *Terribacillus, Bacillus, Enterobacter y Pseudomonas* que, en otra realización todavía más particular, son las cepas microbianas denominadas *Terribacillus* sp. cepa AE2B122 (CECT 8231), *Bacillus* sp. HR21-6 (CECT 8464), *Enterobacter* sp. AE1B89 (CECT 8462) y *Pseudomonas* sp. AE2B120 (CECT 8463).

Las cepas microbianas de la invención fueron depositadas bajo el Tratado de Budapest en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) [Parc Científic Universitat de València, calle Catedrático Agustín Escardino, 9, 46980 Paterna (Valencia)] el 20 de Noviembre de 2012 (CECT 8231), y el 22 de Octubre de 2013 (CECT 8464, CECT 8462 y CECT 8463).

Por lo tanto, un aspecto de la invención se relaciona con las cuatro cepas microbianas, con capacidad de llevar a cabo reacciones de acilación / desacilación que están depositadas en la CECT con los números de registro CECT 8231, CECT 8464, CECT 8462 y CECT 8463. En una realización particular, las cepas preferidas son: CECT 8464, CECT 8462 y CECT 8463.

Como entiende el experto en la materia, las cepas microbianas de la invención pueden ser cultivadas en un medio de cultivo líquido para obtener un sobrenadante que, después de ser sometido a procesos de concentración y opcionalmente, liofilización y/o dialización, se obtiene un extracto enzimático que, al igual que cualquiera de las cepas de la invención, puede usarse para llevar a cabo reacciones de acilación y/o desacilación, siendo útil en la producción de los compuestos de interés.

Además, las cepas microbianas de la invención pueden ser cultivadas en presencia o en ausencia de un sustrato lipídico con el objetivo de obtener sobrenadantes que contendrán

las enzimas y compuestos necesarios para llevar a cabo la reacción de acilación y/o desacilación.

A efectos de la presente invención, el término "sustrato lipídico" se refiere a un compuesto de naturaleza lipídica, sobre el cual actuarán las lipasas de las cepas microbianas. Ejemplos de sustratos lipídicos incluyen, sin limitar a, surfactantes, triglicéridos, aceites esenciales, más particularmente, tributirina, Tween 80, Tween 20 y aceites vegetales, tales como aceite de oliva y/o aceite de girasol. En una realización particular, el sustrato lipídico es tributirina. La concentración del sustrato lipídico en el medio de cultivo puede ser variable, pudiendo emplearse concentraciones de entre 0,1 - 4%, e incluso mayores. Preferiblemente, la concentración del sustrato lipídico en el medio de cultivo es de alrededor del 2% en peso con respecto al cultivo final.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un extracto enzimático obtenible a partir del cultivo de las cepas microbianas de la invención, capaz de llevar a cabo reacciones de acilación y/o desacilación. A efectos de la presente invención los términos sobrenadante y extracto enzimático se utilizan indistintamente.

A efectos de la presente invención, el término "extracto enzimático" o "sobrenadante" se refiere al sobrenadante obtenible del cultivo de las cepas de la invención, que opcionalmente puede ser sometido a procedimientos de concentración, liofilización y/o dialización y que comprende las enzimas que las cepas microbianas descritas en la presente invención excretan al medio de cultivo y que presentan actividad lipolítica y que son capaces de llevar a cabo reacciones regioselectivas de esterificación (acilación) y/o alcoholisis (desacilación), es decir se utilizan como catalizadores biológicos. El extracto enzimático o sobrenadante de la invención es, a efectos de la presente invención, un cóctel enzimático obtenido de los cultivos de las cepas de la invención.

Sin querer estar vinculado a ninguna teoría, los inventores consideran que, en el sobrenadante obtenido de los cultivos de las cepas de la invención, en medio líquido, están comprendidas las enzimas necesarias para llevar a cabo dichas reacciones de acilación y/o desacilación. Entre las enzimas que pueden formar parte de dicho sobrenadante se encuentran las lipasas que son enzimas que catalizan un amplio rango de reacciones (hidrólisis, interesterificaciones, alcoholisis, acidólisis, esterificación y

aminolisis, entre otras), incluyendo las reacciones que se detectan y se muestran en los ensayos y ejemplos que se describen lo largo de la presente invención.

El sobrenadante obtenido mediante el cultivo de las cepas de la invención pueden contener no sólo las enzimas necesarias para llevar a cabo reacciones de acilación y/o desacilación, sino que también puede contener otro tipo de compuestos que pueden interaccionar con dichas enzimas, disminuyendo o potenciando la eficacia de conversión del sustrato a los productos resultantes de las reacciones. Por lo tanto, puede ser conveniente someter al sobrenadante a un proceso de concentración y de diálisis para eliminar aquellas partículas o compuestos no deseables.

En la presente invención se entiende por "concentración y/o diálisis" al proceso de separar las moléculas en una solución por la diferencia en sus índices de difusión a través de una membrana semipermeable. Típicamente, una solución de varios tipos de moléculas es puesta en una bolsa semipermeable de diálisis, como por ejemplo, en una membrana de celulosa con poros, y la bolsa es sellada. La bolsa de diálisis sellada se coloca en un envase con una solución diferente, o agua pura. Las moléculas lo suficientemente pequeñas como para pasar a través de los poros (a menudo agua, sales y otras moléculas pequeñas) tienden a moverse hacia adentro o hacia afuera de la bolsa de diálisis en la dirección de la concentración más baja. La técnica de diálisis es ampliamente conocida en el estado de la técnica y su puesta en práctica es rutinaria para el experto en la materia. En la puesta en práctica de la presente invención, el sobrenadante de la invención se vertió en una bolsa de diálisis de 12 KDa y tras ser concentrado con polietilenglicol 8 KDa, se dializó con tampón fosfato potásico.

Por lo tanto, en una realización particular, el extracto enzimático descrito en la presente invención, obtenido a partir de los cultivos de las cepas de la invención, está concentrado y/o dializado.

Adicionalmente, tanto si el extracto enzimático de la invención está concentrado y/o dializado o no, éste puede ser sometido a un proceso de liofilización. Por lo tanto, en otra realización particular, el sobrenadante de la invención está liofilizado.

La liofilización es un proceso en el que se congela el producto y, posteriormente, se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. La técnica de liofilización es ampliamente conocida en el estado de la técnica y su aplicación es práctica de rutina para el experto en la materia.

Una vez obtenidas tanto las cepas microbianas de la invención, como los extractos enzimáticos producidos a partir del cultivo de éstas, y probado que son capaces de llevar a cabo reacciones de acilación y/o desacilación, el experto en la materia entiende que, tanto las cepas microbianas, como los extractos enzimáticos de la invención, pueden emplearse para producir los compuestos de interés que se indican más adelante.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de las cepas microbianas o de los extractos enzimáticos obtenidos de cultivos de dichas cepas, según la invención, para la producción de derivados acilados, siendo preferentemente los sustratos de partida, polifenoles y/o carbohidratos, naturales o no.

En una realización particular, la producción de derivados acilados de polifenoles y/o carbohidratos se lleva a cabo mediante reacciones regioselectivas de acilación o desacilación de polifenoles y/o carbohidratos, preferentemente naturales.

A efectos de la presente invención los términos "regioselectivo/a" o "regioselectividad" se refieren a la preferencia de una reacción de esterificación o hidrólisis en un hidroxilo alifático de varios posibles, o un hidroxilo aromático de varios posibles.

A efectos de la presente invención los términos "quimioselectivo/a" o "quimioselectividad" se refieren a la preferencia de una reacción de esterificación o alcoholisis en un hidroxilo alifático (alcohol) frente a un hidroxilo aromático (fenol) o viceversa.

Más detalles sobre la producción de derivados acilados de polifenoles y/o carbohidratos mediante el empleo de las cepas microbianas o de los extractos enzimáticos de las mismas, descritos en la presente invención, puede encontrarse en los Ejemplos 3 y 5 donde se describe el método de producción de los mismos.

Biotransformaciones regioselectivas para la obtención de derivados acilados lipofílicos de polifenoles y/o carbohidratos.

Como se ha explicado anteriormente, los inventores han descubierto nuevas cepas microbianas con capacidad de llevar a cabo reacciones de acilación y/o desacilación sobre polifenoles y/o carbohidratos, preferentemente naturales o no, por lo que tanto las cepas microbianas, como los extractos enzimáticos obtenidos a partir del cultivo de las mismas, pueden emplearse en la obtención de los compuestos que se indican a continuación.

Así, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método para obtener derivados acilados de polifenoles y/o carbohidratos, preferentemente a partir de polifenoles y/o carbohidratos naturales, mediante reacciones de acilación o desacilación sobre polifenoles y/o carbohidratos, que comprende las siguientes etapas:

a) poner el extracto enzimático según se define a lo largo de la presente invención, en contacto con polifenoles, carbohidratos o cualquiera de sus derivados acilados, en presencia de un agente acilante o un alcohol alifático para llevar a cabo reacciones enzimáticas de acilación o desacilación, respectivamente y, opcionalmente
b) purificar los derivados acilados de polifenoles y/o carbohidratos obtenidos en la etapa (a).

A efectos de la presente invención, el término "purificar" o "purificación" se refiere tal y como se emplea en la descripción, a la separación de los derivados acilados de polifenoles y/o carbohidratos obtenidos mediante el método descrito en la invención y a su concentración. La separación de dichos compuestos del resto de productos que le puedan acompañar y que no sean de interés, puede llevarse a cabo mediante técnicas de solubilidad diferencial, cromatografía, electroforesis o isoelectroenfoque. Las técnicas de cromatografía pueden estar basadas en el peso molecular, la carga o la afinidad de la proteína y puede realizarse en columna, en papel o en placa. La separación de los compuestos puede realizarse, por ejemplo, por cromatografía líquida rápida (FPLC, del inglés *Fast Protein Liquid Cromatography*), en un sistema automatizado que reduce notablemente el tiempo de purificación e incrementa el rendimiento de la purificación.

En una etapa previa a la etapa a) del método de la invención, las cepas microbianas de la invención son cultivadas en presencia o en ausencia de un sustrato lipídico con el objetivo de obtener unos extractos enzimáticos que contengan las enzimas y compuestos necesarios para llevar a cabo la reacción de acilación y/o desacilación sobre los polifenoles y/o carbohidratos.

Las cepas bacterianas de la invención se crecen en un medio de cultivo líquido para extraer el sobrenadante y posteriormente obtener los extractos enzimáticos. Para *Terribacillus* sp. AE2B 122 (CECT 8231), *Bacillus* sp. HR21-6 (CECT 8234) se ha utilizado como medio de cultivo, PYA (agar, peptona y extracto de levadura). En el caso de *Enterobacter* sp. AE1B89 (CECT 8232) y *Pseudomonas* sp. AE2B120 (CECT 8233) se ha utilizado como medio de cultivo, LB (Luria-Bertani), aunque es importante mencionar que se podría utilizar cualquier otro medio de cultivo en el cual las cepas de la invención puedan crecer.

Opcionalmente, el cultivo líquido se puede suplementar con un sustrato lipídico para incrementar la secreción de las enzimas presentes en el extracto enzimático de la invención, secretadas por las cepas de la invención y que son las responsables de llevar a cabo las reacciones de acilación/desacilación sobre los polifenoles y/o carbohidratos. Como se ha comentado previamente, dichas enzimas se considera que son, preferentemente, lipasas. Así, en una realización particular, el medio de cultivo puede estar suplementado con un sustrato lipídico, de acuerdo a como se ha descrito previamente en la presente descripción de la invención.

Los cultivos se realizan a temperatura de entre 22ºC y 37ºC, en agitación durante 2-3 días. Transcurridos estos días se extrae el sobrenadante que como hemos mencionado anteriormente, contendrá las enzimas, preferentemente lipasas, encargadas de llevar a cabo las reacciones descritas en la presente invención.

El sobrenadante resultante de los cultivos puede aislarse por técnicas de rutina para el experto en la materia. Por ejemplo, una vez transcurrido el periodo de incubación, el cultivo puede dejarse reposar para que las células decanten o puede someterse a centrifugación, consiguiendo de ambas formas separar las células del medio de cultivo

líquido. Posteriormente, puede obtenerse el sobrenadante, por ejemplo por aspiración con una pipeta.

Una vez obtenido el extracto enzimático, éste se pone en contacto con los compuestos que se quieran someter a las reacciones de acilación/desacilación [etapa (a)]. Las condiciones adecuadas para llevar a cabo estas reacciones se explican detalladamente en cada uno de los ejemplos que contiene la presente invención.

En una realización preferida, los compuestos de partida son preferentemente polifenoles o carbohidratos.

En otra realización preferida, los sustratos de tipo fenólico de la etapa a) del método de la invención, se seleccionan preferentemente de entre cualquiera de los siguientes: hidroxitirosol, 3,4-dihidroxifenilglicol, alcohol protocatecuico y derivados acetilados de los mismos, preferiblemente: hidroxitirosol triacetilado, 3.4-dihidroxifenilglocol tetraacilado y alcohol protocatecuico peracilado.

En otra realización preferida, los sustratos de tipo carbohidratos del paso a) del método de la invención, se seleccionan de entre mono-, di-, oligo-, polisacáridos o cualquiera de sus derivados acilados, preferiblemente: metil α-D-glucopiranosido per-O-acetilado, trehalosa octaacetilada y sacarosa octaacetilada.

Por "derivados acetilados" se refiere a compuestos fenólicos o carbohidratos con al menos un grupo –OH sustituido por un grupo $–OCOCH_3$.

Tal como se ha explicado previamente, en el presente documento, los sobrenadantes obtenidos en una etapa previa a la etapa a) del método de la invención, pueden concentrarse y/o dializarse, según se ha explicado previamente, o pueden usarse tal cuales.

Por lo tanto, en una realización particular, el método de obtención de derivados acilados de polifenoles y/o carbohidratos de la invención comprende entre las etapas (a) y (b), una etapa opcional dirigida a la concentración y/o dialización de los sobrenadantes, así como

a su posterior liofilización. Las técnicas de concentración, dialización y liofilización se describen con detalle en el Ejemplo 2.

A continuación se detallan las diferentes reacciones de acilación/desacilación de compuestos fenólicos y/o carbohidratos mediante las reacciones enzimáticas catalizadas por las enzimas presentes en los sobrenadantes o extractos enzimáticos recogidos de los cultivos de las cepas descritas en la presente invención, para la obtención de compuestos fenólicos y/o carbohidratos acilados lipofílicos.

En una realización preferida, la reacción enzimática es de desacilación, el polifenol del paso (a) es un derivado acetilado de hidroxitirosol, 3,4-dihidroxifenilglicol o alcohol protocatecuico, preferiblemente hidroxitirosol triacetilado, 3,4-dihidroxifenilglocol tetraacilado o alcohol protocatecuico peracilado, y la reacción se lleva a cabo en presencia de un alcohol alifático.

Por "alcohol alifático" se entiende en la presente invención a un grupo alquilo (C_1-C_7), lineal o ramificado, con al menos un radical –OH, por ejemplo, pero sin limitarse a metanol, etanol, propanol, butanol, entre otros. Preferiblemente el alcohol alifático es metanol (MeOH). El alcohol alifático puede estar opcionalmente deuterado a temperatura ambiente (aprox. 18-30ºC).

En una realización más preferida, la reacción enzimática es de desacilación, el polifenol del paso (a) es un hidroxitirosol triacetilado y la reacción se lleva a cabo en presencia de metanol.

