

00551



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**“SÍNTESIS E HIDRÓLISIS DE AMIDAS  
POR MEDIO DE LIPASAS”**

**TESIS** que para obtener el grado de **Maestro en Ciencias**  
presenta:

**Alejandro Torres Gavilán**

Tutor: Dr. Edmundo Castillo Rosales.

Cuernavaca, Morelos, 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Con mucho cariño a  
mis padres, a mi hermana  
y a Mariana.

Este proyecto se llevó a cabo en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Edmundo Castillo Rosales, en el laboratorio del Dr. Agustín López-Munguía Canales.

Durante la realización de los estudios de Maestría, se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de registro 171119.

Agradezco:

Al Dr. Agustín López-Munguía C. por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo y sobre todo por la cantidad de conocimiento que me ha compartido.

Al Dr. Edmundo Castillo R. por sus extraordinarios y útiles consejos durante la realización de este proyecto y por ser un formidable guía.

Tanto al jurado revisor de esta tesis por sus atinados comentarios y sugerencias, así como al comité tutorial por las grandes ideas que aportaron durante la realización del proyecto:

Dr. Edmundo Castillo Rosales

Dr. Jaime Escalante García

Dr. Ignacio López González

Dr. Agustín López-Munguía C.

Dr. Arturo Navarro O.

Dr. Rafael Vázquez Duhalt

Dra. Elba C. Villegas Villarreal

Al T.L. Fernando González por el apoyo técnico brindado.

Papas, les doy gracias por estar conmigo en las buenas y sobre todo en las malas; por todo el cariño incondicional que me han dado; por ser el más digno ejemplo de amor; por enseñarme que para los problemas siempre hay una solución; por todo...., en pocas palabras, son mis ídolos y estoy orgulloso de ser su hijo.

Choca, tu sabes todo lo que significas para mí y el lugarzote que tienes en mi corazón. Gracias por ser muestra de perseverancia y de cómo alcanzar grandes metas.

Mariana, estos dos años a tu lado han sido geniales, juntos hemos aprendido y compartido muchísimas aventuras; gracias por tu cariño y por estar siempre a mi lado. Elephant shoe.

Al Peter Celestino y a la Chata les doy las gracias por los buenos momentos que han compartido conmigo. Los tengo siempre presentes.

A mis suegros, Gina y Pedro, y a mi cuñada Lili, que no solo me han abierto las puertas de su hogar. Gracias por su apoyo.

A todas las arpiás: Alina, Mari, Sandra chica alias "la peque", Chelo, Vero, Arlette "la amiguita"; sin olvidar a las que ya volaron, Gina, Vane y Lolita que por cierto mil y un gracias por abrir este proyecto y por toda la experiencia transmitida. En especial a Chelo, la peque y Vero por ser unas vecinas como pocas....uff, - amiguita estas a tiempo, no te juntes con ellas!

A las no tan arpías: Ángela, Erika, y Sandra grande. A Male y Clarita que gracias a la ardua labor de convencimiento, espero hacer pronto biología molecular. Mil gracias a Judith y Doña U.

A los mártires del laboratorio: Rubén, Edmundo, Agustín y Fer que más que un apoyo laboral son buenos cuadernos.

Al grupazo de biocatálisis.

A los H.M. del miércoles del compita y agregados. A mis carnales de *toooda la vida*, Juancho, Chino, Oscar, Neto y Ricky.

A todos los del grupo de los miércoles que han estado desde el principio, desde la primer borrasca! Aleph, Javier, Álvaro, Ulises, Christian, Tere, Esme y la super Chío ¡SALUD! También al atlético Chamilpa, ahora zorros de Chamilpa.

A los que me han echado a perder, El Imperio Mupett (Ángeles y Luis) y sus basofias; El killerpollo (Victor) y su carnita asaa; La yoc (Yadira) y sus "braunis"; El guanibal (Fernando) y su maldito Aclas; Los pichilinguillos (Andrés y Ana) por sus trencitos y todas esas comidas compartidas; La Wawa y la Dra. Diego (Viviana y Elia) por ganarle a la quinceañera; Nora, en donde andas?; por último a la famosísima Caguama (Edith) por la lana que me robé en su fiesta - "que chido es que chido".

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
RESUMEN.....	VI
INTRODUCCIÓN.....	VIII
1. ANTECEDENTES.....	1
1.1. Amidas.....	1
1.1.1. Importancia, química y función.....	1
1.1.2. Síntesis enzimática de amidas.....	5
1.1.3. Hidrólisis química de amidas.....	6
1.1.4. Hidrólisis enzimática de amidas.....	7
1.1.5. Capsaicinoides.....	8
1.2. Lipasas.....	11
1.2.1. Características generales.....	12
1.2.2. Características estructurales.....	16
1.2.3. Mecanismo cinético.....	18
1.3. Sustratos utilizados en la síntesis de amidas por medio de lipasas.....	22
1.3.1. Donadores de acilo.....	22
1.3.2. Agentes nucleofílicos.....	24
1.3.3. Solventes.....	25
1.4. Síntesis de capsaicinoides por medio de lipasas.....	29
1.5. El uso de lipasas en la hidrólisis de amidas.....	30
1.6. Panorama global de los antecedentes.....	32
2. JUSTIFICACIÓN.....	34
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	36
3.1. Hipótesis.....	36
3.2. Objetivo general.....	36
3.3. Objetivos particulares.....	36
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	37

4.1. Estrategia experimental.....	37
4.2. Materiales.....	38
4.3. Cuantificación de las aminas.....	38
4.3.1. Tratamientos previos. ....	38
4.3.2. Análisis cualitativo (TLC). ....	39
4.3.3. Análisis cuantitativo (HPLC). ....	39
4.4. Metodología para la síntesis de amidas.....	40
4.4.1. Liberación del clorhidrato de vainillinamina (Van-HCl). ....	41
4.5. Método de purificación. ....	41
4.6. Metodología para la hidrólisis de amidas.....	42
4.6.1. Escrutinio de enzimas hidrolíticas.....	42
4.6.2. Análisis de las propiedades estructurales del sustrato. ....	42
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
5.1. Síntesis de amidas por medio de lipasas.....	43
5.1.1. Síntesis de vainillinamidas.....	43
5.1.2. Síntesis de bencilamidas y 3-metoxibencilamidas.....	46
5.1.3. Síntesis de la $\alpha$ -metilbencilamida. ....	49
5.2. Análisis comparativo de la síntesis de amidas.....	50
5.3. Hidrólisis de amidas por medio de lipasas.....	53
5.3.1. Escrutinio de lipasas.....	53
5.3.2. Efecto de la cadena alifática.....	54
5.3.3. Efecto del grupo saliente (amina). ....	59
5.4. Tecnología “Easy-on, Easy-off”.....	63
5.4.1. Hidrólisis de la $\alpha$ -metilbencilamida. ....	65
6. CONCLUSIONES.....	67
6.1. Conclusiones en la síntesis de amidas por medio de lipasas. ....	67
6.2. Conclusiones de la hidrólisis de amidas por medio de lipasas.....	68
6.3. Conclusiones en conjunto de síntesis e hidrólisis de amidas por medio de lipasas.....	69
7. BIBLIOGRAFÍA.....	70

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Estructura y pungencia en U. Scoville de los capsaicinoides.....	9
<b>Tabla 2.</b>	Lipasas comerciales y su origen microbiano.....	12
<b>Tabla 3.</b>	Amidación con y sin “linker oxigenado” .....	23
<b>Tabla 4.</b>	Valor R <sub>f</sub> de vainillinamina y capsaicina.....	39
<b>Tabla 5.</b>	Condiciones y tiempos de retención para el análisis en HPLC .....	40
<b>Tabla 6.</b>	Conversión de las vainillinamidas.....	46
<b>Tabla 7.</b>	Conversiones de las bencilamidas .....	47
<b>Tabla 8.</b>	Conversión de las 3-metoxibencilamidas .....	48
<b>Tabla 9.</b>	Enzimas capaces de hidrolizar a la capsaicina .....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Representación de un pentapéptido .....	1
<b>Figura 2.</b>	Amida en la que se muestra el enlace plano .....	2
<b>Figura 3.</b>	Obtención de aminas o amidas quirales .....	3
<b>Figura 4.</b>	Dipolo de una amida y un éster. ....	4
<b>Figura 5.</b>	Hidrólisis ácida y básica de amidas. ....	7
<b>Figura 6.</b>	Zonas de interacción entre la capsaicina y su receptor. ....	10
<b>Figura 7.</b>	Representación de un triglicérido.....	14
<b>Figura 8.</b>	Representación del sitio activo de las lipasas.....	17
<b>Figura 9.</b>	Lipasa de <i>Mucor miehei</i> vista desde arriba.....	18
<b>Figura 10.</b>	Mecanismo Ping Pong Bi Bi.....	19
<b>Figura 11.</b>	Mecanismo de reacción de las lipasas .....	20
<b>Figura 12.</b>	Reacciones catalizadas por lipasas .....	21
<b>Figura 13.</b>	Donadores de acilo activados utilizados en la biocatálisis.....	22
<b>Figura 14.</b>	(aminometil)trimetilsilano y su análogo de carbono .....	24
<b>Figura 15.</b>	Síntesis enzimática de éster .....	26
<b>Figura 16.</b>	Estructuras de amidas hidrolizadas .....	31
<b>Figura 17.</b>	Metoxiacetamida ópticamente activa. ....	32
<b>Figura 18.</b>	Relación DIPEA / Van-HCl y tiempo de preincubación óptimos. ....	41
<b>Figura 19.</b>	Modificaciones hechas a la capsaicina. ....	43
<b>Figura 20.</b>	Liberación de la sal de vainillinamina.....	44
<b>Figura 21.</b>	Cinéticas de síntesis de nuevos capsaicinoides .....	45
<b>Figura 22.</b>	Modificaciones de las aminas utilizadas. ....	47
<b>Figura 23.</b>	Amina quiral, $\alpha$ -metilbencilamina.....	49
<b>Figura 24.</b>	Conversiones al equilibrio en la síntesis de .....	51
<b>Figura 25.</b>	Velocidades iniciales de la síntesis de las aminas.....	52
<b>Figura 26.</b>	Hidrólisis de las vainillinamidas.....	54
<b>Figura 27.</b>	Perfil de velocidades iniciales a 45 y 70 °C .....	56
<b>Figura 28.</b>	Representación del fenómeno de activación interfacial.....	57
<b>Figura 29.</b>	No hay activación interfacial .....	59