En otra realización preferida, la reacción enzimática es de desacilación de los hidroxilos aromáticos, el polifenol del paso (a) es 3,4-dihidroxifenilglicol tetraacilado o alcohol protocatecuico peracilado y la reacción se lleva a cabo en presencia de un alcohol alifático para producir la eterificación en la posición bencílica.

En otra realización preferida, la reacción enzimática es de acilación, el polifenol del paso (a) es hidroxitirosol, 3,4-dihidroxifenilglicol o alcohol protocatecuico y la reacción se lleva a cabo en presencia de un grupo acilante y opcionalmente de un co-disolvente.

Por "grupo acilante" se entiende a un reactivo capaz de reaccionar con un compuesto agregando un grupo acilo a su estructura, como por ejemplo, el grupo acilante puede ser sin limitarse a acetato de isopropenilo o acetato de vinilo, que a su vez actúan de disolvente.

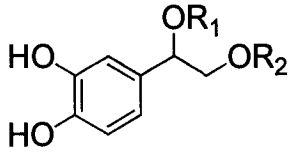
La reacción de acilación se puede hacer en ausencia o presencia de un adsorbente del sobrenadante de los cultivos de las cepas de la invención, tal como celita. Se obtienen mejores resultados con el extracto enzimático soportado sobre celita. Si el compuesto fenólico empleado es poco soluble en el agente acilante se puede utilizar un co-disolvente, por ejemplo DMF (*N,N*-dimetil formamida).

En otra realización preferida, la reacción enzimática es de desacilación, el carbohidrato del paso (a) es metil α-D-glucopiranósido per-*O*-acetilado, per-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa, per-*O*-acetil-sacarosa, trehalosa octaacetilada o sacarosa octaacetilada y la reacción se lleva a cabo en presencia de alcohol alifático, preferiblemente metanol o metanol deuterado a temperatura ambiente (16-28ºC).

En un realización más preferida, la reacción enzimática es de per-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa con metanol o metanol deuterado a una temperatura de entre 16-28ºC, obteniéndose los compuestos 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa o 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa o la reacción enzimática de per-*O*-acetil-sacarosa con metanol o metanol deuterado a una temperatura de entre 16-28ºC, obteniéndose los compuestos 2,3,4,6,1',6'-hexa-*O*-acetil-sacarosa o 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetil-sacarosa.

En otra realización preferida, la reacción enzimática es de acilación, el carbohidrato del paso (a) es metil α-D-glucopiranósido y la reacción se lleva a cabo en presencia de acetato de isopropenilo y DMF a una temperatura de entre 50-70ºC.

Otro aspecto de la presente invención describe un compuesto de fórmula general (I)



(I)

donde: R_1 es un grupo alquilo (C_1-C_{20}), un grupo alquenilo (C_2-C_{20}), un grupo alquinilo (C_2-C_{20}), o un grupo arilalquilo; y
R_2 es un grupo acilo (-COR_3, donde R_3 es un grupo alquilo C_1-C_{20}) o un hidrógeno.

Por "alquilo" se refiere en la presente invención a una cadena alifática, lineal o ramificada, que tiene de 1 a 20 átomos de carbonos, preferiblemente de 1 a 10 átomos de carbono y más preferiblemente de 1 a 5 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, *i*-propilo, *n*-butilo, *t*-butilo, *n*-pentilo, entre otros.

Por "alquenilo" se refiere en la presente invención a cadena carbonada, lineal o ramificada, que presenta al menos un doble enlace y que contiene entre 2 y 20 átomos de carbono, preferiblemente entre 2 y 10 átomos de carbono y más preferiblemente de 2 a 5 átomos de carbono.

Por "alquinilo" se refiere en la presente invención a cadena carbonada, lineal o ramificada, que presenta al menos un triple enlace y que contiene entre 2 y 20 átomos de carbono, preferiblemente entre 2 y 10 átomos de carbono y más preferiblemente de 2 a 5 átomos de carbono.

Por "arilalquilo" se entiende en la presente invención a un grupo arilo unido al resto de la molécula por un grupo alquilo (C_1-C_{20}), tal y como se ha definido anteriormente. Un ejemplo, no limitante, de arilalquilo es un grupo bencilo.

En una realización preferida, el compuesto de fórmula general (I) de la presente invención se caracteriza por que el R_2 es un grupo acetilo (-$COCH_3$).

En una realización preferida, el compuesto de fórmula general (I) de la presente invención se caracteriza por que el R_2 es un hidrógeno.

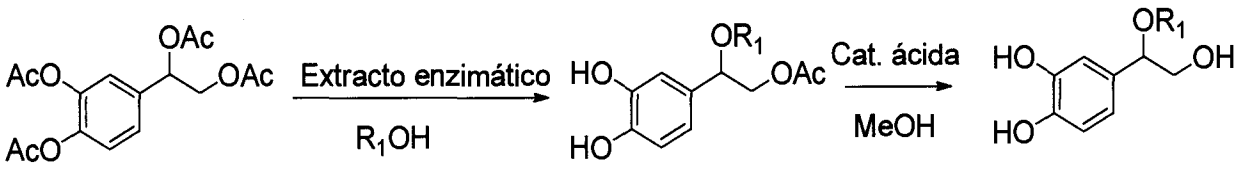
En otra realización más preferida, los compuestos de fórmula general (I) se seleccionan de la lista que comprende: acetato de 2-(3,4-dihidroxifenil)-2-metoxietilo, acetato de 2-(3,4-dihidroxifenil)-2-etoxietilo, acetato de 2-(3,4-dihidroxifenil)-2-propoxietilo, y acetato de 2-(3,4-dihidroxifenil)-2-butoxietilo.

En otra realización preferida, los compuestos de fórmula general (I) se seleccionan de la lista que comprende: 2-(3,4-dihidroxifenil)-2-metoxietanol, 2-(3,4-dihidroxifenil)-2-etoxietanol, 2-(3,4-dihidroxifenil)-2-propoxietanol y 2-(3,4-dihidroxifenil)-2-butoxietanol.

La presente invención también describe el procedimiento de obtención de los compuestos de fórmula (I) descritos anteriormente, que comprende:

a. la reacción enzimática del compuesto 3,4-dihidroxifenilglicol peracilado con R_1OH; o
b. la reacción enzimática del compuesto 3,4-dihidroxifenilglicol peracilado con R_1OH y posteriormente la reacción del compuesto obtenido en el paso (a) mediante catálisis básica, preferiblemente con Cs_2CO_3, en metanol;

donde R_1 es un grupo alquilo (C_1-C_{20}), un grupo alquenilo (C_2-C_{20}), un grupo alquinilo (C_2-C_{20}), o un grupo arilalquilo.



En una realización preferida, el procedimiento descrito anteriormente se caracteriza por que la reacción enzimática se lleva a cabo en presencia del extracto enzimático descrito en la presente invención.

La presente invención se refiere también al uso de al menos un compuesto de fórmula general (I), según se ha descrito previamente, para la elaboración de un medicamento o de una composición cosmética o de una composición alimenticia, dónde la composición alimenticia se selecciona de entre un alimento, complemento alimenticio, alimento funcional o nutracéutico.

A efectos de la presente invención el término "medicamento" hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales.

A efectos de la presente invención el término "composición farmacéutica" tal y como se define en la presente invención se refiere a conjunto de componentes que están formados por al menos un producto de fórmula general (I) según se describe en la presente invención, en cualquier concentración, que tiene al menos una aplicación en la mejora del bienestar físico o fisiológico o psicológico de un sujeto, que implique una mejora del estado general de su salud. Dichas composiciones comprenden además al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica puede comprender un "vehículo" o portador, que es preferiblemente una sustancia inerte. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica.

Los compuestos y composiciones de la presente invención pueden ser empleados junto con otros medicamentos en terapias combinadas. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición o de otra composición diferente, para su administración al mismo tiempo o en tiempos diferentes.

A efectos de la presente invención el término "composición cosmética" o "cosmético" se refiere a aquellas preparaciones constituidas por sustancias naturales o sintéticas o sus mezclas, de uso externo en las diversas partes del cuerpo humano.

A efectos de la presente invención el término "composición alimenticia" se refiere a aquel alimento que, con independencia de aportar nutrientes al sujeto que lo toma, afecta beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar. Como consecuencia, dicha composición puede ser destinada a la prevención y/o tratamiento de una enfermedad o del factor causante de una enfermedad. Por tanto, el término "composición alimentaria" de la presente invención se puede emplear como sinónimo de alimento funcional o alimento para fines nutricionales específicos o alimento medicinal. A efectos de la presente invención, el término "composición alimenticia" es, o forma parte de un alimento, alimento funcional, nutracéutico o suplemento alimenticio.

A efectos de la presente invención el término "nutracéutico" tal como se emplea en la presente invención se refiere a sustancias aisladas de un alimento y utilizadas de forma dosificada que tienen un efecto beneficioso sobre la salud.

A efectos de la presente invención el término "suplemento", sinónimo de cualquiera de los términos "suplemento dietético", "suplemento nutricional" o "suplemento alimenticio" es un "ingrediente alimenticio" destinado a complementar la alimentación.

La presente invención también se refiere al uso no terapéutico de al menos un compuesto de fórmula general (I), según se ha descrito previamente, como antioxidante, preferentemente como antioxidante alimentario.

Por el término "antioxidante" se entiende una composición capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I), según se ha descrito previamente, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro objeto descrito en la presente invención se refiere a una composición alimenticia o cosmética que comprende al menos un compuesto de fórmula general (I), según se ha descrito previamente.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere a los derivados acilados de carbohidratos, preferentemente a los compuestos de fórmula 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa o 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere al uso de dichos derivados acilados de carbohidratos descritos previamente como intermedios de reacción para la síntesis de derivados de trehalosa o para la elaboración de análogos de glicolípidos presentes en *Mycobacterium tuberculosis*.

Otro aspecto descrito en la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de los análogos de glicolípidos presentes en *Mycobacterium tuberculosis que comprende:*

a. la reacción enzimática de per-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa con metanol o metanol deuterado a una temperatura de entre 16-28ºC.

En una realización preferida, dicho procedimiento se lleva a cabo en presencia de un extracto enzimático según se define en la presente invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS.

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1: Análisis filogenético de las cepas *Terribacillus* sp. AE2B 122 (CECT 8231), *Bacillus* sp. HR21-6 (CECT 8464), *Enterobacter* sp. AE1B89 (CECT 8462) y *Pseudomonas* sp. AE2B120 (CECT 8463).

El estudio filogenético se llevó a cabo mediante análisis de la secuencia del gen ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 16S. Para ello se amplificó el gen del ARNr 16S de cada una de las cepas de la invención mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los cebadores 16F27, cuya secuencia es 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO: 1), y 16R1488, con la secuencia 5'-CGGTTACCTTGTTAGGACTTCACC-3' (SEQ ID NO: 2) (Moreno M.L., et al. *FEMS Microbiol Ecol*, 2009; **68**, 59-71.). Las condiciones de la reacción de PCR fue la siguiente: un ciclo de 95 ºC durante 5 minutos, 25 ciclos de 94 ºC durante 1 minutos, 50 ºC durante 1 minutos y 72 ºC durante 2 minutos, y luego un paso de extensión de 10 minutos a 72 ºC. Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. El ADN amplificado es secuenciado mediante el método Sanger. Se utilizan entre 640 y 650 pb para la búsqueda de secuencias similares entre las secuencias depositadas en GenBank, usando el algoritmo

BlastN, resultando ser *Terribacillus goriensis* CL-GR16 (Número de acceso a GeneBank NR_043895), *Bacillus stratosphericus* JCM 13349 (número de acceso a GeneBank NR_042336), *Enterobacter ludwigii* EN-119 (número de acceso a GeneBank AJ853891) y *Pseudomonas stutzeri* ATCC 17588 (número de acceso a GeneBank NR_103934) los que mayor valor de identidad muestran con las secuencias de las cepas de la invención. Por lo tanto, las cepas de la invención se asignaron a los géneros *Terribacillus* como *Terribacillus* sp. AE2B 122 (CECT 8231), *Bacillus*, como *Bacillus* sp. HR21-6 (CECT 8464), *Enterobacter*, como *Enterobacter* sp. AE1B89 (CECT 8462) y *Pseudomonas* como *Pseudomonas* sp. AE2B120 (CECT 8463).

Para la realización del árbol filogenético se utilizó el paquete de programas MEGA4. Primero se realizó un alineamiento múltiple, usando Clustal W, de las secuencias de 650 pb (correspondiente al fragmento entre las posiciones 53 hasta la 703 (Figura 1A) y entre las posiciones 80 hasta 730 (Figura 1B) del ARNr 16S de *Escherichia coli*) de las cepas y de las secuencias de mayor identidad obtenidas con BlastN. Finalmente los árboles se construyeron utilizando varios métodos, obteniendo resultados similares con todos ellos. En la presente invención se muestran los árboles construidos mediante el método *Neighbor-Joining* (**Figura 1**).

Ejemplo 2: Preparación de los sobrenadantes de las cepas *Terribacillus* sp. AE2B 122 (CECT 8231), *Bacillus* sp. HR21-6 (CECT8464), *Enterobacter* sp. AE1B89 (CECT 8462) y *Pseudomonas* sp. AE2B120 (CECT 8463).

Para la preparación de los extractos enzimáticos o sobrenadantes, se creció un pre-inóculo de cada una de las cuatro cepas descritas en la presente invención. *Terribacillus* sp. AE2B 122 (CECT 8231) se cultivó en medio PYA durante una noche. Al día siguiente, se utilizó dicho cultivo para inocular medio PYA. Tras crecer el cultivo en medio PYA, se recogió el sobrenadante.

Bacillus sp. HR21-6 (CECT8464) se cultivó en medio LB durante una noche. Al día siguiente, se utilizó dicho cultivo para inocular medio PYA. Tras crecer el cultivo en medio PYA, se recogió el sobrenadante.

Enterobacter sp. AE1B89 (CECT 8462) y *Pseudomonas* sp. AE2B120 (CECT 8463) se cultivaron en medio LB durante una noche. Al día siguiente, se utilizó dicho cultivo para inocular medio LB + tributirina (TRI) 2%. Tras crecer el cultivo en medio LB+TRI 2%, se recogió el sobrenadante.

Cada uno de los sobrenadantes se vertió en una bolsa de diálisis de 12 KDa (SIGMA, D-9527). Las bolsas de diálisis se dejaron toda la noche a 4 ºC cubiertas en polietilenglicol de 8 KDa y cuando las bolsas de diálisis estaban completamente secas, se limpió el exterior con agua destilada y se dializaron con tampón fosfato potásico 0,05M pH 7,8 a 4 ºC y agitación magnética. Estos dializados se congelaron a -80 ºC.

Dichos sobrenadantes pueden ser liofilizados para así evitar que se produzcan las reacciones de hidrólisis. Además, liofilizar el sobrenadante ayuda a concentrar y conservar la enzima de la cepa microbiana, y también para poder ser almacenado.

Ejemplo 3: Preparación de polifenoles lipófilos. Reacciones de acilación/desacilación catatalizadas por los sobrenadantes/extractos enzimáticos de las cepas de *Terribacillus* sp. AE2B 122 (CECT 8231), *Bacillus* sp. HR21-6 (CECT 8464), *Enterobacter* sp. AE1B89 (CECT 8462) y *Pseudomonas* sp. AE2B120 (CECT 8463).