<b>Figura 30.</b> Velocidad inicial de hidrólisis de bencilamidas y 3-metoxibencilamidas.....	60
<b>Figura 31.</b> Velocidad inicial de hidrólisis de todas las amidas.....	61
<b>Figura 32.</b> Velocidad inicial de hidrólisis función del pK <sub>b</sub> del grupo saliente.....	62
<b>Figura 33.</b> Tecnología “easy on, easy off” .....	64
<b>Figura 34.</b> Conversión al equilibrio de la hidrólisis de la $\alpha$ -metilbencilamida ....	66

## RESUMEN

Se ha reportado que las lipasas poseen poca o nula actividad amidasa. Sin embargo, y pese a esta idea generalizada, recientemente nuestro grupo de investigación reportó por primera vez la hidrólisis de la capsaicina *in vitro* mediante el uso de una lipasa (lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada Novozym 435). Basados en dicho resultado, en este proyecto se decidió estudiar en detalle las condiciones del medio de reacción que favorecen la hidrólisis de este tipo de amidas tomando en consideración las características moleculares de amidas análogas a la capsaicina.

En primer término, tomando a la capsaicina como molécula modelo, se efectuó la síntesis enzimática y purificación de una variedad de capsaicinoides artificiales en los que se modificó el tamaño de la cadena hidrofóbica y los sustituyentes del anillo. La síntesis se llevó a cabo en 2-metil-2-butanol (2M2B) a una temperatura de 45 °C, encontrándose que en todos los casos las conversiones al equilibrio fueron mayores que 95% después de 72 h de reacción. Cabe señalar que las excelentes conversiones al equilibrio obtenidas fueron independientes de la naturaleza del donador de acilo, del tamaño del mismo y del agente nucleofílico. En términos de la velocidad inicial, las diferencias encontradas fueron influenciadas primordialmente por la naturaleza del agente nucleofílico en términos de la naturaleza de los sustituyentes del anillo.

Posteriormente se llevó a cabo un escrutinio de lipasas capaces de hidrolizar a la capsaicina. De dicho ensayo la lipasa que mostró mejor desempeño fue la lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada (Novozym 435).

Una vez seleccionada la lipasa con la que se logró la mayor eficiencia en la reacción de hidrólisis de la capsaicina y purificadas las amidas obtenidas en la síntesis enzimática, se llevaron a cabo las reacciones de hidrólisis de las mismas. En los primeros ensayos, se sometieron amidas con un mismo anillo pero con distintos residuos acilo y se logró distinguir la preferencia de la lipasa por la hidrólisis de la amida con residuo acilo de 10 carbonos (10C's), particularidad que se mantuvo con aquellas amidas en las que se modificó la naturaleza del grupo

amino. Se analizó también la susceptibilidad para la hidrólisis de amidas en las que se modificaron los sustituyentes del anillo destacando de estos ensayos que: 1) existe una correlación indirecta entre la velocidad inicial de reacción y el poder nucleofílico del grupo saliente (amina), 2) existe una disminución de la velocidad inicial al aumentar el número de sustituyentes del anillo, esto último a causa de probables impedimentos estéricos.

Finalmente, estas propiedades se aplicaron en la resolución de la mezcla racémica de la amina quiral  $\alpha$ -metilbencilamina. La acilación enantioselectiva de la  $\alpha$ -metilbencilamina nos permitió obtener como productos a la amida correspondiente y al isómero que no reconoció la lipasa. Posteriormente, la  $\alpha$ -metilbencilamida sintetizada se sometió a hidrólisis, obteniéndose una conversión por arriba del 70% después de un lapso de 72 h, con una velocidad de hidrólisis mayor que la observada en la hidrólisis de las otras amidas no quirales (vainillinamidas, 3-metoxibencilamidas y bencilamidas). Estos resultados demuestran que por medio de las lipasas, es posible resolver mezclas racémicas de aminas mediante la acilación e hidrólisis enantioselectiva.

## INTRODUCCIÓN

El uso de enzimas para la transformación química es hoy una realidad tanto a escala preparativa como a niveles de producción industrial. La exquisita enantio, regio y quimioselectividad de las enzimas y la posibilidad de que estas trabajen en medios de reacción distintos al agua han convertido a la biocatálisis en una herramienta esencial en el área de la química de síntesis.

Dentro de la amplia diversidad de enzimas existentes en la naturaleza, las lipasas han demostrado de manera contundente su compatibilidad con procesos de síntesis química. En efecto, se ha confirmado que estas proteínas además de contar con las características generales que poseen la mayoría de las enzimas, pueden catalizar reacciones en sistemas prácticamente anhidros, lo cual ofrece una amplia gama de posibilidades en la aplicación de estas enzimas. Entre estas posibilidades alternas destaca la síntesis de amidas a partir de ácidos grasos y aminas primarias o secundarias de manera muy eficiente. Frecuentemente, en la literatura se ha argumentado que esto es posible debido a que las lipasas tienen poca o nula actividad amidasa.

El proceso inverso que implica la obtención de una amina y un ácido graso a partir de la hidrólisis de la amida correspondiente es un método que desde el punto de vista químico implica condiciones drásticas de reacción, tales como temperatura ( $T > 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), y pH ( $9 < \text{pH} < 2$ ). Es evidente que un proceso que pueda llevarse a cabo en condiciones cercanas a la neutralidad y a temperaturas inferiores a los  $60^{\circ}\text{C}$  resulta por demás atractivo.

Una amida natural de gran interés en la industria de alimentos es la capsaicina. Este compuesto es el principal responsable de la pungencia en los chiles. De las características estructurales de los capsaicinoides, a las cuales se les han atribuido el efecto pungente, destacan: un enlace amida, una cadena hidrofóbica y un anillo vainilloide.

Con el objetivo de eliminar la pungencia de la capsaicina, en nuestro grupo de trabajo se llevó a cabo la hidrólisis de esta molécula por medio de una lipasa (lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada a  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  y a un  $\text{pH} = 7$ ). En ese trabajo se demostró que la hidrólisis enzimática de una amida utilizando una lipasa

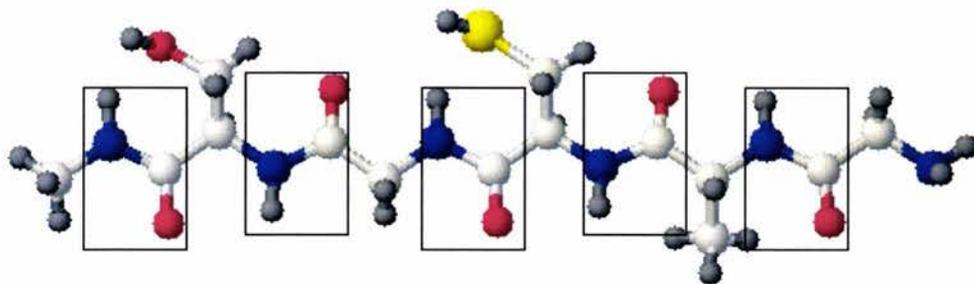
como catalizador es un proceso que puede ser modulado mediante la selección adecuada del componente acilo presente en la molécula y que puede llevarse a cabo en condiciones de reacción poco agresivas. Basándonos en estas consideraciones, en este proyecto se propone estudiar, en detalle, las características estructurales de las amidas susceptibles a ser hidrolizadas enzimáticamente, así como las condiciones del medio de reacción que favorecen la transformación enzimática de estos compuestos. En el estudio se hace un énfasis particular en el establecimiento de las características estructurales del sustrato, las condiciones del medio de reacción y la concentración de sustrato que determinan la mayor eficiencia de la lipasa en la hidrólisis de amidas.