A continuación se muestran a modo de ejemplo ilustrativo y no limitativo, rutas sintéticas que conducen a la obtención de derivados fenólicos por desacilación regioselectiva catalizada por los extractos enzimáticos/sobrenadantes en medio alcohólico.

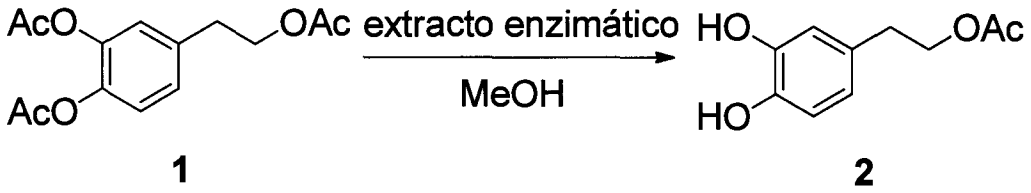
Ejemplo 3.1. Reacción de desacilación de compuestos fenólicos mediante catálisis enzimática para la obtención de polifenoles lipofílicos.

Ejemplo 3.1.1.

Acetato de hidroxitirosilo (2)

La desacilación del compuesto **1** (hidroxitirosol peracetilado) mediante alcoholisis (desacilación) catalizada por los extractos enzimáticos, obtenidos de los cultivos de las cepas de la invención, usando como disolvente un alcohol alifático, tal como el MeOH, da

lugar al derivado monoacilado (compuesto **2**) mediante una reacción totalmente regioselectiva, según se describe en el **Esquema 1**.



1 **2**

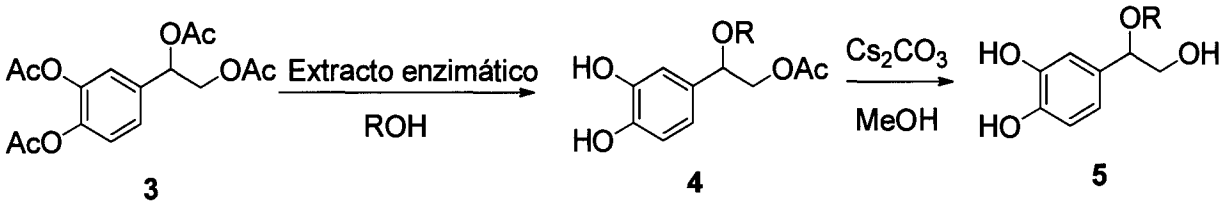
Esquema 1

A una disolución del compuesto **1** (hidroxitirosol triacetilado) (50 mg, 0.18 mmol) en MeOH se le añade el extracto enzimático obtenido del cultivo de la cepa bacteriana *Terribacillus* sp. cepa AE2B122 (CEC T8231) (50 mg) y gel de sílice (63–200 µm, 100 mg). Se agita a 40 ºC durante 18 horas. Se filtra sobre celita y se concentra a sequedad. El residuo se purifica por cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:2 → 1:1) obteniéndose el acetato de hidroxitirosilo **2** (31 mg, 90%). (Ver Esquema 1). El rendimiento para la obtención del compuesto **2** purificado por técnicas cromatográficas fue del 75-91% dependiendo del extracto enzimático utilizado.

Ejemplo 3.1.2.

La desacilación del compuesto **3** (3,4-dihidroxifenilglicol peracetilado) mediante alcoholisis catalizada por los extractos enzimáticos descritos en la presente invención y usando como disolvente un alcohol alifático de tipo R^1OH, tiene lugar de manera totalmente regioselectiva en los ésteres fenólicos (**Esquema 2**). En la posición bencílica el grupo aciloxi es sustituido por el grupo alcoxi R_1O procedente del alcohol dando lugar a la formación del compuesto **4** que puede ser aislado con rendimientos del 40-90%. El radical R^1 del alcohol alifático de tipo R^1OH se selecciona preferiblemente de entre cualquiera de los siguientes: $-CH_3$ (metilo), $-C_2H_5$ (etilo), $-C_3H_7$ (propilo) o $-C_4H_9$ (butilo). En función del alcohol alifático utilizado como disolvente se obtienen los compuestos **4a, 4b, 4c** o **4d** (**Esquema 2**). Los tiempos de reacción van desde 24 h para la obtención del compuesto **4a** hasta 6 días para la obtención del compuesto **4d**. El grupo acetilo del compuesto **4** puede ser eliminado mediante una alcoholisis (desacilación) con catálisis básica, utilizando como catalizador cualquier catalizador básico, preferentemente Cs_2CO_3 en metanol.

De esta manera, los compuestos **4a-4d** mediante una reacción de desacetilación dan lugar a los compuestos **5a-5d** con rendimientos del 31-62% (**Esquema 2**).



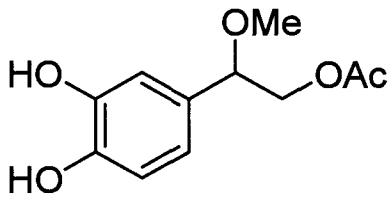
3 **4** **5**

4a R = Me
4b R = Et
4c R = Pr
4d R = Bu

5a R = Me
5b R = Et
5c R = Pr
5d R = Bu

Esquema 2

Acetato de 2-(3,4-dihidroxifenil)-2-metoxietilo (4a)

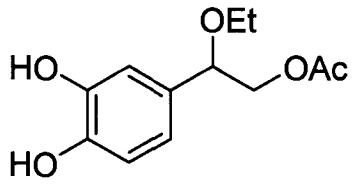


Se disuelve el compuesto **3** (tetraacetilado) (28 mg, 0.08 mmol) en MeOH (3 mL) y se añaden 28 mg de extracto enzimático obtenido del cultivo de la cepa bacteriana *Terribacillus* sp. cepa AE2B122 (CEC T8231) y 56 mg de gel de sílice (63-200 µm). Se agita a temperatura ambiente durante dos días. Se añaden otros 28 mg de extracto enzimático obtenido del cultivo de la cepa bacteriana *Terribacillus* sp. cepa AE2B122 (CEC T8231) y se prosigue con la agitación a temperatura ambiente durante dos días. Se concentra a sequedad y se purifica el producto por cromatografía en columna (CH_2Cl_2-MeOH 60:1). Rendimiento: 17 mg, 90%, R_F 0.6 (CH_2Cl_2-MeOH 10:1).

^{1}H-RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 6.80 (d 1H, $J_{5,6}$ = 8.0 Hz, Ar-5), 6.79 (d, 1H, $J_{2,6}$ = 2.0 Hz, Ar-2), 6.68 (dd, 1H, $J_{6,5}$ = 8.0 Hz, $J_{6,2}$ = 2.0 Hz, Ar-6), 4.32 (dd, 1H, J = 8.0 Hz, J = 3.9 Hz, CH), 4.18 (dd, 1H, J = 11,4 Hz, J = 8.0 Hz, CH_2), 4.07 (dd, 1H, J = 11,4 Hz, J = 3.9 Hz, CH_2), 3.25 (s 3H, OMe), 2.06 (s 3H, OAc). ^{13}C-RMN (75.5 MHz, CD_3OD): δ 173.6 (CO),

145.7 (Ar-3 y 4), 131.4 (Ar-1), 120.7 (Ar-6), 117.2 (Ar-5), 115.8 (Ar-2), 83.4 (CH), 69.5 (CH_2), 57.7 (OMe), 21.6 (OAc).

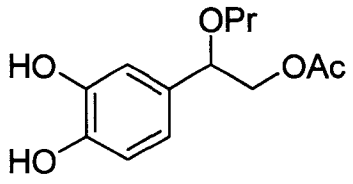
Acetato de 2-(3,4-dihidroxifenil)-2-etoxietilo (4b)



Se disuelve el compuesto **3** (60 mg, 0.18 mmol) en EtOH (6 mL) y se añaden 60 mg de extracto enzimático obtenido del cultivo de la cepa bacteriana *Bacillus sp. HR21-6* (CECT 8464) y 120 mg de gel de sílice (63–200 µm). Se calienta a 60 °C durante 24 horas y pasado ese tiempo se concentra a sequedad y se purifica el producto por cromatografía en columna de gel de sílice (CH_2Cl_2-EtOH 60:1). Rendimiento: 24 mg, 55%, R_F 0.5 (CH_2Cl_2-MeOH 10:1).

^{1}H-RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.89 (d, 1H, $J_{2,6}$= 2.0 Hz, Ar-2), 6.83 (d, 1H, $J_{5,6}$= 8.1 Hz, Ar-5), 6.72 (dd, 1H, $J_{6,5}$= 8.1 Hz, $J_{6,2}$= 2.0 Hz, Ar-6), 4.42 (dd, 1H, J= 6.9 Hz, J= 5.0 Hz, CH), 4.20-4.12 (m, 2H, CH_2), 3.43 (2dd, 1H cada uno, ^2J = 16.4 Hz, ^3J = 7.0 Hz, CH_2CH_3), 2.06 (s, 3H, OAc), 1.17 (t, 3H, J= 7.0 Hz, CH_2CH_3). ^{13}C-RMN (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ 172.0 (CO), 144.5 (Ar-4), 144.4 (Ar-3), 131.0 (Ar-1), 119.9 (Ar-6), 115.5 (Ar-5), 113.9 (Ar-2), 79.6 (CH), 68.4 (CH_2), 64.8 (CH_2CH_3), 21.3 (OAc), 15.4 (CH_2CH_3).

Acetato de 2-(3,4-dihidroxifenil)-2-propoxietilo (4c)

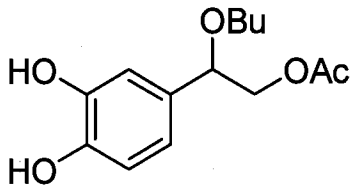


Se disuelve el compuesto **3** (190 mg, 0.56 mmol) en PrOH (4 mL) y se añaden 190 mg de extracto enzimático obtenido del cultivo de la cepa bacteriana *Bacillus sp. HR21-6* (CECT 8464) y 380 mg de gel de sílice (63–200 µm). Se agita a 60 °C durante dos días. Se añaden otros 190 mg del mismo extracto y se prosigue con la agitación durante dos días.

Se concentra a sequedad y se purifica el producto por cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:3 → 1:1). Rendimiento: 81.4 mg, 57%, R_F 0.6 (AcOEt-hexano 1:1).

^{1}H-RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.90 (d, 1H, $J_{2,6}$= 2.0 Hz, Ar-2), 6.84 (d, 1H, $J_{5,6}$= 8.1 Hz, Ar-5), 6.73 (dd, 1H, $J_{6,5}$ = 8.1 Hz, $J_{6,2}$= 2.0 Hz, Ar-6), 4.41 (dd, 1H, J= 7.6 Hz, J= 4.5 Hz, CH), 4.21-4.10 (m, 2H, CH_2), 3.40-3.24 (m, 2H, OCH_2CH_2), 2.06 (s 3H, OAc), 1.59 (sextete, 2H, J = 7.4 Hz, OCH_2CH_2), 0.88 (t, 3H, J = 7.4 Hz, CH_3). ^{13}C-RMN (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ 171.9 (CO), 144.4 (Ar-4), 144.3 (Ar-3), 131.2 (Ar-1), 120.0 (Ar-6), 115.5 (Ar-5), 113.9 (Ar-2), 79.7 (CH), 71.1 (CH_2), 68.4 (OCH_2CH_2), 23.1 (CH_2CH_2), 21.3 (OAc), 10.8 (CH_3).

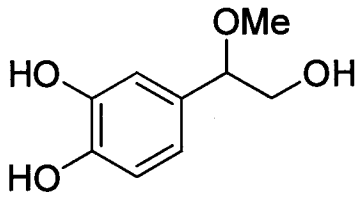
Acetato de 2-(3,4-dihidroxifenil)-2-butoxietilo (4d)



Se disuelve el compuesto **3** (190 mg, 0.56 mmol) en BuOH (4 mL) y se añaden 190 mg de extracto enzimático obtenido del cultivo de la cepa bacteriana *Bacillus sp. HR21-6* (CECT 8464) y 380 mg de gel de sílice (63–200 µm), calentándose a 60 ºC durante 2 días. Se concentra a sequedad y se purifica por cromatografía en columna con AcOEt-Hex 1:2. Rendimiento: 91 mg, 61%, R_F 0.6 (CH_2Cl_2-MeOH 10:1).

^{1}H-RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.90 (d, 1H, $J_{2,6}$= 1.9 Hz, Ar-2), 6.84 (d, 1H, $J_{5,6}$= 8.0 Hz, Ar-5), 6.73 (dd, 1H, $J_{6,5}$= 8.0 Hz, $J_{6,2}$= 1.9 Hz, Ar-6), 6.50 (s, 1H, OH), 5.95 (s, 1H, OH), 4.44 (dd, 1H, J= 7.7 Hz, J= 4.4 Hz, CH), 4.22-4.10 (m, 2H, CH_2), 3.45-3.28 (m, 2H, OCH_2CH_2), 2.07 (s, 3H, OAc), 1.55 (m, 2H, J = 6.6 Hz, OCH_2CH_2), 1.39-1.25 (m, 2H, CH_2CH_3), 0.86 (t, 3H, J= 7.3 Hz, CH_2CH_3). ^{13}C-RMN (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ 172.1 (CO), 144.4 (Ar-4), 144.3 (Ar-3), 131.1 (Ar-1), 120.0 (Ar-6), 115.5 (Ar-5), 113.9 (Ar-2), 79.7 (CH), 69.2 (OCH_2CH_2), 68.4 (CH_2), 32.0 (OCH_2CH_2), 21.3 (OAc), 19.6 (CH_2CH_3), 14.2 (CH_2CH_3).

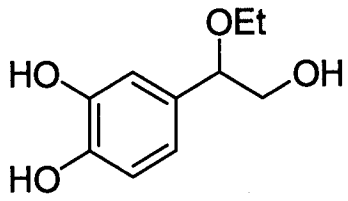
2-(3,4-Dihidroxifenil)-2- metoxietanol (5a)



A una disolución del compuesto **4a** (54 mg, 0.24 mmol) en MeOH seco (1 ml) se añade Cs_2CO_3 (231 mg, 0.72 mmol) y ascorbato sódico (48 mg, 0.24 mmol) en presencia de Ar y en oscuridad. Se agita a temperatura ambiente durante 4 horas. Cuando se da por terminada la reacción se purifica el compuesto, sin neutralizar ni evaporar el disolvente, por cromatografía en columna utilizando como eluyente CH_2Cl_2-EtOH (1:0 → 1:10). Rendimiento: 23 mg, 53%, R_F 0.2 (CH_2Cl_2-MeOH 10:1).

^{1}H-RMN (300 MHz, D_2O): δ 6.94 (d, 1H, $J_{5,6}$= 8.1 Hz, Ar-5), 6.89 (d, 1H, $J_{2,6}$= 2.0 Hz, Ar-2), 6.80 (dd, 1H, $J_{6,5}$= 8.1 Hz, $J_{6,2}$= 2.0 Hz, Ar-6), 4.29 (dd, 1H, J= 7.5 Hz, J= 4.6 Hz, CH), 3.71 (dd, 1H, J= 11.9 Hz, J = 7.5 Hz, CH_2), 3.64 (dd, 1H, J = 11.9 Hz, J = 4.6 Hz, CH_2),3.27 (s, 3H, OMe). ^{13}C-RMN (75.5 MHz, D_2O): δ 144.1 (Ar-1), 144.0 (Ar-2), 130.5 (Ar-4), 119.8 (Ar-5), 116.1 (Ar-6), 114.7 (Ar-3), 83.6 (CH), 65.0 (CH_2), 56.0 (OMe).

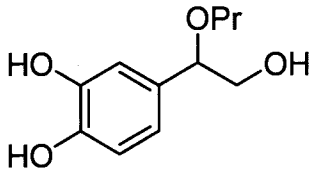
2-(3,4-Dihidroxifenil)-2-etoxietanol (5b)



A una disolución del compuesto **4b** (25 mg, 0.10 mmol) en MeOH seco (1 ml) se añade Cs_2CO_3 (66 mg, 0.20 mmol) y ascorbato sódico (20 mg, 0.10 mmol) en presencia de Ar y en oscuridad. Se agita a temperatura ambiente durante 3 horas. Cuando se da por terminada la reacción se purifica el compuesto, sin neutralizar ni evaporar el disolvente, por cromatografía en columna utilizando como eluyente CH_2Cl_2-EtOH (1:0 → 1:10). Rendimiento: 12.4 mg, 62%, R_F 0.3 (CH_2Cl_2-MeOH 10:1).

^{1}H-RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 6.91 (d, 1H, $J_{5,6}$= 8.1 Hz, Ar-5), 6.88 (d, 1H, $J_{2,6}$= 1.8 Hz, Ar-2), 6.80 (dd, 1H, $J_{6,5}$= 8.1 Hz, $J_{6,2}$= 2.0 Hz, Ar-6), 4.38 (dd, 1H, J= 7.7 Hz, J= 4.4 Hz, CH), 3.70 (dd, 1H, J= 11.7 Hz, J= 8.0 Hz, CH_2), 3.61 (dd, 1H, J= 11.7 Hz, J= 4.4 Hz, CH_2) 3.48 (c, 2H, J= 6.9 Hz, CH_2CH_3), 1.19 (t, 3H, J= 7.1 Hz, CH_2CH_3). ^{13}C-RMN (75.5 MHz, CD_3OD): δ 146.1 (Ar-4), 145.9 (Ar-3), 133.1 (Ar-1), 121.3 (Ar-6), 117.7 (Ar-5), 116.3 (Ar-2), 83.9 (CH), 67.3 (CH_2), 66.3 (CH_2CH_3), 16.1 (CH_2CH_3).

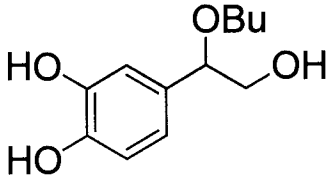
2-(3,4-Dihidroxifenil)-2-propoxietanol (5c)



A una disolución del compuesto **4c** (55 mg, 0.22 mmol) en MeOH seco (1 ml) se añade Cs_2CO_3 (66 mg, 0.20 mmol) y ascobato sódico (44 mg, 0.22 mmol) en presencia de Ar y en oscuridad. Se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Cuando se da por terminada la reacción se purifica el compuesto, sin neutralizar ni evaporar el disolvente, por cromatografía en columna utilizando como eluyente (AcOEt-hexano 1:1). Rendimiento: 14.5 mg, 31%, R_F 0.1 (AcOEt-Hex 1:1).

^{1}H-RMN (300 MHz, CD_3OD): δ 6.78 (d, 1H, $J_{2,6}$= 1.9 Hz, Ar-2), 6.76 (d, 1H, $J_{5,6}$= 8.0 Hz, Ar-5), 6.65 (dd, 1H, $J_{6,5}$= 8.0 Hz, $J_{6,2}$= 2.0 Hz, Ar-6), 4.22 (dd, 1H, J= 8.0 Hz, J= 4.1 Hz, CH), 3.64 (dd, 1H, J = 11.6 Hz, J= 8.0 Hz, CH_2), 3.51 (dd, 1H, J= 11.6 Hz, J= 4.1 Hz, CH_2), 3.37-3.29 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.61 (s, 2H, J = 7.2 Hz, OCH_2CH_2), 0.93 (t, 3H, J = 7.4 Hz, CH_3). ^{13}C-RMN (75.5 MHz, CD_3OD): δ 147.3 (Ar-4), 146.9 (Ar-3), 133.3 (Ar-1), 120.6 (Ar-6), 117.0 (Ar-5), 115.8 (Ar-2), 85.2 (CH), 72.5 (CH_2), 68.9 (OCH_2CH_2), 24.9 (OCH_2CH_2), 11.8 (CH_3).

2-(3,4-dihidroxifenil)-2-butoxietanol (5d)

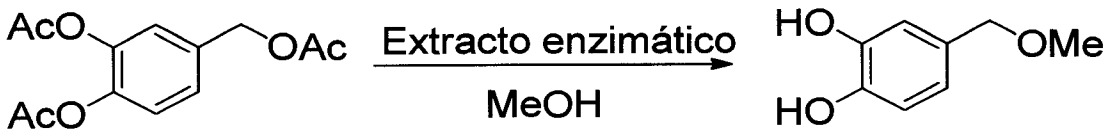


A una disolución del compuesto **4d** (78 mg, 0.29 mmol) en MeOH seco (2 ml), se añaden ascorbato sódico (58 mg, 0.29 mmol) y Cs_2CO_3 (280 mg, 0.88 mmol) y se agita a temperatura ambiente, en oscuridad y atmósfera de argón durante 3 horas. Cuando se da por terminada la reacción se purifica el compuesto, sin neutralizar ni evaporar el disolvente, por cromatografía en columna utilizando como eluyente AcOEt-Hex (1:1).

Rendimiento: 28.1 mg, 43%, R_F 0.3 (CH_2Cl_2-MeOH 10:1). ^{1}H-RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.84 (d, 1H, $J_{2,6}$= 1.8 Hz, Ar-2), 6.83 (d, 1H, $J_{5,6}$= 8.0 Hz, Ar-5), 6.72 (dd, 1H, $J_{6,5}$= 8.0 Hz, $J_{6,2}$= 1.8 Hz, Ar-6), 6.04 (sa, 3H, OH), 4.29 (dd, 1H, J= 7.8 Hz, J= 4.4 Hz, CH), 3.69-3.57 (m, 2H, CH_2), 3.47-3.28 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.60-1.51 (m, 2H, OCH_2CH_2), 1.43-1.26 (m, 2H, CH_2CH_3), 0.88 (t, 3H, J= 7.3 Hz, CH_2CH3). ^{13}C-RMN (75.5 MHz, $CDCl_3$): δ 144.3 (Ar-4), 144.2 (Ar-3), 131.8 (Ar-1), 119.9 (Ar-6), 115.7 (Ar-5), 114.1 (Ar-2), 82.5 (CH), 69.2 (OCH_2CH_2), 67.6 (CH_2), 32.2 (OCH_2CH_2), 19.7 (CH_2CH_3), 14.2 (CH_2CH_3).

Ejemplo 3.1.3.

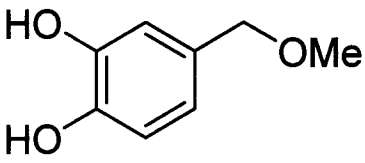
La desacilación (alcoholisis) del compuesto **6** (alcohol protocatecuico peracilado) con un grupo acetoxilo en posición bencílica catalizada por los extractos enzimáticos usando como disolvente un alcohol alifático de tipo ROH, también tiene lugar de manera totalmente regioselectiva en los ésteres fenólicos (**Esquema 3**). De manera similar al comportamiento observado en el compuesto **3**, en la posición bencílica el grupo aciloxi es sustituido por el grupo alcoxi procedente del alcohol usado como disolvente. Así, por ejemplo, usando como disolvente el MeOH se puede obtener el compuesto **7** de forma cuantitativa en 24 h. El compuesto **7** ha sido aislado previamente del caldo de fermentación del hongo marino Y26-02 (Wu, H.-H. et al. *J Asian Nat Prod Res* 11, 747-750; 2009).



6 **7**

Esquema 3

4-(Metoximetil)benceno-1,2-diol (7)

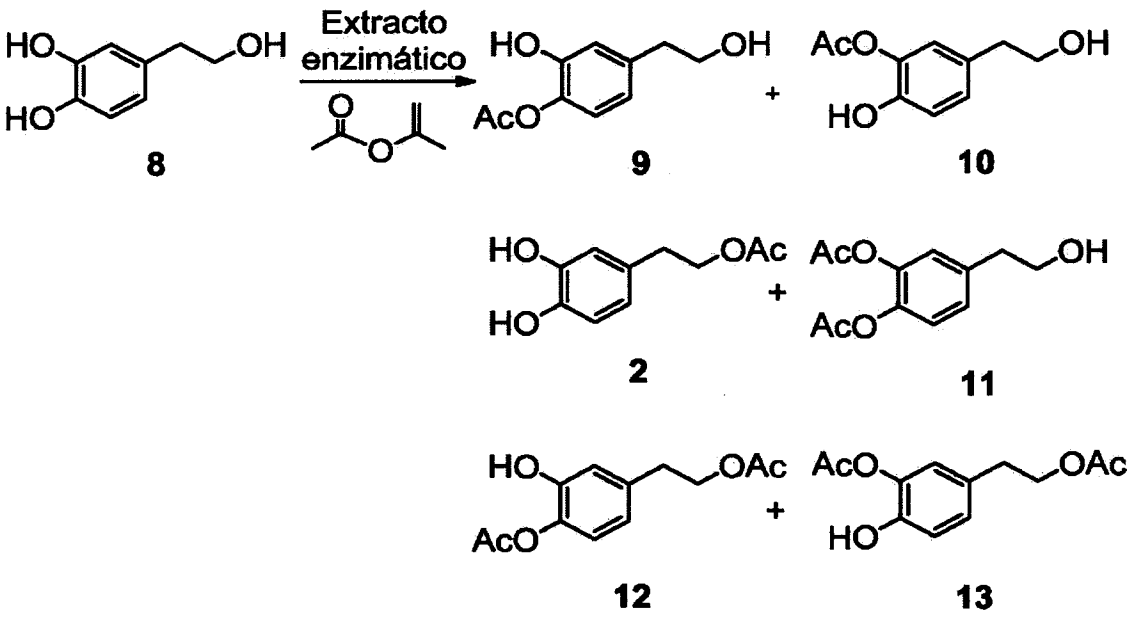


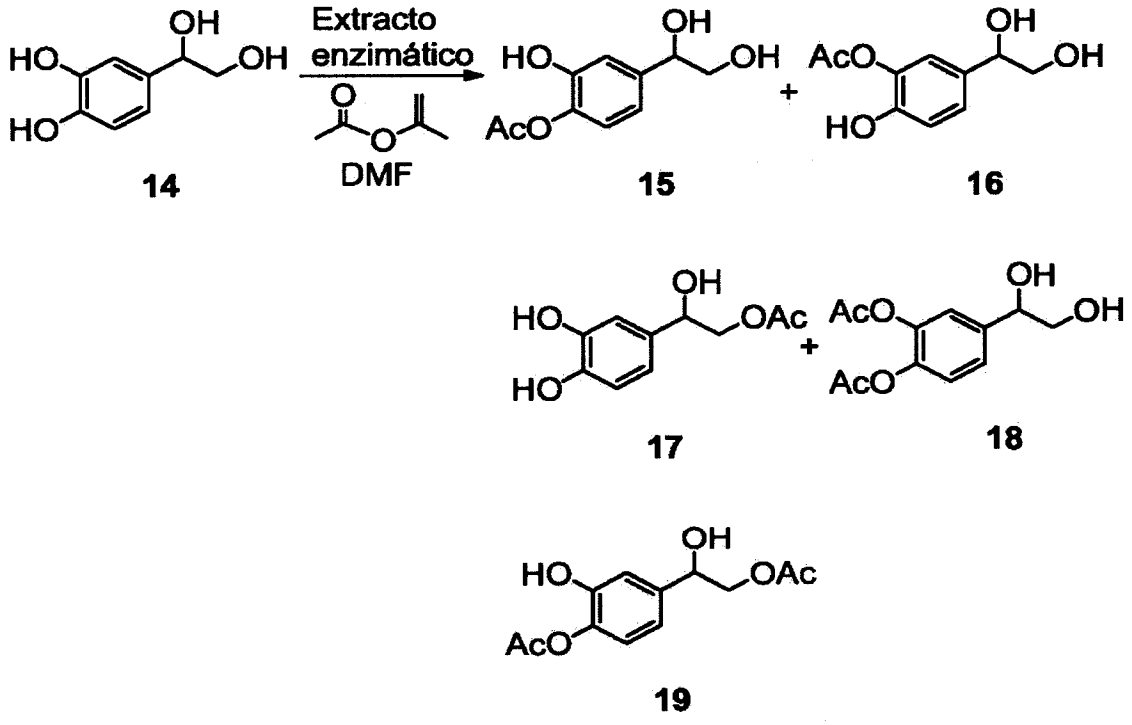
A una disolución del compuesto **6** (30 mg, 0.19 mmol) en MeOH (1 ml) se añaden 30 mg de extracto enzimático obtenido del cultivo de la cepa bacteriana *Bacillus sp. HR21-6* (CECT 8464) y 60 mg de gel de sílice (63–200 µm) y se calienta a 40 ºC durante 24 h. Se concentra a sequedad y se purifica mediante cromatografía en columna (AcOEt-hexano 1:1) obteniéndose el producto como un sirupo rojizo. Rendimiento: 29 mg, cuantitativo R_F 0.6 (AcOEt-hexano 1:1).

^{1}H-RMN (300 MHz, $CDCl_3$): δ 6.83-6.78 (m, 2H, Ar-3, Ar-5), 6.70 (d, 1H, $J_{6,5}$= 7.7 Hz, Ar-6), 4.30 (s, 2H, CH_2), 3.33 (s, 3H, OMe).