# 1. ANTECEDENTES.

## 1.1. Amidas.

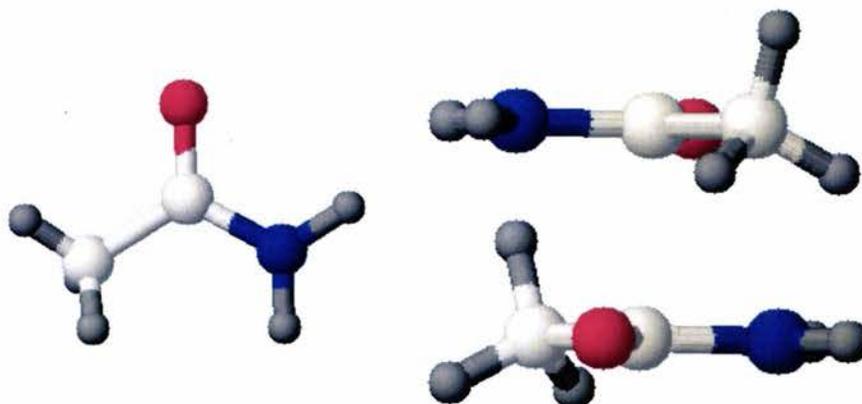
### 1.1.1. Importancia, química y función.

La importancia de este grupo funcional en el ámbito de la química orgánica o de la bioquímica, se debe en gran manera, a la alta estabilidad química que confiere a las moléculas que lo contienen, ejemplo de ello son las proteínas (Fig. 1).



**Figura 1.** Representación de un pentapéptido (Ser-Gly-Cys-Ala-Gly). Los recuadros muestran los enlaces peptídicos (amidas) del polipéptido. En blanco se representan los átomos de carbono, en azul los de nitrógeno, en rojo los de oxígeno, en gris los hidrógenos y en amarillo los átomos de azufre. La relación entre colores y átomos es la misma en las figuras subsiguientes

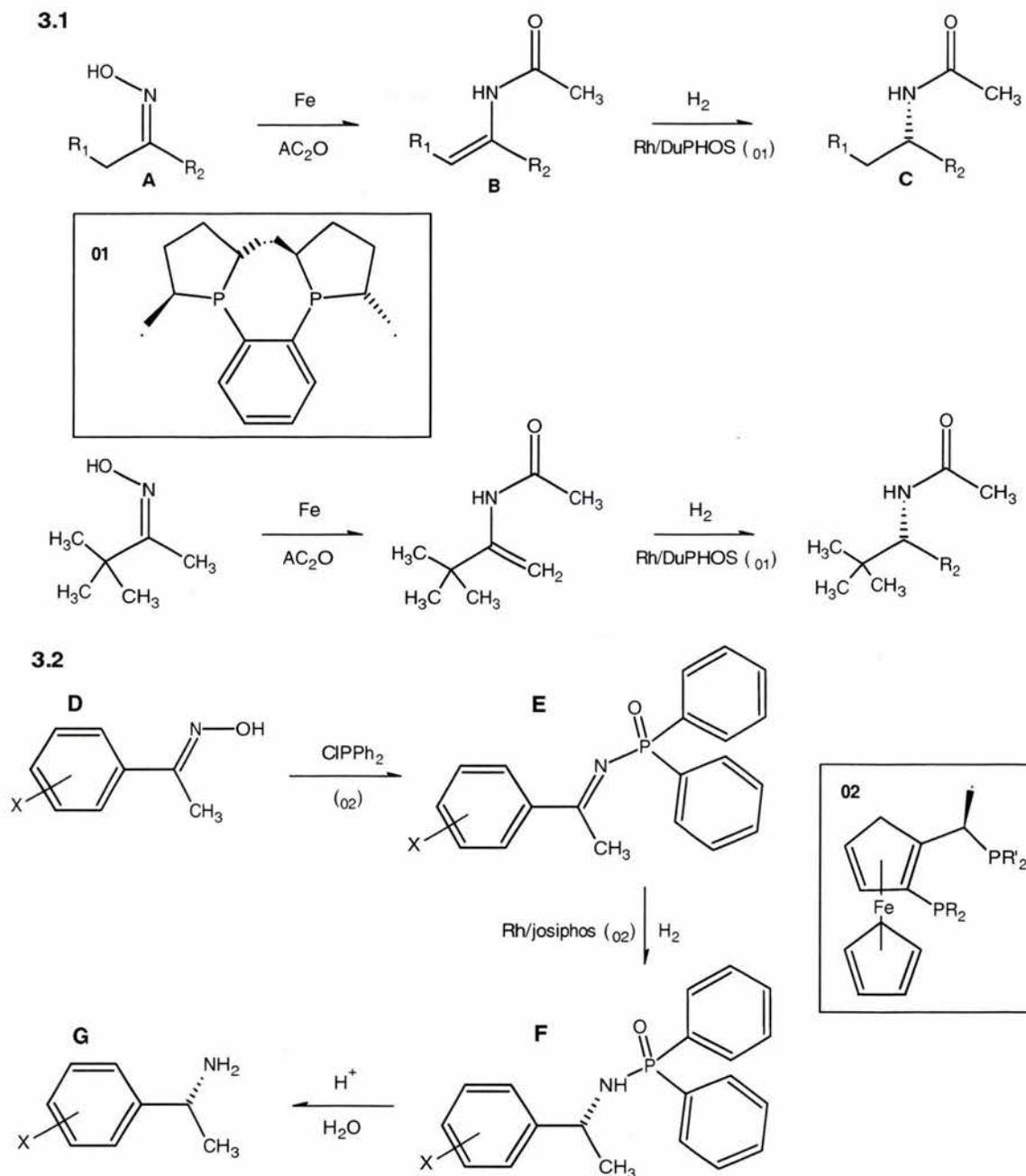
La estabilidad del enlace amida está dada principalmente por su arreglo espacial en el que la parte de la molécula que rodea al carbonilo es plana, es decir, el oxígeno, el carbonilo, y los dos átomos unidos a este último (N y C en el caso de las amidas) se hallan en un mismo plano (Fig. 2). En consecuencia, y aunado a la alta capacidad de este grupo funcional para formar puentes de hidrógeno, las amidas tienen puntos de fusión y ebullición muy elevados comparadas con sus ésteres, cloruros y anhídros análogos (Morrison RT, et al. 1998).



**Figura 2.** Amida en la que se muestra el plano que forma el carbono carbonilo con los dos átomos adyacentes.

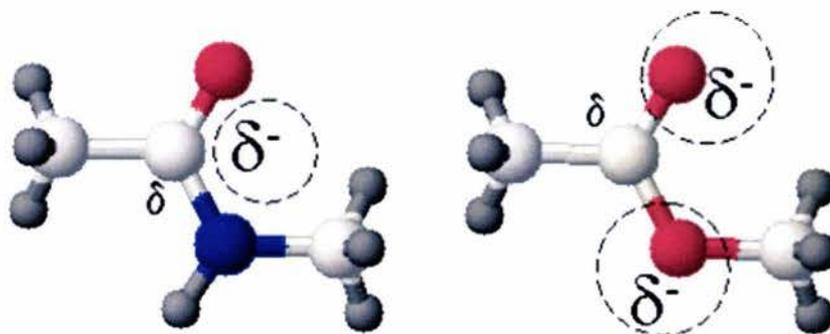
El grupo funcional amida está presente en moléculas de interés industrial tales como las amidas de ácidos grasos, las cuales debido a su estabilidad química son utilizadas en la industria de los lubricantes y surfactantes. Un área de aplicación importante de las amidas es la industria farmacéutica, en donde este grupo está presente en el 50% de los fármacos sintéticos, el 10% de los fármacos naturales (descartando los compuestos proteicos) y el 40% de los fármacos en desarrollo (40%) (Henkel T., et al. 2004).

La poca reactividad de las amidas resulta ser una ventaja cuando se trata de estabilizar moléculas; sin embargo, cuando en un proceso específico se requiere la hidrólisis de estos compuestos, la tarea se vuelve complicada (Fig. 3). Tal es el caso de la obtención de aminas quirales a partir de amidas proquirales, o viceversa, en la que la hidrólisis química de estas moléculas es un proceso que consta de varias etapas, es poco selectivo y se obtienen bajos rendimientos (de Castro M. S., et al. 1998; Morrison RT, et al. 1998; Öhrner N., et al. 1996).