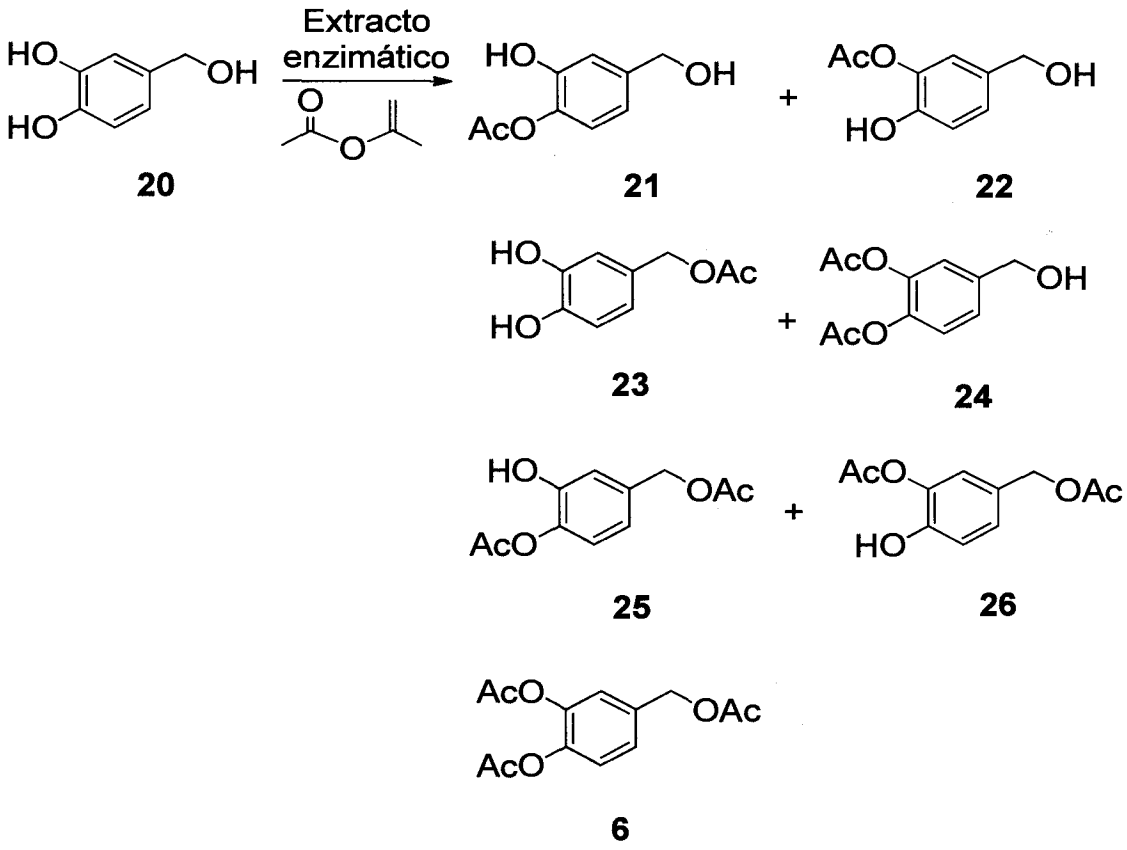
Ejemplo 3.2. Reacción de acilación de compuestos fenólicos mediante catálisis enzimática para la obtención de polifenoles lipofílicos.

Se llevaron a cabo reacciones de acilación (esterificación) regioselectiva de diversos polifenoles, preferentemente de polifenoles presentes en el aceite de oliva (**Esquema 4**).


Extracto enzimático
8
9
10
2
11
12
13


Extracto enzimático
DMF
14
15
16
17
18
19

Esquema 4



Esquema 4 (continuación)

Dichos polifenoles son el compuesto **8** (hidroxitirosol), el compuesto **14** (3,4-dihidroxifenilglicol) y el compuesto **20** (alcohol protocatecuico). Como agente acilante se empleo el acetato de isopropenilo, que a su vez actúan de disolvente del polifenol y de sus derivados acilados. La acilación se puede hacer en ausencia o presencia de un adsorbente del sobrenadante de los cultivos de las cepas de la invención, tal como celita. Se obtienen mejores resultados con el extracto enzimático soportado sobre celita. Si el compuesto fenólico empleado es poco soluble en el agente acilante se puede utilizar DMF (*N,N*-dimetil formamida) como co-disolvente. El resultado de la acilación se cuantifica mediante ^{1}H-RMN previa eliminación del sobrenadante o extracto enzimático que contiene las enzimas encargadas de llevar a cabo la reacción de acilación.

El producto mayoritario obtenido de la reacción de acilación (esterificación) del polifenol hidroxitirosol (compuesto **8**) tras 24 h (**Tabla 1**) es el compuesto **9** que es derivado monoacilado en posición 4 del anillo aromático. El compuesto **9** y su regioisómero en la

posición 3 (compuesto **10**), se forman en la proporción de 2:1. Además, de los compuestos derivados monoacilados **2**, **9** y **10**, se detectan, en menor cantidad, otros tres compuestos que son los derivados diacilados **11**, **12** y **13**. El grado de conversión oscila del 88 al 96%. Los resultados contrastan con la regioselectividad que se obtiene con la lipasa procedente de *C. antarctica*, que conduce exclusivamente al compuesto regioisómero **2**, acilado en la cadena lateral.

La reacción de acilación (esterificación) del compuesto **14**: 3,4-dihidroxifenilglicol tras 24 h (**Tabla 1**) conduce a la obtención de una mezcla de los compuestos **15** y **16** que son los derivados monoacilados en el anillo aromático, y del compuesto **17** que es el derivado monoacilado en el extremo de la cadena lateral, en proporción 1:1:1, con los extractos de *Terribacillus* sp. AE2B 122 (CECT 8231) y *Enterobacter* sp. AE1B89 (CECT 8462), y en la relación 1:1:2 con *Pseudomonas* sp. AE2B120 (CECT 8462), *Bacillus* sp. HR21-6 (CECT 8464) y la lipasa pura de *C. antarctica*. El grado de conversión va del 53 al 70%. El menor grado de conversión se consigue con la *C. antarctica*. No se detecta la acilación del hidroxilo bencílico del compuesto **14** con ninguna de las enzimas, ni extractos enzimáticos.

La reacción de acilación (esterificación) del compuesto **20**: alcohol protocatecuico tras 24 h (**Tabla 1**) conduce a la obtención de una mezcla de los derivados mono, di y triacilados. La relación de los derivados monoacilados en posición 4, 3 y cadena lateral es sensible al extracto enzimático utilizado; así, la proporciones son 1:1:1 para el sobrenadante del cultivo de *Terribacillus* sp. AE2B 122 (CECT 8231), 1:2:2 para el sobrenadante del cultivo de *Enterobacter* sp. AE1B89 (CECT 8462), 1:3.5:1 para el sobrenadante del cultivo de *Pseudomonas* sp. AE2B120 (CECT 8462), 1:3:2 para el sobrenadante del cultivo de *Bacillus* sp. HR21-6 (CECT 8464) y 1:0:16 para la lipasa de *C. antarctica.* El grado de conversión va del 77 al 81% para los 4 sobrenadantes ensayados, mientras que con la lipasa de *C. antárctica,* la conversión es cuantitativa. La formación del compuesto **6**: derivado triacetilado, solo se detecta con la lipasa de *C. antártica*.

Tabla 1. Porcentaje determinado por ^{1}H-RMN en la mezcla de reacción formada por acilación de los compuestos **8**, **14** y **20** con extractos de los sobrenadante obtenido del cultivo de las cepas bacterianas de la invención o de una lipasa comercial.

Compuestos	**Extractos bacterianos y lipasa**				
	CECT 8231	CECT 8462	CECT 8462	CECT 8464	Lipasa pura (Novozyme 435)
8	8%	12%	6%	4%	-
9	36%	34%	44%	38%	-
10	20%	16%	23%	21%	-
2	19%	21%	11%	18%	100%
11	2%	2%	3%	3%	-
12	10%	9%	5%	9%	-
13	5%	6%	8%	7%	-
14	39%	30%	32%	34%	47%
15	17%	16%	14%	12%	10%
16	16%	16%	13%	11%	10%
17	15%	18%	22%	23%	20%
18	7%	11%	10%	11%	7%
19	7%	9%	9%	9%	6%
20	19%	20%	29%	23%	-
21	22%	12%	10%	10%	5%
22	22%	24%	35%	27%	-
23	20%	24%	13%	21%	82%
24	3%	1%	2%	1%	-
25	7%	10%	6%	9%	9%
26	7%	9%	5%	9%	-
6	-	-	-	-	5%

Acilación del hidroxitirosol (compuesto 8). Se disuelve hidroxitirosol (50 mg) en acetato de isopropenilo (3.0 ml) y se añaden celita (50 mg) y el extracto enzimático correspondiente obtenido de los cultivos de las cepas de la invención (50 mg). Se agita a 40 ºC y en oscuridad 24 horas. Se filtra la disolución y se concentra a sequedad. Se analiza por ^{1}H-RMN el resultado de la acilación (Ver **Tabla 1**).

Acilación del 3,4-dihidroxifenilglicol (compuesto 14). Se disuelve 3,4-dihidroxifenilglicol (50 mg) en una mezcla de DMF/acetato de isopropenilo 1:1 (6.0 ml) y se añade el extracto enzimático correspondiente obtenido de los cultivos de las cepas de la invención (50 mg). Se agita a 40 ºC y en oscuridad 24 horas. Se elimina el disolvente y el residuo que resulta se redisuelve en acetona seca y se filtra. Por último, se concentra a sequedad. Se analiza por ^{1}H-RMN el resultado de la acilación (Ver **Tabla 1**)

Acilación del alcohol protocatecuico (compuesto 20). Se disuelve el alcohol (50 mg) en acetato de isopropenilo (3.0 ml) y se añade el extracto enzimático correspondiente obtenido de los cultivos de las cepas de la invención (50 mg). Se agita a 40 ºC y en oscuridad 24 horas. Se filtra la disolución y se concentra a sequedad. Se analiza por ^{1}H-RMN el resultado de la acilación (Ver **Tabla 1**)

Ejemplo 4. Evaluación de la capacidad antioxidante de los polifenoles lipófilos descritos en la presente invención.

A continuación se representa los resultados obtenidos en la prueba de actividad antirradicalaria frente al DPPH para los compuestos **4a-4d**, **5a-5d**, **2** y **14**. La actividad antirradicalaria expresada como EC50 frente al DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) representa la cantidad de antioxidante necesario para disminuir la concentración de DPPH al 50%. Se utilizó el método de Sánchez-Moreno (Sánchez-Moreno, C. et al. *J. Sci. Food Agric.* 1998, *76*, 270-276) con las modificaciones de Jiménez y col. *J. Agric. And Food Chem.* 2005, *53*, 5212-5217).

De los nuevos compuestos sintetizados, el más activo resultó ser el compuesto **4a** con una actividad parecida al acetato de hidroxitirosilo (Compuesto **2**), aunque menor que el 3,4-dihidroxifenilglicol (compuesto **14**) (**Tabla 2** y **Figura 2**)

Tabla 2. Actividad antirradicalaria frente a DPPH expresada en valores de EC_{50} (µM)

Compuesto	**EC_{50} (µM)**
4a	14.5 ± 0.500
4b	21.6 ± 2.84
4c	21.7 ± 0.480

Tabla 2. Actividad antirradicalaria frente a DPPH expresada en valores de EC_{50} (μM)

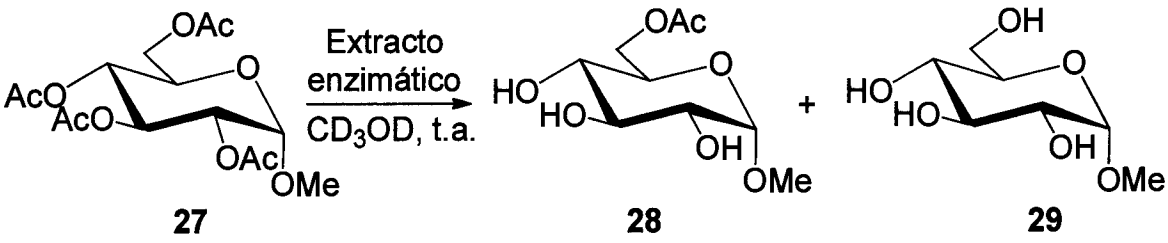
5a	17.5 ± 2.19
5b	20.3 ± 1.73
5c	20.3 ± 1.74
5d	16.7 ± 1.81
2	14.3 ± 0.800
14	12.0 ± 0.550

Ejemplo 5: Preparación de carbohidratos parcialmente acilados. Reacciones de acilación/desacilación de carbohidratos catalizadas por los extractos enzimáticos obtenidos de los cultivos de las cepas *Terribacillus* sp. AE2B 122 (CECT 8231), *Bacillus* sp. HR21-6 (CECT 8464), *Enterobacter* sp. AE1B89 (CECT 8462).

Ejemplo 5.1.

Se ha llevado a cabo la reacción de desacetilación del compuesto **27** (metil α-D-glucopiranósido per-*O*-acetilado) por alcoholisis en medio metanólico catalizada por los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de las cepas bacterianas *Terribacillus* sp. AE2B 122 (CECT 8231), *Enterobacter* sp. AE1B89 (CECT 8462) *y Bacillus* sp. HR21-6 (CECT 8464). Se han comparado los resultados obtenidos con las cepas de la invención con los resultados obtenidos con las lipasas comerciales procedentes de *Pseudomonas cepacea* 30 U/mg (Sigma-Aldrich, EC 232-619-9) y *C. antarctica* soportada sobre resina acrílica 5,000 U/g (Sigma-Aldrich, EC 3.1.1.3, Novozyme 435) (**Esquema 5**).

El medio de reacción consiste en una suspensión del compuesto **27** y del extracto enzimático o de la lipasa correspondiente, en metanol o en metanol deuterado (CD_3OD). Una vez que se da por finalizada la reacción, las proporciones entre los distintos compuestos detectados en el crudo de reacción (compuestos **27**-**29**) se obtienen a partir del correspondiente espectro de ^{1}H-RMN en CD_3OD, tras la eliminación del extracto enzimático o de las enzimas correspondientes.



27 **28** **29**

Esquema 5

El extracto enzimático procedente de *Terribacillus* sp. AE2B 122 (CECT 8231) sólo permitió un 28% de conversión (**Tabla 3**) tras 12 h de reacción. Dicha conversión resultó ser totalmente regioselectiva, ya que sólo se observó la presencia del compuesto **28** (derivado metil 6-*O*-acetil-α-D-glucopiranósido), junto con el compuesto **27** utilizado como materia prima (72%).

Destacan los extractos enzimáticos procedentes de los cultivos de *Enterobacter* sp. AE1B89 (CECT 8462) y *Bacillus* sp. HR21-6 (CECT 8464), que mostraron un 84 y un 86% de conversión, respectivamente en un tiempo de reacción sensiblemente inferior (6 h). Dichos extractos enzimáticos muestran una tendencia elevada a la desacetilación completa, para dar el compuesto **29** (metil α-D-glucopiranósido), que se encuentra en una proporción en la mezcla del 64% o del 65%, respectivamente. El compuesto **28** que es el derivado acetilado en C-6 se encuentra en una proporción del 20 y 21%, respectivamente.

Las lipasas comerciales procedentes de *P. cepacea* y *C. antarctica,* estando esta última soportada sobre resina acrílica, no condujeron a reacción alguna, a pesar de llevar a cabo la reacción a una temperatura sensiblemente superior (hasta 60 ºC) y usar una mayor proporción de enzima (hasta 1.5 veces el peso del monosacárido).