**Figura 3.** Proceso de obtención de aminas o amidas quirales a partir de amidas o aminas proquirales, respectivamente. 3.1) Esquema del método de tres pasos desarrollado por Burk y colaboradores en donde se muestra la síntesis de amidas ópticamente activas mediante la hidrogenación enantioselectiva con Rh<sup>I</sup>/DuPHOS (01). 3.2) Resolución de aminas desarrollada por Slovanis y col. en donde la hidrogenación asimétrica catalítica de E en presencia del sistema catalítico Rh<sup>I</sup>/josiphos (02) resulta en la formación de fosfoamidas ópticamente activas de las que obtienen las aminas correspondientes por hidrólisis ácida (Breuer M., et al. 2004).

De manera general, la hidrólisis de amidas es una reacción complicada desde el punto de vista electrónico debido a la resonancia que genera el átomo de nitrógeno con el grupo carbonilo vecinal. En otras palabras, el nitrógeno genera una disminución del dipolo parcial del carbonilo provocando que estos derivados de acilo menos polarizados, sean atacados con menor facilidad por agentes nucleofílicos (Fig. 4).



**Figura 4.** Representación de una a) amida y b) éster. En a) el dipolo está disminuido debido a la resonancia que se genera entre el átomo de nitrógeno y el carbonilo y en b) se representa un dipolo normal.

La hidrólisis ácida o alcalina de amidas, para formar ácidos carboxílicos y aminas, ocurre en dos pasos: la adición del nucleófilo (paso limitante en la velocidad de reacción) y la eliminación del grupo saliente (Fig. 5). La reacción se ve favorecida por cualquier factor que haga al grupo carbonilo más susceptible al ataque. Tanto los factores estéricos como los electrónicos son importantes en su influencia sobre la reactividad. Una consecuencia importante de las diferentes reactividades del carbonilo es que suele ser posible transformar un derivado de ácido más reactivo en uno menos reactivo, por lo cual, no es fácil convertir amidas en ésteres, anhídridos o cloruros de ácido. Todo lo anterior hace que los procesos químicos de hidrólisis de amidas se lleven a cabo en condiciones drásticas tanto de temperatura ( $T > 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) como de pH ( $2 < \text{pH} < 11$ ).

### 1.1.2. Síntesis enzimática de amidas.

Químicamente las amidas se obtienen mediante la reacción entre amoniaco o aminas y cloruros o anhídridos de ácidos e industrialmente suelen prepararse por calentamiento de las sales de amonio de ácidos carboxílicos. El procedimiento químico más común es a través de reacciones conocidas como reacciones de Schotten-Baumann (Morrison RT, et al. 1998).

Una alternativa reciente al proceso químico es la síntesis de amidas utilizando enzimas como catalizadores, lo cual presenta varias ventajas entre las que destacan:

- El uso de condiciones suaves, temperaturas cercanas a la ambiental y presiones atmosféricas.
- Las enzimas son enantio, regio y quimioselectivas
- La posibilidad de recuperar y reciclar el catalizador

Se ha reportado el uso de varias enzimas hidrolíticas en la síntesis de amidas. Por ejemplo, algunas amidasas y proteasas se han aplicado en la síntesis de amidas, tal es el caso de la penicilín acilasa de *A. faecalis*, que en medio acuoso, utilizando como donador de acilo a la fenilacetamida, ha resuelto mezclas racémicas de aminas mediante una reacción de transaminación (van Langen L. M., et al. 2000). Sin embargo, las desventajas al utilizar estas enzimas son el bajo rendimiento de la reacción y la poca estabilidad de la enzima en medios de reacción orgánicos, además de la preferencia de la enzima es por un número reducido de sustratos, particularmente aminoácidos (van Holde KE., et al. 2000) y derivados de penicilina (Shewale J. G., et al. 1987; Shewale J. G., et al. 1989). Un número importante de lipasas ha sido utilizado para la síntesis de amidas. Por ejemplo, en la síntesis de surfactantes condensados a partir de diferentes aminas tales como la taurina y la N-metil-glucamina y diferentes donadores de acilo como el etil lactato, el ácido decanoico y el ácido oleico, en un medio de reacción como el 2-metil-2-butanol, se han alcanzando conversiones cercanas al 97% (Kawamoto T., et al. 1999; Maugard T., et al. 1997b; Maugard T., et al. 1997a; Slotema W. F., et al. 2003). Así mismo, en la síntesis de amidas con estas enzimas se ha

explorado la enantio (de Castro M. S., et al. 1998; de Castro M. S., et al. 2000; Gotor V.1999), la regio (Adamczyk M., et al. 1999) y la quimioselectividad (Esq. 1) (Reyes-Duarte D., et al. 2002). Los trabajos anteriores han demostrado ampliamente que las lipasas son biocatalizadores de gran utilidad en la síntesis de amidas debido a que: 1) son estables en distintos medios de reacción, 2) aceptan una amplia gama de sustratos y 3) poseen alta regio, quimio y enantioselectividad.

### **1.1.3. Hidrólisis química de amidas.**

Antes de hablar de la hidrólisis química de amidas, es preciso recordar que los procesos de transformaciones químicas, requieren de muchas etapas previas, por ejemplo, la protección y desprotección de grupos funcionales que pudieran llevar a cabo reacciones secundarias no deseadas, o bien, la posible descomposición de grupos funcionales altamente reactivos como consecuencia de las severas condiciones a las que suelen llevarse a cabo las reacciones químicas.

Sin considerar las etapas previas como las que se mencionan anteriormente, químicamente, las amidas sufren hidrólisis al calentarse con ácidos o bases, generando como productos aminas o amoníaco y ácido carboxílico. Esta reacción es típica de los derivados de ácidos carboxílicos e implica un ataque nucleofílico, en donde se reemplaza el grupo amina por un grupo hidroxilo. De manera detallada, en condiciones ácidas ( $\text{pH} < 2$ ), la reacción se lleva a cabo en varios pasos. En el primer paso de la reacción, el oxígeno del carbonilo es protonado mientras que las moléculas de agua en este paso no forman parte de la reacción actuando solo como solvente. El segundo paso de la reacción es el ataque nucleofílico de una molécula de agua sobre el carbonilo, siendo este el paso limitante en la reacción (Fig. 5) (Zahn D. 2004b). Por el contrario, en condiciones alcalinas ( $\text{pH} > 10$ ), la hidrólisis implica el ataque del ion hidróxido, fuertemente nucleofílico sobre la amida; al igual que en la hidrólisis ácida, este es el paso limitante de la reacción (Fig. 5) (Zahn D. 2004a).

Basándose en estas consideraciones, la propuesta del uso de enzimas para llevar a cabo esta reacción presenta varias ventajas.

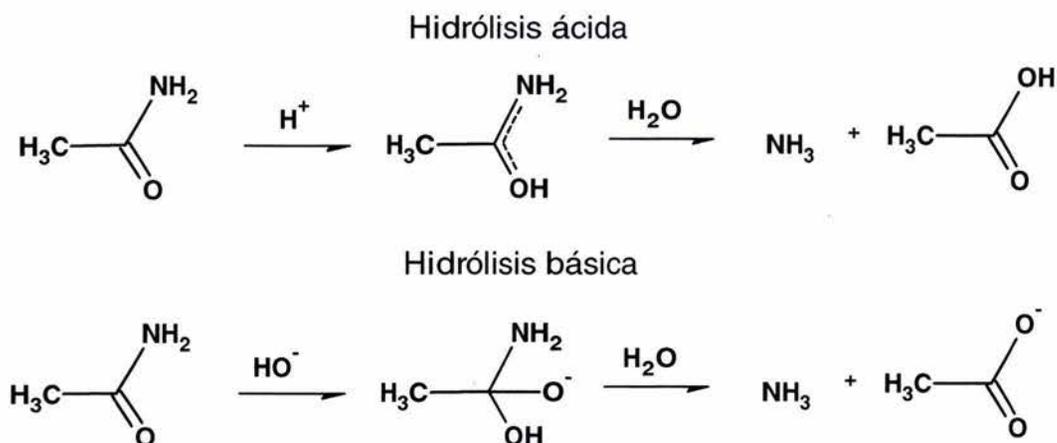


Figura 5. Hidrólisis ácida y básica de amidas.

#### 1.1.4. Hidrólisis enzimática de amidas.

La hidrólisis enzimática de amidas es generalmente catalizada por proteasas y/o amidasas; sin embargo, y de manera similar a los procesos de síntesis enzimática de estos compuestos, muchas de estas proteínas son altamente específicas con relación a los sustratos que fragmentan, en su mayoría aminoácidos (van Holde KE., et al. 2000). Contrario a las proteasas que presentan preferencialmente actividad amidasa o esterasa, se ha demostrado que las lipasas son enzimas capaces de sintetizar una gran variedad de ésteres y amidas, reportándose que poseen poca o nula actividad amidasa (de Castro M. S., et al. 1998; Maruyama T., et al. 2003).