Tabla 3. Proporciones encontradas para la desacetilación del compuesto **27**

catalizada por los sobrenadantes de los cultivos de las cepas de la invención o por lipasas comerciales

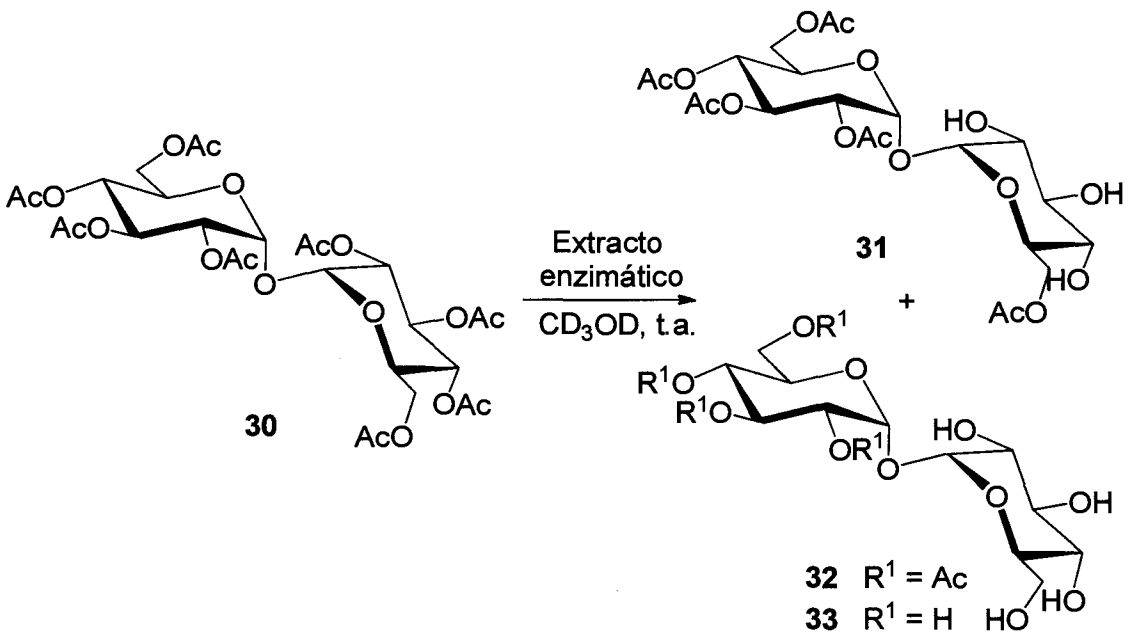
Microorganismo/Lipasa	Porcentaje calculado (RMN)			t (h)
	27	**28**	**29**	
CECT 8231	72%	28%	0%	12
CECT 8462	16%	20%	64%	6
CECT 8464	14%	21%	65%	6
Lipasa *P. cepacea* (Sigma-Aldrich, EC 232-619-9)	100%	0%	0%	22
Lipasa *C. antarctica* (Novozyme 435)	100%	0%	0%	22

Desacilación del compuesto 27 (metil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-glucopiranósido).

Una suspensión del compuesto **27** (6.0 mg, 17 µmol) y del sobrenadante del cultivo de las cepas de la invención correspondiente (3.0 mg) en CD_3OD (1.0 mL) se agita a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en cada caso. En el caso de las lipasas procedentes de *P. cepacea* y *C. antarctica* soportada sobre resina acrílica, se usó una relación monosacárido/lipasa 1:1.5, una temperatura de 60 ºC y un tiempo de reacción de 22 h. En la **Figura 3** se muestra el espectro de ^{1}H-RMN de la mezcla de reacción [^{1}H-RMN (300 MHz, CD_3OD)]; los resultados se muestran en la **Tabla 3**.

Ejemplo 5.2.

Los sobrenadantes de los cultivos de las cepas descritas en la presente invención, también permiten la desacetilación parcial del compuesto **30** (trehalosa octaacetilada), usando las mismas condiciones que en el caso del monosacárido **27** (**Esquema 6**).



Esquema 6

Los extractos enzimáticos de *Terribacillus* sp. AE2B 122 (CECT 8231), *Enterobacter* sp. AE1B89 (CECT8462) y *Bacillus* sp. HR21-6 (CECT 8464), permitieron una conversión entre el 89-91% en un tiempo de reacción comprendido entre 7-12 h (**Tabla 4**). Se observó la preferencia de las enzimas presentes en los sobrenadantes de los cultivos de las cepas mencionadas anteriormente por llevar a cabo la desacetilación sobre uno de los anillos de glucopiranosa (**Tabla 4**), permitiendo la detección de dos compuestos nuevos, el compuesto **31** (2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa) (26-35%) y el compuesto **32** (2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa) (38-40%), de los que no existen antecedentes en el estado de la técnica.

Cabe destacar, además, que el compuesto **32** es el resultado de una desimetrización en tan sólo dos etapas (acetilación y desacetilación selectiva) de la trehalosa. La desimetrización es el proceso mediante el cual se consigue que la trehalosa per-*O*-acetilada **30** pierda su simetría original y se transforme en **31** y **32**, donde una unidad de azúcar se encuentra acetilada y la otra total o parcialmente desacetilada. Este proceso se ha conseguido en dos etapas (acetilación de la trehalosa comercial y desacetilación regioselectiva con el extracto enzimático de la invención y representa un número de etapas muy inferior con respecto a cualquier ruta puramente química conocida y utilizada en el estado de la técnica para el mismo fin.

Tabla 4. Proporciones encontradas para la desacetilación del compuesto **30** (trehalosa octaacetilada) catalizada por los sobrenadantes de los cultivos de las cepas bacterianas de la invención o por lipasas comerciales

Microorganismo / lipasa	Porcentaje calculado (RMN)				t (h)
	30	**31**	**32**	**33**	
CECT 8231	11%	34%	38%	17%	12
CECT 8462	6%	26%	39%	29%	7
CECT 8464	9%	35%	40%	16%	7
Lipasa *P. cepacea* (Sigma-Aldrich, EC 232-619-9)	100%	0%	0%	0%	22
Lipasa *C. antarctica* (Novozyme 435)	100%	0%	0%	0%	22

Este mismo ensayo también se llevó a cabo con fines cuantitativos utilizando el extracto enzimático de *Bacillus* sp. HR21-6 (CECT 8464), lo cual permitió el aislamiento de los compuestos **31** y **32** (29% y 49%, respectivamente, tras purificación cromatográfica) y su caracterización.

Es destacable que los compuestos **31** y **32** pueden emplearse como materias primas en la preparación de glicolípidos derivados de trehalosa, que presentan interés como vacunas frente a la tuberculosis, provocada por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (M. Gilleron *et al. J. Exp. Med.* 2004, 199, 649-659).

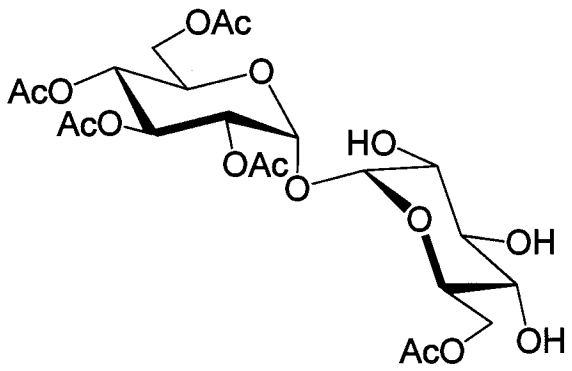
De nuevo, cuando la reacción se llevó a cabo usando las lipasas comerciales procedentes de *P. cepacea* y *C. antarctica* soportada sobre resina acrílica, no se observó reacción alguna.

Desacilación del compuesto 30 (per-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa)

Método A. Una suspensión de per-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa (compuesto **30)** (6.0 mg, 8.8 µmol) y del sobrenadante del cultivo de las cepas de la invención correspondiente (3.0 mg) en CD_3OD (1.0 mL) se agita a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en cada caso. En la **Figura 4** se muestra el espectro de ^{1}H-RMN de la mezcla de reacción [^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD)]; los resultados se muestran en la **Tabla 3**.

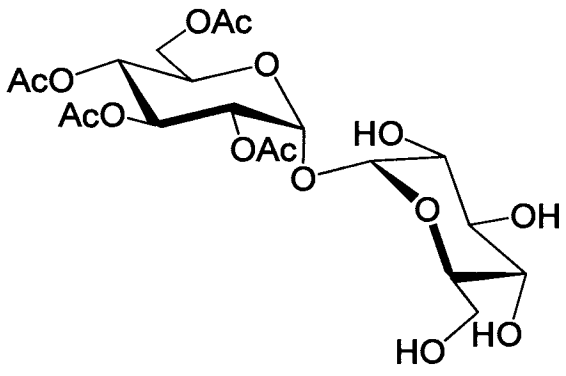
Método B. Una suspensión de per-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa **30** (60.0 mg, 88,0 µmol) y el sobrenadante del cultivo de la cepa bacteriana *Bacillus* sp. HR21-6 CECT 8464 (30.0 mg) en MeOH (20 mL) se agita a temperatura ambiente durante 3.5 h. A continuación, se purifica mediante cromatografía en columna (CH_2Cl_2 → CH_2Cl_2–MeOH 1:2) para dar lugar a **31** y **32** como sirupos.

2,3,4,6,6'-Penta-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa (compuesto 31)



Rendimiento: 14 mg (29%). ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) δ 5.57 (dd, 1H, $J_{2,3}$= 10.2 Hz, $J_{3,4}$= 9.5 Hz, H-3), 5.30 (d, 1H, $J_{1,2}$= 3.7 Hz, H-1), 5.07 (dd, 1H, $J_{4,5}$= 10.3 Hz, H-4), 5.04 (d,1H, $J_{1',2'}$= 3.7 Hz, H-1'), 4.94 (dd, 1H, H-2), 4.43 (ddd, 1H, $J_{5,6a}$= 4.1 Hz, $J_{5,6b}$= 2.4 Hz, H-5), 4.28 (dd, 1H, $J_{5',6a'}$= 2.0 Hz, $J_{6a',6b'}$= 11.7 Hz, H-6a'), 4.24 (dd, 1H, $J_{6a,6b}$= 12.4 Hz, H-6a), 4.15 (dd, 1H, $J_{5',6b'}$= 7.3 Hz, H-6b'), 4.12 (dd, 1H, H-6b), 3.82 (ddd, 1H, $J_{4',5'}$= 9.7 Hz, H-5'), 3.74 (dd, 1H, $J_{2',3'}$= 9.7 Hz, $J_{3',4'}$= 9.1 Hz, H-3'), 3.51 (dd, 1H, H-2'), 3.26 (dd, 1H, H-4'), 2.08, 2.05 (x2), 2.01, 2.00 (5s, 3H cada uno, 5OAc); ^{13}C-RMN (125.7 MHz, CD_3OD) δ 172.7, 172.4, 171.7, 171.5, 171.3 (5 CO), 96.3 (C-1'), 92.8 (C-1), 74.6 (C-3'), 72.8 (C-2'), 72.2 (C-5'), 72.0 (C-4'), 71.9 (C-2), 71.5 (C-3), 69.9 (C-4), 69.1 (C-5), 65.0 (C-6'), 62.9 (C-6).

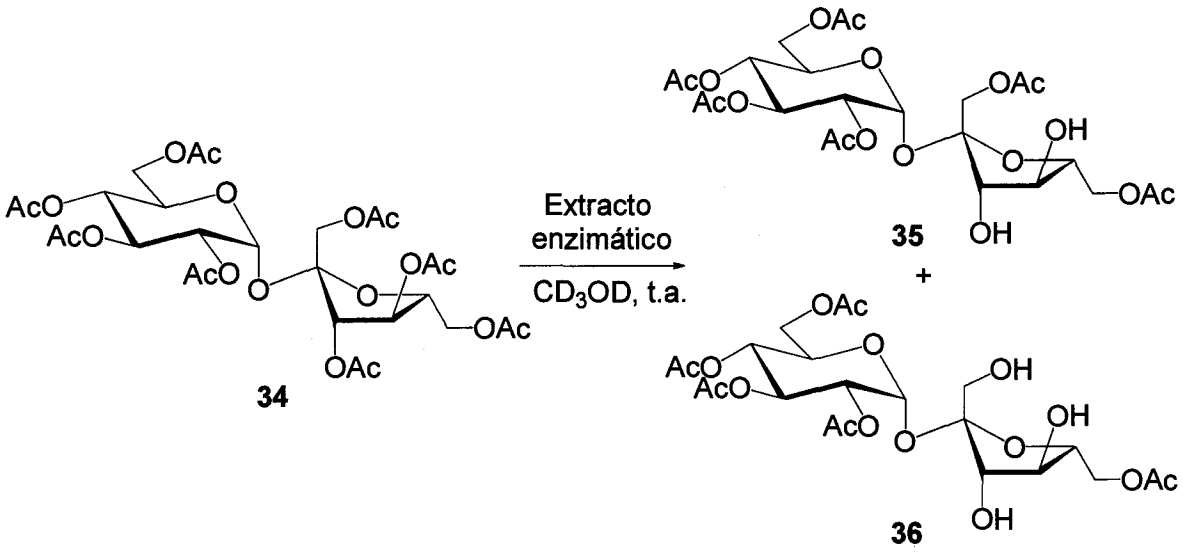
2,3,4,6-Tetra-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa (compuesto 32).



Rendimiento: 22 mg (49%). ^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD) δ 5.55 (dd, 1H, $J_{2,3}$= 10.2 Hz, $J_{3,4}$= 9.5 Hz, H-3), 5.34 (d, 1H, $J_{1,2}$= 3.7 Hz, H-1), 5.07 (dd, 1H, $J_{4,5}$= 10.3 Hz, H-4), 5.05 (d, 1H, $J_{1',2'}$= 3.3 Hz, H-1'), 4.96 (dd, 1H, H-2), 4.46 (ddd, 1H, $J_{5,6a}$= 3.8 Hz, $J_{5,6b}$= 2.4 Hz, H-5), 4.23 (dd, 1H, $J_{6a,6b}$= 12.4 Hz, H-6a), 4.12 (dd, 1H, H-6b), 3.75 (dd, 1H, $J_{5',6a'}$= 2.1 Hz, $J_{6a',6b'}$= 11.3 Hz,H-6a'), 3.75 (t, 1H, $J_{3',4'}$= 9.7 Hz, H-3'), 3.70 (ddd, 1H, $J_{4',5'}$= 9.8 Hz, $J_{5',6b'}$ = 5.7 Hz, H-5'), 3.65 (dd, 1H, H-6b'), 3.50 (dd, 1H, H-2'), 3.31 (m, 1H, H-4'), 2.06, 2.05, 2.01, 1.99 (4s, 3H cada uno, 4OAc); ^{13}C-RMN (125.7 MHz, CD_3OD) δ 172.4, 171.7, 171.6, 171.3 (4CO), 96-8 (C-1'), 93.3 (C-1), 74.7 (C-3', C-5'), 72.9 (C-2'), 71.7 (x2), 71.6 (C-2, C-3, C-4'), 69.9 (C-4), 69.0(C-5), 62.9 (C-6), 62.6 (C-6').

Ejemplo 5.3

En la presente invención también se llevó a cabo el proceso de desacetilación parcial del compuesto **34** (sacarosa octaacetilada) (**Esquema 7**), usando las mismas condiciones que en el caso del monosacárido **27**.



Esquema 7

Los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de *Terribacillus* sp. AE2B122 (CECT 8231), *Enterobacter* sp. AE1B89 (CECT 8462) y *Bacillus* sp. HR21-6 (CECT 8464) permitieron una conversión comprendida entre el 82-90% (**Tabla 5**). Se observó la preferencia de las enzimas presentes en dicho sobrenadantes por llevar a cabo la desacetilación del anillo de fructofuranosa (**Tabla 5**), permitiendo la detección de los compuestos **35** (2,3,4,6,1',6'-hexa-*O*-acetilsacarosa) y **36** (2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetilsacarosa).

Adicionalmente, se observó una mayor conversión (90%) en un tiempo de reacción inferior (4h) para el caso del sobrenadante obtenido del cultivo de la cepa de *Terribacillus* sp. AE2B122 (CECT 8231).

Tabla 5. Proporciones encontradas para la desacetilación del compuesto **34** (sacarosa octaacetilada) catalizada por los sobrenadantes de los cultivos de las cepas bacterianas de la invención o por lipasas comerciales

Microorganismo/Lipasa	Porcentaje calculado (RMN)			t (h)
	34	**35**	**36**	
CECT 8231	10%	38%	52%	4
CECT 8462	18%	43%	39%	7.5
CECT 8464	14%	44%	42%	8.5
Lipasa *P. cepacea* (Sigma-Aldrich, EC 232-619-9)	100%	0%	0%	10
Lipasa *C. antárctica* (Novozyme 435)	100%	0%	0%	10

Para el aislamiento de los compuestos mencionados previamente, también se realizó este mismo ensayo con el sobrenadante obtenido de los cultivos de *Bacillus* sp. HR21-6 (CECT 8464) y se efectuó una purificación cromatográfica, para dar lugar a los compuestos **35** (26%) y **36** (27%).

Con las lipasas comerciales procedentes de *P. cepacea* y *C. antarctica* soportada sobre resina acrílica, tampoco se observó reacción alguna para este sustrato.

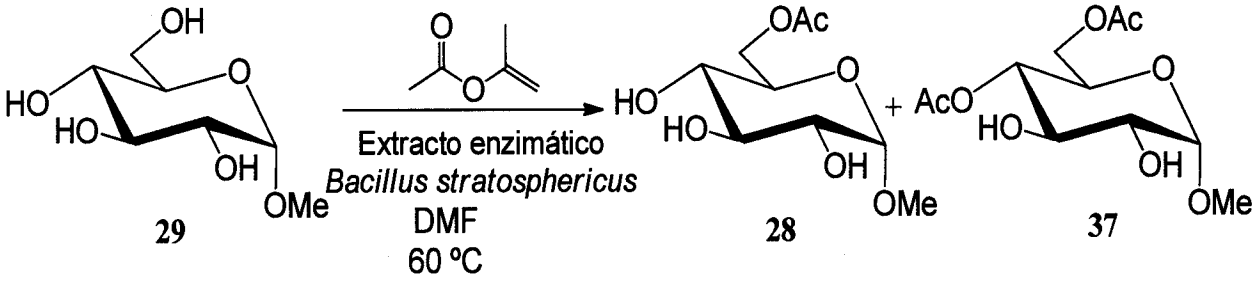
Desacilación de per-*O*-acetilsacarosa (compuesto 34)

Método A. Una suspensión de per-*O*-acetilsacarosa (compuesto **34)** (6.0 mg, 8.8 µmol) y el sobrenadante del cultivo de las cepas de la invención correspondiente (3.0 mg) en CD_3OD (1.0 mL) se agita a temperatura ambiente durante el tiempo indicado en cada caso. En la **Figura 5** se muestra el espectro de ^{1}H-RMN de la mezcla de reacción [^{1}H-RMN (500 MHz, CD_3OD)]; los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

Método B. Una suspensión de per-*O*-acetilsacarosa (compuesto **34)** (50.0 mg, 74 µmol) y el sobrenadante del cultivo de la cepa *Bacillus* sp. HR21-6 CECT 8464 (25.0 mg) en MeOH (16.0 mL) se agita a temperatura ambiente durante 4h. A continuación, se purifica mediante cromatografía en columna (CH_2Cl_2 → CH_2Cl_2–MeOH 1:2) para dar lugar al compuesto **35** (11.2 mg, 26%) y al compuesto **36** (10.9 mg, 27%) como sirupos.

Ejemplo 5.4. Acilación regioselectiva de carbohidratos

Los extractos enzimáticos de las cepas bacterianas descritas en la presente invención también permiten las reacciones de acilación regioselectiva de carbohidratos. Así, por ejemplo la acilación, preferentemente acetilación del compuesto **29** (metil α-D-glucopiranósido) usando acetato de isopropenilo como agente acilante, el extracto enzimático de *Bacillus stratosphericus* como catalizador enzimático y DMF como co-disolvente (**Esquema 8**), ha dado lugar a la obtención de los compuestos **37 y 28**, que presentan grupos acilos en las posiciones 4 y 6, respectivamente.



Esquema 8

A pesar de llevar a cabo calentamientos prolongados (60 °C durante 105 h), la conversión es del 49%, aunque con una alta regioselectividad, ya que se observa la presencia del producto monoacetilado en C-6 (compuesto **28**) (13%), y el compuesto **37** (metil 4,6-di-*O*-acetil-α-D-glucopiranósido) como derivado acetilado mayoritario (36%), no detectado en los correspondientes ensayos de desacetilación.

Acilación del metil 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α-D-glucopiranósido (compuesto 29)

Una disolución del compuesto **29** (6.0 mg, 0.017 mmol), el sobrenadante del cultivo de la cepa *Bacillus* sp. HR21-6 CECT 8464 (3.0 mg) y acetato de isopropenilo (0.5 mL) en DMF (0.3 mL) se calienta con agitación a 60 °C durante 105 h. A continuación se concentra a sequedad y el residuo se analiza mediante ^{1}H-RMN, mostrando una mezcla de los compuestos **28**, **29** y **37** en una proporción de 13%, 51% y 36%, respectivamente.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula 2,3,4,6,6'-penta-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa o 2,3,4,6-tetra-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa.

2. Uso de al menos un compuesto según la reivindicación anterior como intermedios de reacción para la síntesis de derivados de trehalosa.

3. Uso de al menos un compuesto según la reivindicación anterior en la preparación de glicolípidos derivados de trehalosa presentes en *Mycobacterium tuberculosis*.

4. Procedimiento de obtención de los compuestos descritos en la reivindicación 1 que comprende:

   a. la reacción enzimática de per-*O*-acetil-α,α-D-trehalosa con metanol o metanol deuterado a una temperatura de entre 16-28ºC.

5. Procedimiento según la reivindicación anterior donde la reacción enzimática se lleva a cabo en presencia de un extracto enzimático obtenible a partir de un cultivo de cualquiera de las cepas bacterianas seleccionadas de entre: *Bacillus* CECT 8464, *Enterobacter* CECT 8462, *Pseudomonas* CECT 8463 y *Terribacillus* CECT 8231.

6. Procedimiento según la reivindicación 5 caracterizado por que el extracto enzimático está concentrado y/o dializado.

7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6 caracterizado por que el extracto enzimático está liofilizado.

8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado por que el cultivo además comprende un sustrato lipídico.

9. Procedimiento según la reivindicación 8 donde el sustrato lipídico se selecciona de entre surfactantes, triglicéridos o aceites esenciales.

Figura 1A

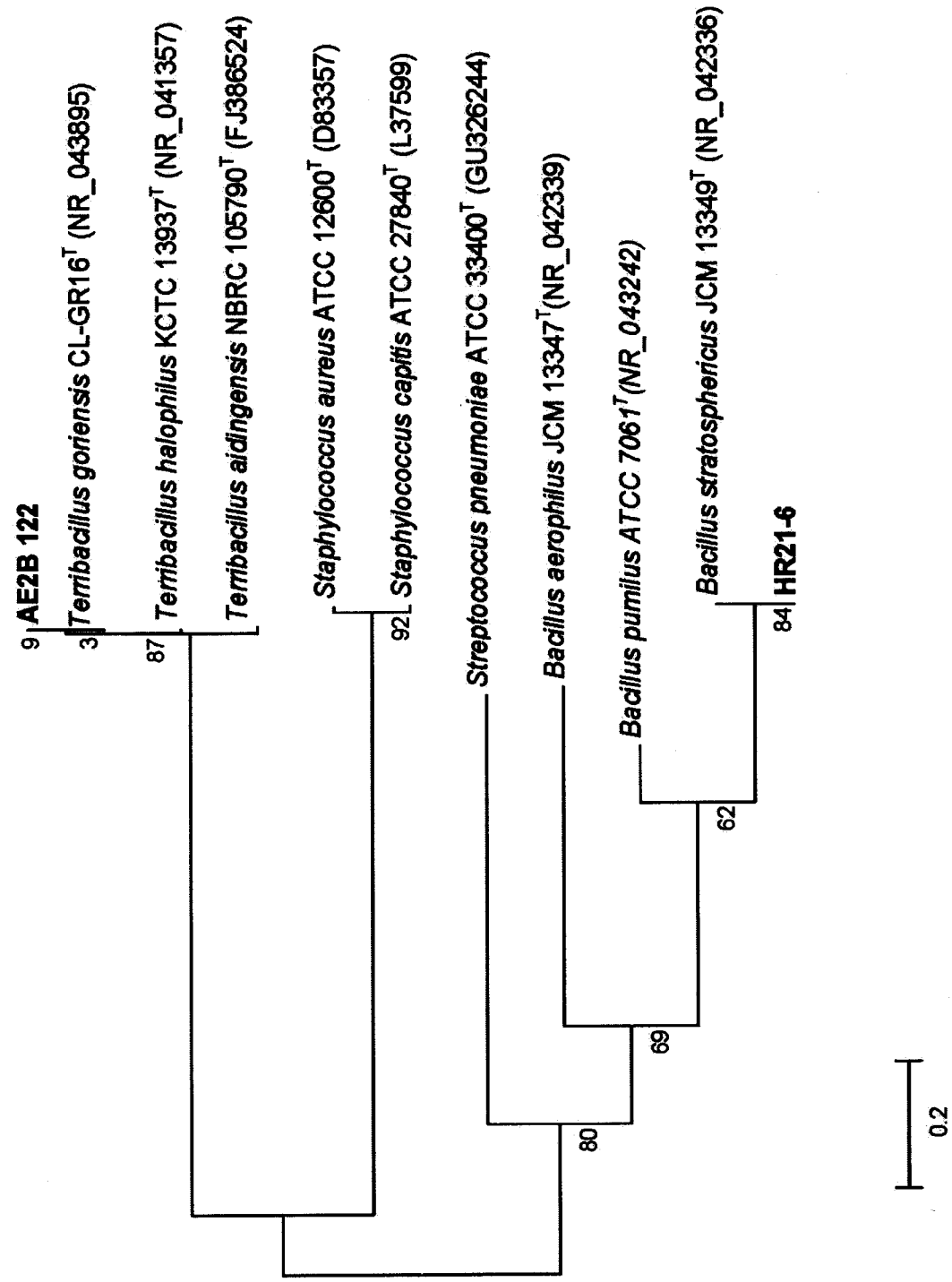

9 AE2B 122
3 Ternibacillus goriensis CL-GR16T (NR_043895)
87 Ternibacillus halophilus KCTC 13937T (NR_041357)
Ternibacillus aidingensis NBRC 105790T (FJ386524)
Staphylococcus aureus ATCC 12600T (D83357)
92 Staphylococcus capitis ATCC 27840T (L37599)
Streptococcus pneumoniae ATCC 33400T (GU326244)
Bacillus aerophilus JCM 13347T(NR_042339)
80
Bacillus pumilus ATCC 7061T(NR_043242)
69
Bacillus stratosphericus JCM 13349T (NR_042336)
84 HR21-6
62
0.2

Figura 1B

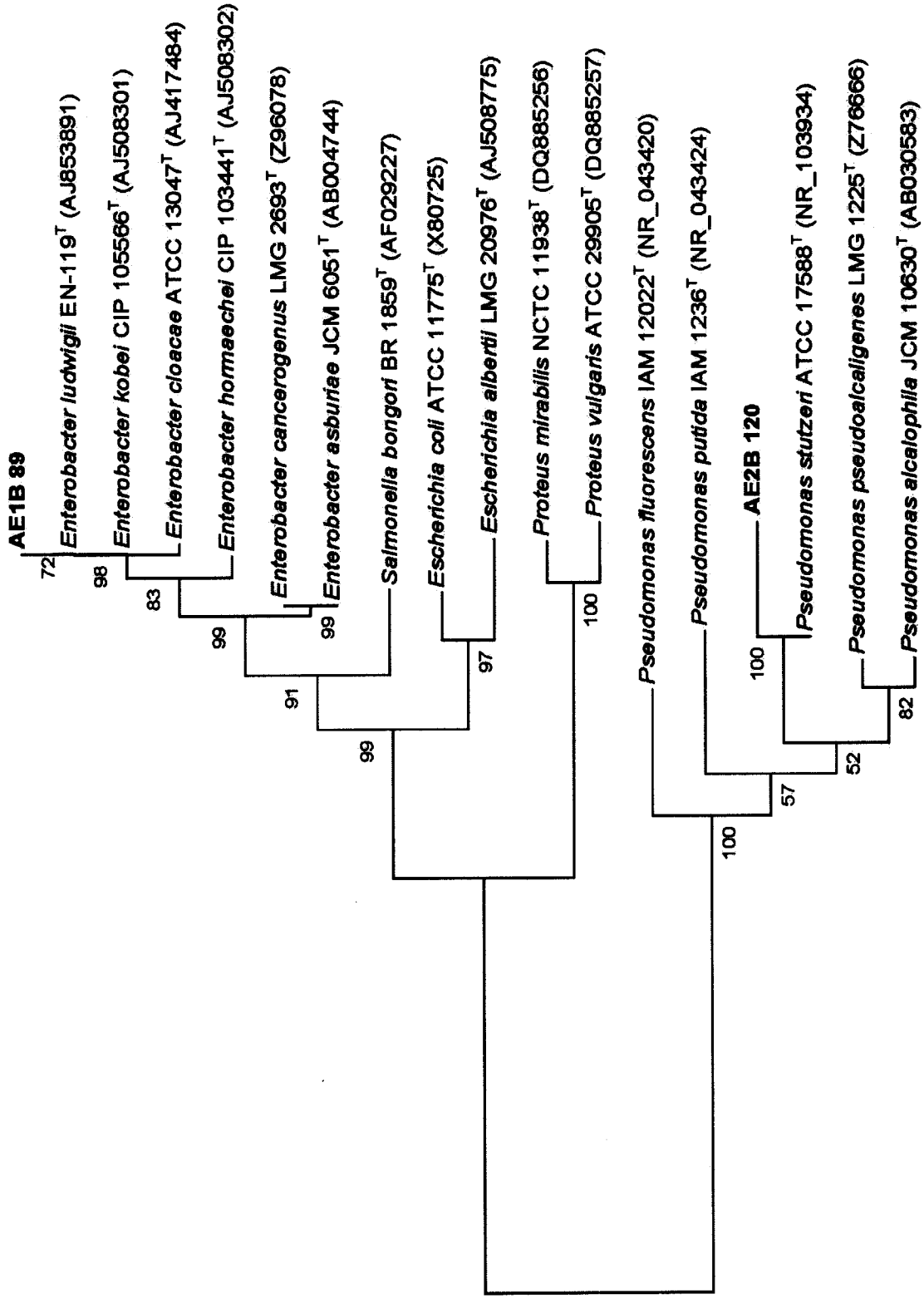

AE1B 89
Enterobacter ludwigii EN-119T (AJ853891)
Enterobacter kobei CIP 105566T (AJ508301)
Enterobacter cloacae ATCC 13047T (AJ417484)
Enterobacter hormaechei CIP 103441T (AJ508302)
Enterobacter cancerogenus LMG 2693T (Z96078)
Enterobacter asburiae JCM 6051T (AB004744)
Salmonella bongori BR 1859T (AF029227)
Escherichia coli ATCC 11775T (X80725)
Escherichia albertii LMG 20976T (AJ508775)
Proteus mirabilis NCTC 11938T (DQ885256)
Proteus vulgaris ATCC 29905T (DQ885257)
Pseudomonas fluorescens IAM 12022T (NR_043420)
Pseudomonas putida IAM 1236T (NR_043424)
AE2B 120
Pseudomonas stutzeri ATCC 17588T (NR_103934)
Pseudomonas pseudoalcaligenes LMG 1225T (Z76666)
Pseudomonas alcalophila JCM 10630T (AB030583)
72
98
83
99
99
91
99
97
100
100
57
100
52
82