Sin embargo y contrario a esta idea generalizada, se ha demostrado, *in vivo*, que existen complejos enzimáticos, ricos en lipasas y esterasas capaces de hidrolizar amidas. Tal es el caso del metabolismo de degradación de la amida capsaicina en el organismo de ratas. Dicho proceso inicia con la hidrólisis del enlace amida por medio de un “complejo hidrolítico de capsaicina” (CAP) (Park Y. H., et al. 1994), en el cual se han clasificado a las enzimas que participan en él como carboxilesterasas (3.1.1.1.).

Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó por primera vez la hidrólisis de la capsaicina *in vitro* mediante el uso de una lipasa (Duarte D. R., et al. 2000). Dicha reacción consistió en la fusión del sustrato (capsaicina) en una

fase acuosa a 70 °C en presencia de la lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada en un soporte acrílico (Novozym 435). Para explicar este fenómeno, se propuso que la formación del complejo acil-lipasa (característico del mecanismo de las serin-hidrolasas) se ve favorecido por la naturaleza del residuo acilo (C9:6) de la capsaicina, lo que facilita en una segunda etapa el ataque nucleofílico del agua (Fig. 10).

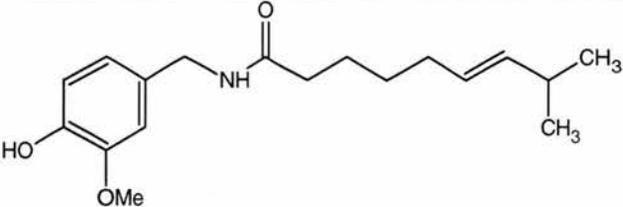
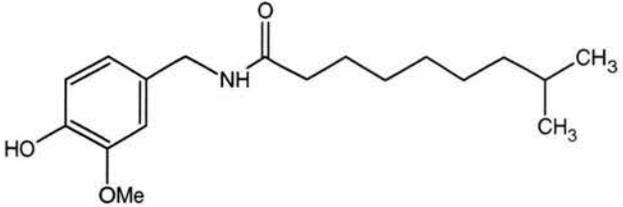
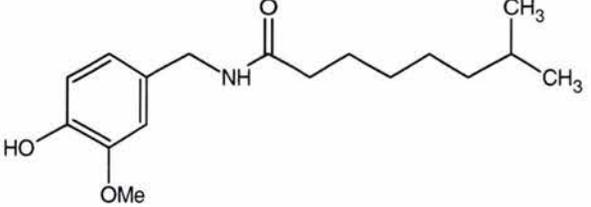
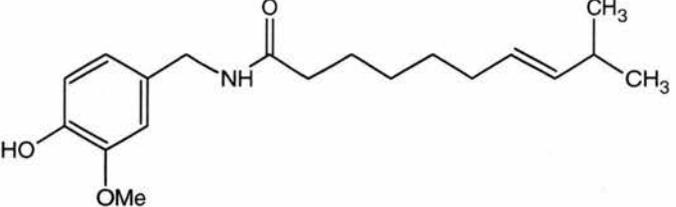
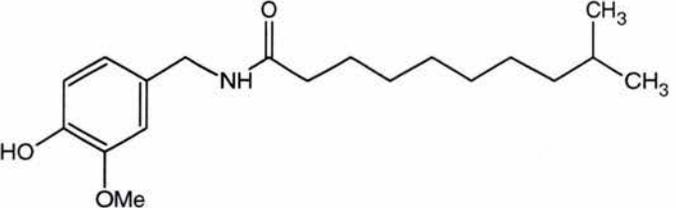
Este trabajo demostró que la reacción enzimática de hidrólisis de amidas, contrario a la hidrólisis química, no requiere condiciones extremas, y nos permite suponer que encontrando las condiciones adecuadas, *in vitro*, las lipasas pueden llevar a cabo esta catálisis.

#### **1.1.5. Capsaicinoides.**

Los capsaicinoides son los compuestos responsables del efecto pungente en los chiles. Estos compuestos se sintetizan en las glándulas secretoras del tejido placentario del fruto de las plantas del género *Capsicum annuum* y posteriormente son difundidos a las semillas en donde se conserva la mayor parte de ellos.

Los principales capsaicinoides que se encuentran en la oleoresina de los chiles son la capsaicina 70%, la dihidrocapsaicina (22%) y otros tres en menor proporción, la norhidrocapsaicina, la homocapsaicina y la homodihidrocapsaicina (DeWitt D. 2002). De todos estos compuestos la capsaicina es el capsaicinoide más pungente (Tabla 1).

Tabla 1. Estructura y pungencia en U. Scoville de los capsaicinoides.

Compuesto	Estructura	Pungencia (U. Scoville) <sup>*</sup>
<b>Capsaicina</b>		16,000,000
<b>Dihidrocapsaicina</b>		16,000,000
<b>Nordihidrocapsaicina</b>		9,100,00
<b>Homocapsaicina</b>		8,600,000
<b>Homodihidrocapsaicina</b>		8,600,000

### 1.1.5.1. Características estructurales y su relación con la pungencia.

Los capsaicinoides presentan tres regiones importantes desde el punto de vista de la pungencia, a) el anillo vainilloide, b) el enlace amida y c) el residuo acilo o cadena hidrofóbica.

<sup>\*</sup> Escala arbitraria para la cuantificación de la pungencia (1 ppm equivale a 15 U. Scoville)

Basados en la estructura de la capsaicina y por ser el compuesto natural más pungente, Szolcsanyi y Jancsó-Gabor propusieron un modelo para el estímulo de los receptores de capsaicinoides en los nervios sensitivos. Dicha propuesta visualiza la unión de 5 sitios de la molécula: 1) la unión de la molécula por medio del átomo de hidrógeno del 4-hidroxiilo, 2) la unión del hidrógeno del grupo amino en forma electronegativa, provocando que, 3) el oxígeno del grupo carbonilo se una electropositivamente, y además que 4) y 5) las áreas apolares, tanto de la cadena hidrofóbica como la del anillo, se unan mediante fuerzas de Van der Waals.

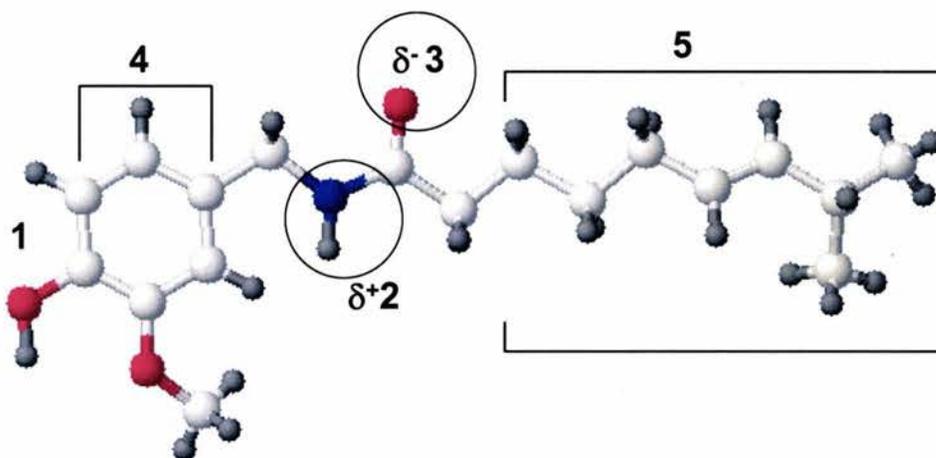


Figura 6. Zonas de interacción entre la capsaicina y su receptor.

Este modelo explica algunos puntos importantes como son:

- La capsaicina, sus homólogos y estructuras análogas que poseen la estructura óptima para unirse a los sitios de estímulo de este modelo receptor, pueden inducir alguna o las 3 respuestas básicas: pungencia, dolor e insensibilización.
- Existe una longitud ideal de la cadena que se adapta al modelo receptor.
- Los compuestos que carezcan de uno de los grupos de unión, por consiguiente, tendrán menor afinidad por los receptores.

A partir de estas interacciones se desprende que moléculas análogas pudieran tener un poder pungente igual o superior al de los compuestos naturales (Janusz J. M., et al. 1993).

#### **1.1.5.2. Cuantificación sensorial de la pungencia.**

El primer síntoma por el consumo de capsaicina es la sensación de calor como estímulo de la pungencia o picor. Debido a esto se han desarrollado técnicas sensoriales de cuantificación de los capsaicinoides; sin embargo, estas técnicas no son de gran precisión a pesar de que son herramientas importantes para el análisis. La técnica tradicional diseñada por W. Scoville, consiste en entrenar a un panel de jueces capaces de detectar concentraciones bajas de capsaicina. El principio de esta técnica se basa en la capacidad de los jueces para detectar los primeros indicios de pungencia en soluciones diluidas de capsaicina (umbral de detección) adaptando esta capacidad a una escala arbitraria llamada escala de unidades Scoville (1 ppm equivale a 15 unidades Scoville). Esta técnica ha sido corroborada por medio de análisis realizados en cromatografía de gases; sin embargo este método está basado en el tamaño e hidrofobicidad de la cadena alifática, lo que limita a que compuestos análogos puedan cuantificarse. Otro método similar es el de Gillette, que consiste en evaluar la pungencia mediante un panel formado por jueces entrenados, limitados a evaluar solo dos muestras por sesión (Bellringer M. 2004).

#### **1.2. Lipasas.**

Las lipasas son enzimas pertenecientes al grupo de las hidrolasas, las cuales tienen como reacción natural la hidrólisis de ésteres del glicerol (E.C. 3.1.1.3). También se conocen como acil-glicerolasas, acil hidrolasas o triacilglicerol hidrolasas.

### 1.2.1. Características generales.

Las lipasas son enzimas que se pueden encontrar en microorganismos, plantas y animales. Comercialmente en su mayoría son de origen microbiano: hongos, bacterias y levaduras (Tabla 2).

**Tabla 2.** Lipasas comerciales y su origen microbiano.

Distribuidor	Origen de la lipasa
Amano Pharmaceutical Co., Nagoya, Japón <a href="http://www.amano-enzyme.co.jp">www.amano-enzyme.co.jp</a>	<i>Asepergillus niger</i> , <i>C. rugosa</i> , <i>C. lipolytica</i> , <i>G. candidum</i> , <i>H. lanuginosa</i> , <i>M. javanicus</i> , <i>Penicillium sp.</i> , <i>P. roquefortii</i> , esterase de páncreas de puerco, <i>P. fluorescens</i> , <i>R. delmar</i> , <i>R. javanicus</i> , <i>R. niveus</i>
Biocatalysts, Pontypridd, Wales, R.U. <a href="http://www.biocatalysts.com">www.biocatalysts.com</a>	Lipomod AC, Lipomod RD, Animal, <i>C. lipolytica</i> , <i>Ch. Viscosum</i> , <i>G. candidum</i> , <i>H. lanuginosa</i> , <i>M. javanicus</i> , <i>M. miehei</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. roquefortii</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>R. delmar</i> , <i>R. javanicus</i> , <i>R. japonicus</i>
Biocon India, Bangalore, India <a href="http://www.biocon.com">www.biocon.com</a>	Lipasa para industrias de cuero y detergentes, Biolipase conc., Lipase FAP, Pregastric esterasa, Lipoprotein lipase, Biolipase A
Boehringer Mannheim, Penzberg, Alemania <a href="http://www.roche.com/diagnostics">www.roche.com/diagnostics</a>	<i>C. rugosa</i> , <i>C. Antarctica</i> , <i>Ch. viscosum</i> , <i>G. candidum</i> , <i>H. lanuginosa</i> , <i>M. javanicus</i> , <i>M. miehei</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. roquefortii</i> , Porcine pancreas, <i>Pseudomonas</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>R. delmar</i> , <i>R. javanicus</i> , <i>R. japonicus</i>
Novozymes A/S, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca <a href="http://www.novozymes.com">www.novozymes.com</a>	Lipolase (lipasa para detergente), y lipasas de diversos orígenes
Diversa Corp., San Diego, CA, E.U. <a href="http://www.diversa.com">www.diversa.com</a>	Lipasa para detergente, y otras lipasas

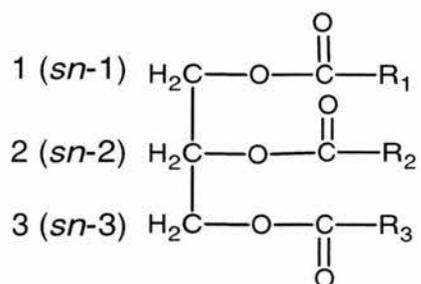
Continuación Tabla 2. Lipasas comerciales y su origen microbiano

Distribuidor	Origen de la lipasa
Thermogen Inc., Woodridge, IL, E.U. <a href="http://www.thermogen.com">www.thermogen.com</a>	ThermoCat, Quick Screen, Esterasa kits
Biocatalytics Inc., Pasadena, CA, E.U. <a href="http://www.biocatalytics.com">www.biocatalytics.com</a>	Varias lipasas, SALT-enzimas inmovilizadas
Juelich Enzyme Products GMBH, Wiesbaden, Alemania <a href="http://www.juelichenzyme.com">www.juelichenzyme.com</a>	Varias lipasas y esterases, <i>Rhodotorula pilimanae</i> , <i>R. arrhizus</i> , Pig liver esterase, <i>R. niveus</i> , <i>C. rugosa</i>
Sigma-Aldrich-Fluka <a href="http://www.sigma-aldrich.com">www.sigma-aldrich.com</a>	Lipasa de pancreas de puerco, <i>C. lipolytica</i> , <i>M. javanicus</i> , <i>P. roquefortii</i> , <i>R. arrhizus</i> , <i>R. niveus</i> , <i>C. rugosa</i>
Genzyme Biochemicals, Springfield Mill, Kent, R.U. <a href="http://www.genzyme.com">www.genzyme.com</a>	<i>Ch. viscosum</i> , Lipoprotein lipase, <i>C. rugosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>
Gisst-Brocades, Delf, Holanda <a href="http://www.gist-brocades.nl">www.gist-brocades.nl</a>	<i>M. miehei</i> , <i>R. arrhizus</i> , Picantaza
Enzyme business of GB adquirido por Genencor <a href="http://www.genencor.com">www.genencor.com</a>	Lipomax, Lumafast (lipasas p/ detergentes)
Hoechst, Frankfurt, Alemania <a href="http://www.aventis.com">www.aventis.com</a>	Pancreatin
Nagase & Co. Ltd., Ohama, Japón <a href="http://www.nagase.co.jp">http://www.nagase.co.jp</a>	Rhizopus
Merck, Darmstadt, Alemania <a href="http://www.merck.com">www.merck.com</a>	Lipasa de páncreas de puerco
Roehm, Darmstadt, Alemania <a href="http://www.roehm.de">www.roehm.de</a>	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. niger</i> , <i>B. subtilis</i> , Pancreas

(Krishna S. H., et al. 2002)

Con base en la regioselectividad que muestran al hidrolizar triglicéridos, las lipasas pueden clasificarse en tres grupos distintos (Fig. 7).

1. Existen aquellas lipasas que no hidrolizan la posición 2, pero que son capaces de anclarse en los extremos de los triglicéridos, y por ellos se conocen como 1,3-específicas, un ejemplo de este grupo es la lipasa B de *C. antarctica* que tiene gran estereoespecificidad y preferencia por la posición *sn*-3.
2. Otro grupo es el de las no-específicas, las cuales pueden hidrolizar tanto ésteres primarios como secundarios.
3. El tercer grupo se compone por lipasas no-específicas pero que si muestran preferencia por ácidos grasos de cierto tipo (Krishna S. H., et al. 2002).



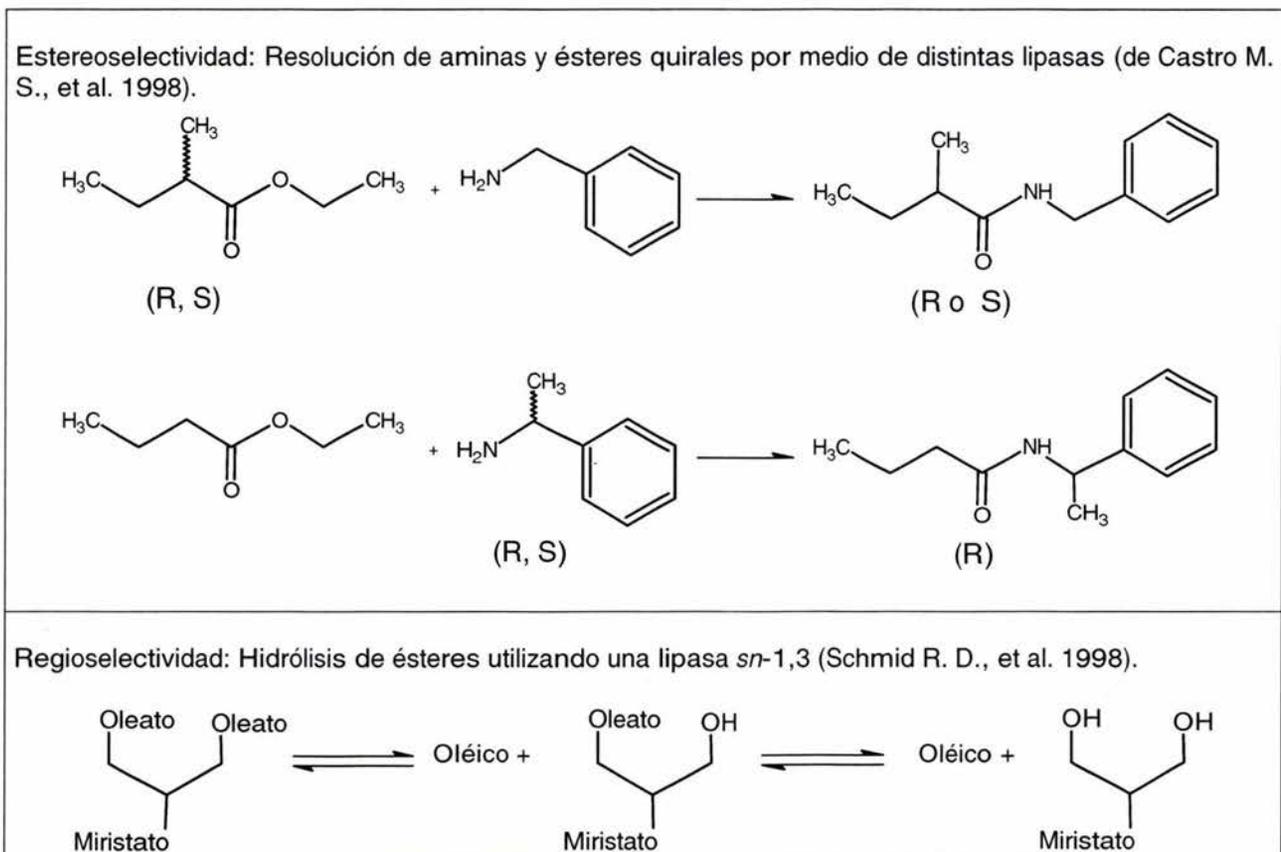
**Figura 7.** Representación de un triglicérido en donde se muestran las tres diferentes posiciones en las que puede hidrolizar la lipasa y dependiendo de ello la clasificación regioselectiva de la enzima.