Figura 2

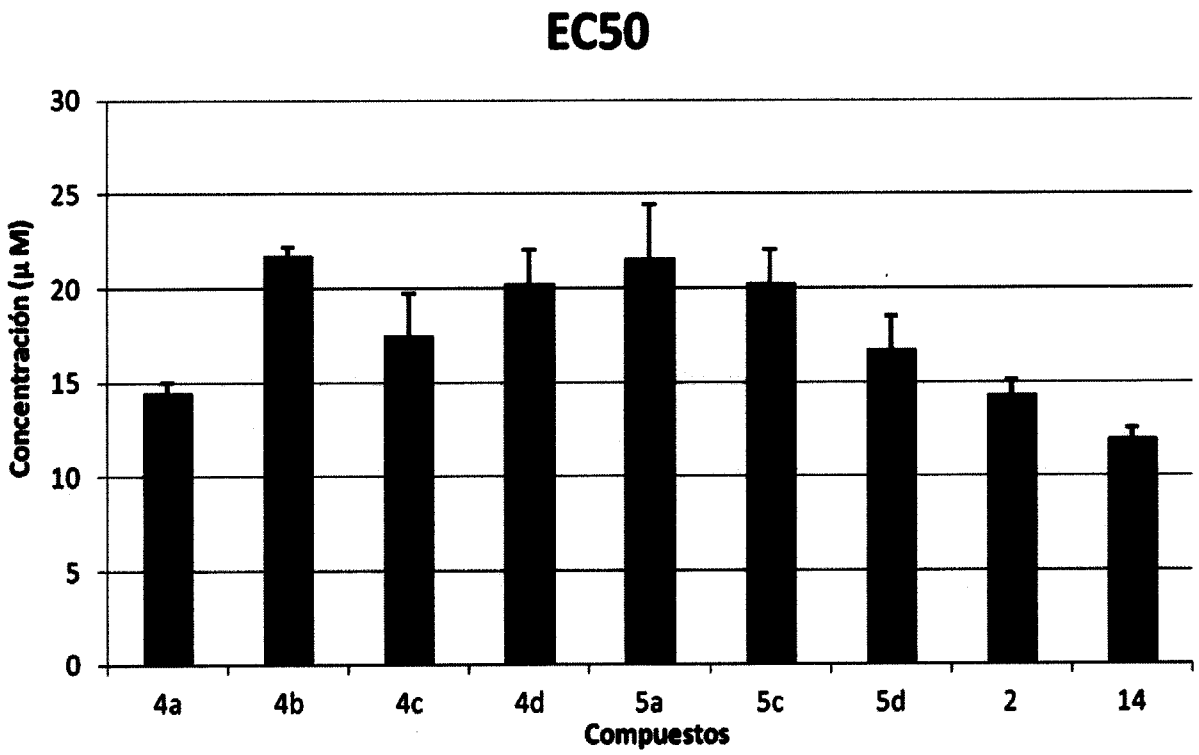

EC50
Concentración (µ M)
30
25
20
15
10
5
0
4a
4b
4c
4d
5a
5c
5d
2
14
Compuestos

Figura 3

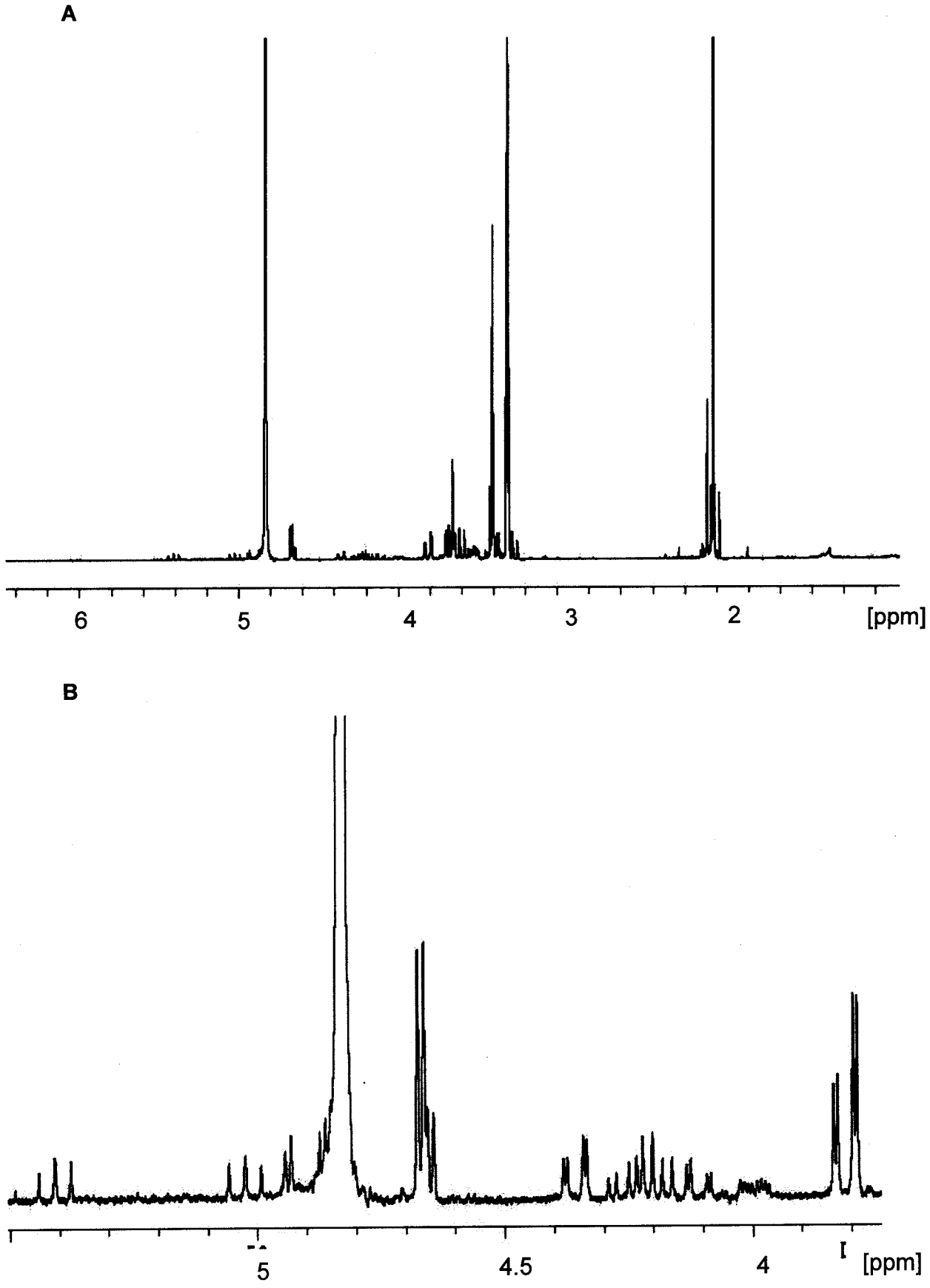


Figura 4

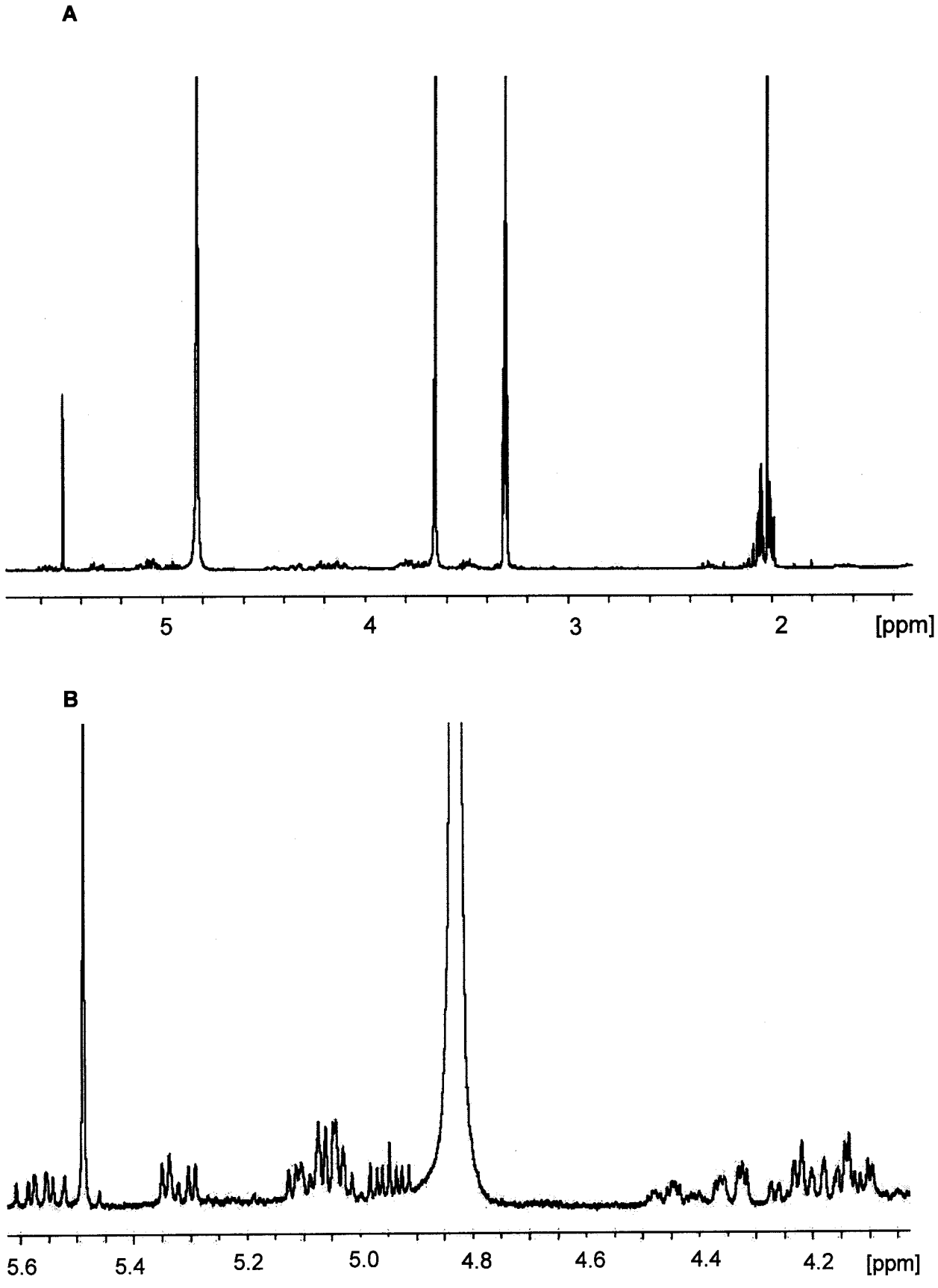
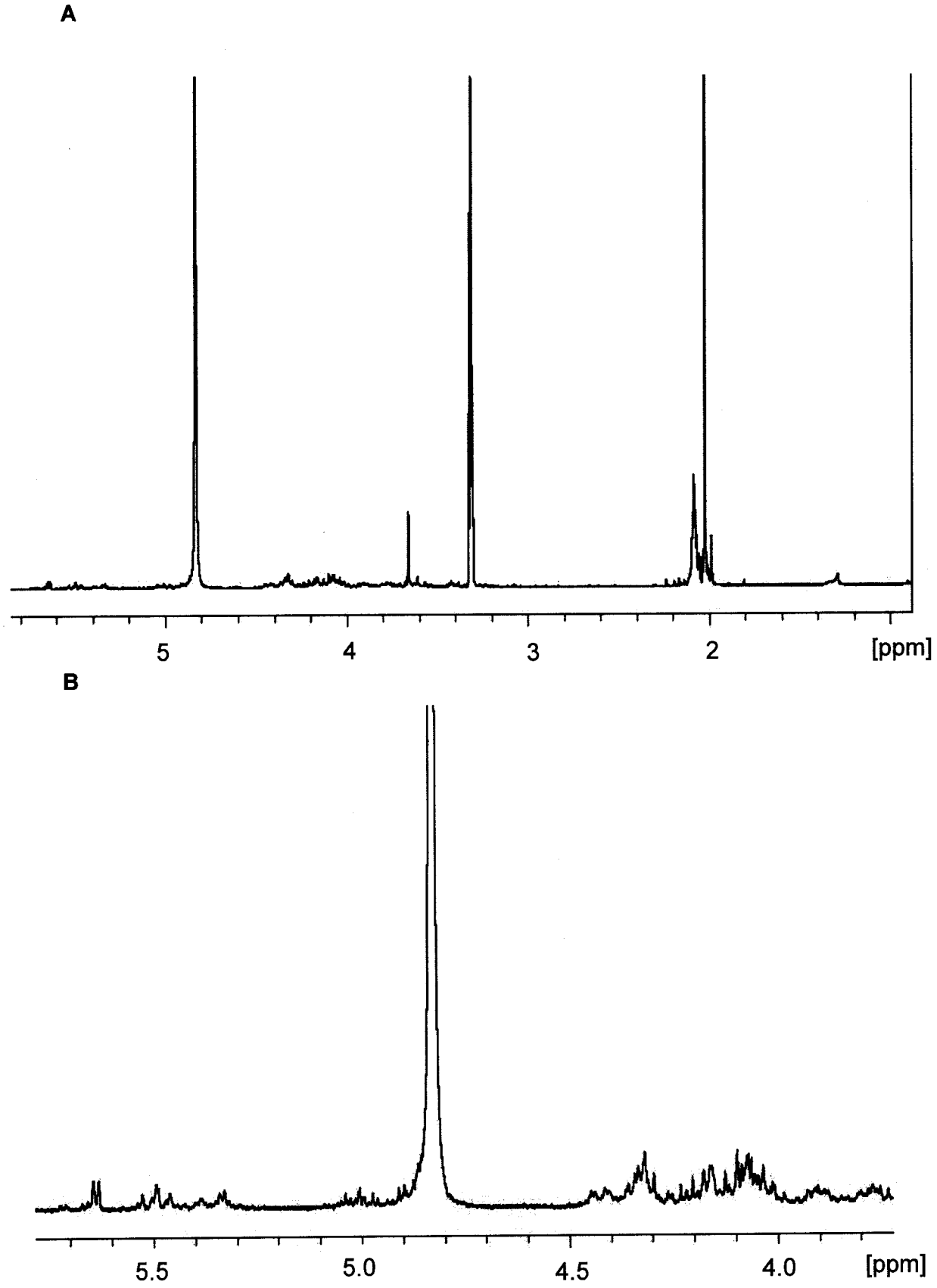


Figura 5



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Sevilla

<120> DERIVADOS ACILADOS DE CARBOHIDRATOS, MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y USOS DE LOS MISMOS

<130> ES1650.34

<160> 2

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="unassigned DNA"
/note="cebador 16F27"
/organism="Artificial Sequence"

<400> 1
agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 2
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..24
<223> /mol_type="unassigned DNA"
/note="Cebador 16R1488"
/organism="Artificial Sequence"

<400> 2
cggttacctt gttaggactt cacc 24