Otra característica de las lipasas es que pueden ser específicas en cuanto al tamaño de cadena del ácido graso (Jensen R. G., et al. 1983).

Entre las grandes ventajas que ofrecen las lipasas destaca su amplio rango de especificidad por los sustratos, es decir, aceptan como sustratos una gran gama de compuestos y además, pueden ser utilizadas en una variedad de medios orgánicos. Esta compatibilidad con diferentes medios de reacción hace que las lipasas amplíen su potencial catalítico, ya que además de hidrolizar triglicéridos, como se detalla más adelante, son capaces de catalizar la síntesis de una gran variedad de compuestos.

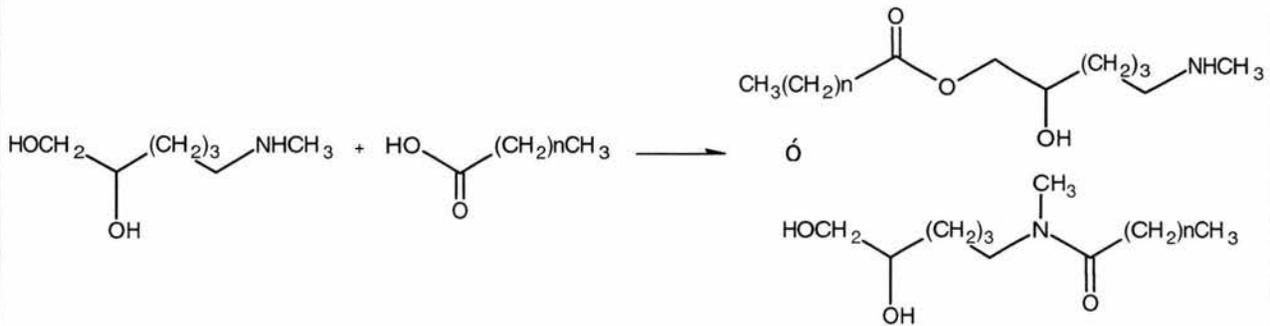
A pesar de que las lipasas pueden hidrolizar y sintetizar ésteres de ácidos carboxílicos como las proteasas y esterasas, el mecanismo de reacción difiere en el hecho de que las proteasas muestran especificidad por amino ácidos o moléculas análogas, en cambio las esterasas muestran una preferencia clara por ésteres de cadenas hidrofóbicas cortas, solubles en agua, mientras que las lipasas, prefieren grupos acilo de hidrofóbicos (cadenas > C8). Las lipasas pueden hidrolizar el compuesto *p*-nitrofenil palmitato, mientras que las esterasas no, siendo esta característica una de las maneras más comunes que permiten distinguir entre una lipasa y una esterasa.

**Esquema 1.** Ejemplos de la selectividad de las lipasas.



**Continuación esquema 2.** Ejemplos de la selectividad de las lipasas.

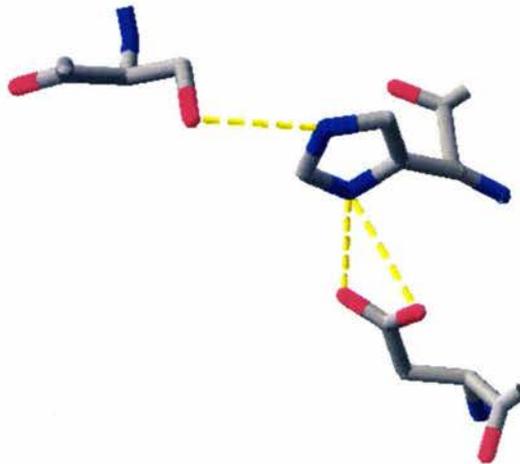
Quimioselectividad: Síntesis de amida, éster o ambos a partir del compuesto N-metil-glucamina (Maugard T., et al. 1998).

**1.2.2. Características estructurales.**

La mayoría de las lipasas son extracelulares y tienen un peso molecular entre 20 y 60 kDa. La estructura primaria de varias lipasas ha sido determinada y de ellas sabemos que el número de amino ácidos está en el rango de 270 a 641.

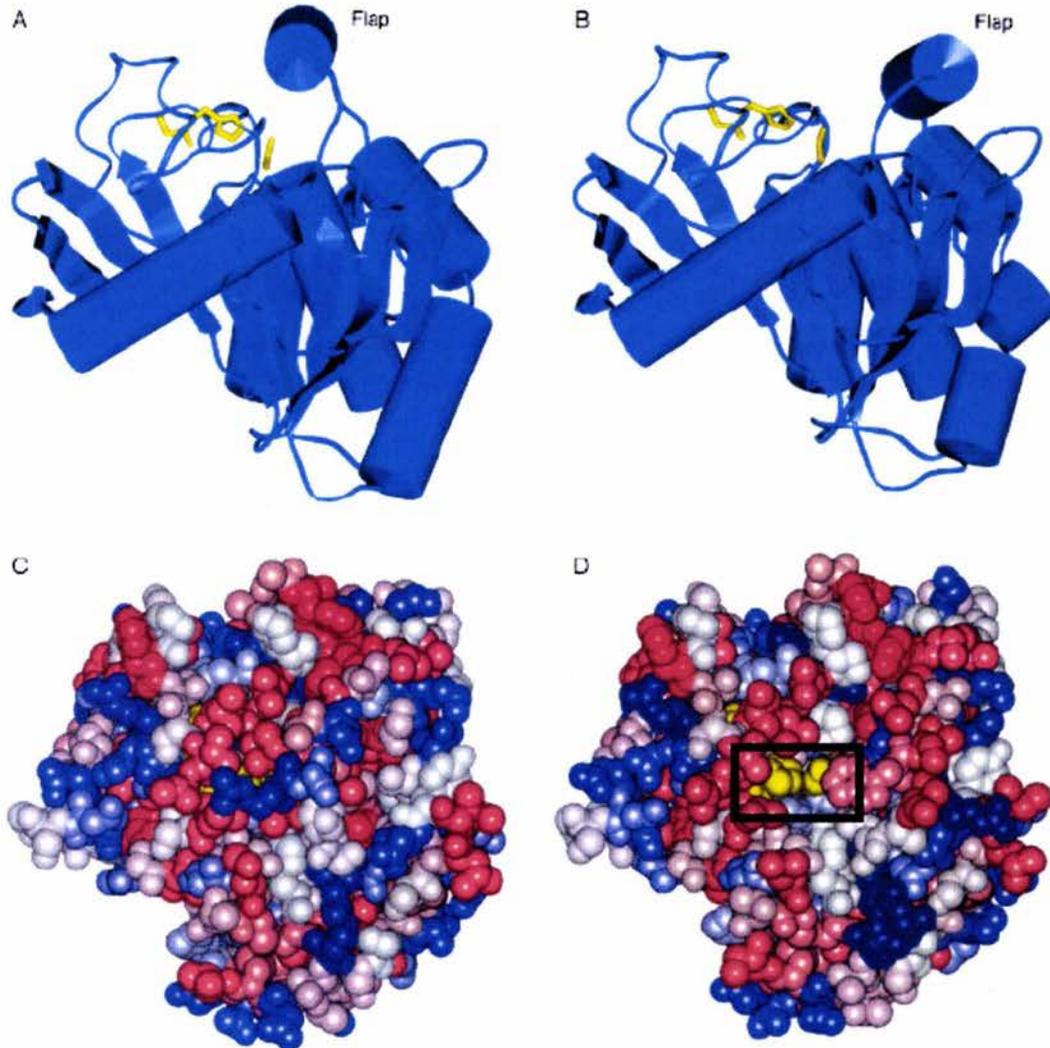
Las lipasas tienen una única estructura terciaria que expone al sitio catalítico solo en presencia de una fase lipídica insoluble (interfase agua-aceite) o en un medio orgánico, fenómeno que se conoce como activación interfacial. Lo anterior es una de las ventajas de las lipasas frente a las esterasas ya que estas últimas solo actúan con sustratos solubles. La gran estabilidad de las lipasas en solventes orgánicos está íntimamente relacionada con sus características estructurales y en particular, con la gran cantidad de amino ácidos hidrofóbicos que expone cuando el sitio activo se vuelve accesible, permitiendo así que la región de unión a la interfase se convierta en una zona más apolar (Verger R. 1997).

Basándonos en el sitio activo, las lipasas han sido clasificadas como serin hidrolasas. Dentro de sus características estructurales se incluye un plegamiento  $\alpha/\beta$  hidrolasa (compuesto por un "core" de hebras  $\beta$  rodeado por hélices  $\alpha$ , típico de numerosas hidrolasas) y una triada catalítica que se compone de una serina nucleofílica, un aspartato o glutamato unido por un puente de hidrógeno a una histidina (Fig. 8).



**Figura 8.** Representación del sitio activo o triada catalítica (serina nucleofílica, histidina y ácido aspártico) y de los puentes de hidrógeno que estabilizan el mismo. En gris los átomos de carbonos, en azul los nitrógenos y en rojo los oxígenos.

Se han identificado cuatro bolsas o agujeros en donde se une el sustrato: un oxianión y dependiendo de la posición (*sn*-1, -2 o -3), tres bolsas en donde se acomoda el ácido graso del triglicérido. También poseen, en la mayoría de los casos, una tapa formada por una  $\alpha$ -hélice que cubre el sitio activo, la cual es la responsable de la activación interfacial (Fig. 9). Sin embargo, existen lipasas que a pesar de poseer esta tapa, no exhiben el fenómeno de activación interfacial debido a que siempre está en su forma abierta, tal es el caso de la lipasa de *P. glumae*, *P. aeruginosa* y *C. antarctica* B (Krishna S. H., et al. 2002). La hélice móvil ( $\alpha$ 5) de estas enzimas, más que funcionar como tapa, puede verse como parte de la superficie enlazante (ancla) a lípidos, sujetando a la lipasa en la interfase agua / lípido (Otto R. T., et al. 2000; Verger R. 1997).

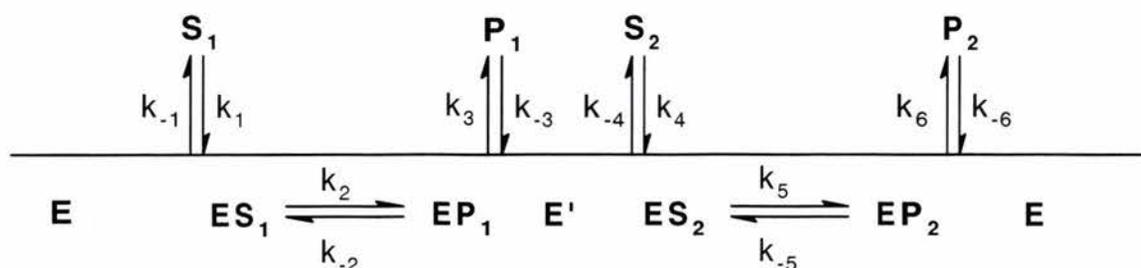


**Figura 9.** Lipasa de *Mucor miehei* vista desde arriba. En A y C se muestra la estructura de la lipasa cerrada por el loop (hélice  $\alpha 5$ ) y en las figuras B y D se muestra al sitio activo (amarillo) expuesto. En azul zonas hidrofóbicas y en rojo zonas hidrofílicas.

### 1.2.3. Mecanismo cinético.

Al igual que las serín proteasas, las lipasas, cuentan con tres amino ácidos responsables de la catálisis: una serina que actúa como nucleófilo y un ácido glutámico o aspártico unido por puente de hidrógeno a una histidina; estos tres amino ácidos conforman lo que se conoce como la triada catalítica (Schmid R. D., et al. 1998).

El comportamiento catalítico de las lipasas se ajusta al modelo de tipo Ping Pong Bi Bi (Fig. 10) (Chulalaksananukul W., et al. 1992), y químicamente equivale a una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ) (Bentley T. W., et al. 1996). El mecanismo del modelo de Ping Pong Bi Bi es aquel en el cual se produce un producto entre la adición de dos sustratos; en otras palabras, la secuencia de la reacción es la entrada de un primer sustrato y la salida de un primer producto, seguida de la adición de un segundo sustrato y la salida del último producto (Segel I. H. 1975).

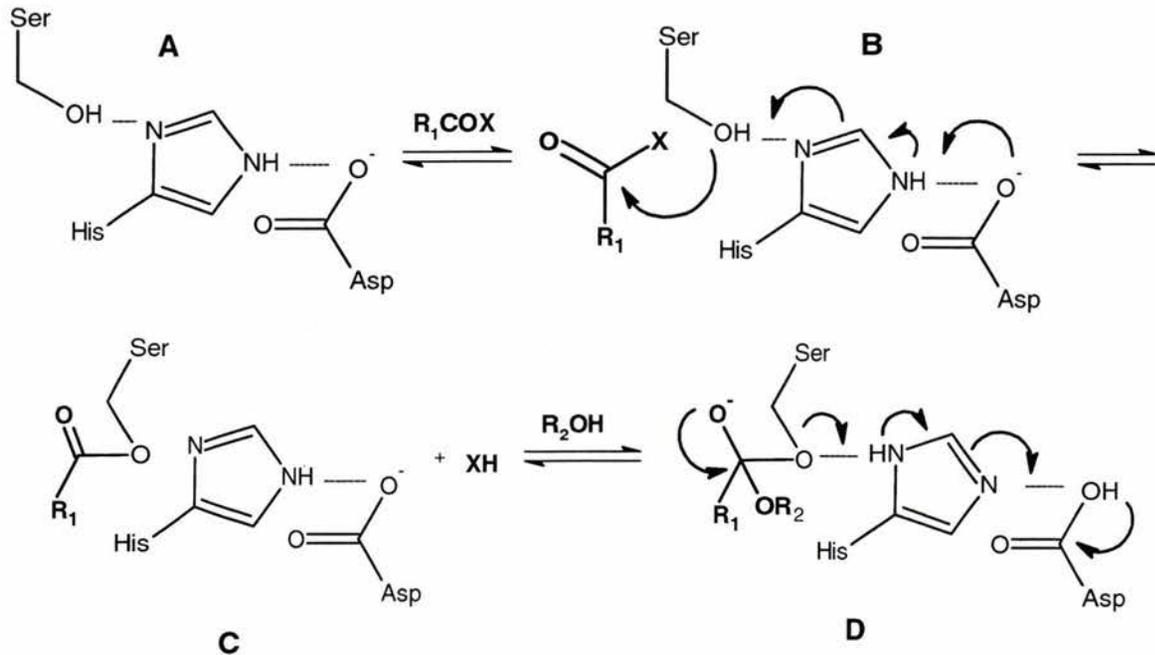


**Figura 10.** Mecanismo Ping Pong Bi Bi. En donde, en el caso de hidrólisis de ésteres, E es la enzima, el primer sustrato ( $S_1$ ) es el éster, el primer producto ( $P_1$ ) es un alcohol, el segundo sustrato ( $S_2$ ) es agua y el último producto ( $P_2$ ) es el ácido carboxílico.

El mecanismo de la reacción comienza cuando la serina nucleofílica es activada por los residuos histidina y ácido aspártico o glutámico a través de una transferencia de protones entre ellos, permitiendo así que la serina activada actúe como nucleófilo atacando al sustrato en el grupo carbonilo, formando un intermediario tetraédrico (Schmid R. D., et al. 1998). Este intermediario es estabilizado por amino ácidos vecinos del agujero oxianión. En el caso de la hidrólisis de ésteres por medio de lipasas (Fig. 11), después la activación de la serina, la histidina dona un protón al grupo saliente (XH), componente del éster ( $S_1$  Fig. 10,  $R_1COX$  Fig. 11), del cual se forma el alcohol ( $P_1$  Fig. 10, XH Fig. 11). El intermediario covalente que se forma (serina-sustrato) se conoce como complejo acil-enzima ( $E'$  Fig. 10,  $R_1O-O-Ser$  Fig. 11).

El agua ( $S_2$  Fig. 10,  $R_2OH$  Fig. 11), es activada por el residuo histidina, el cual retoma el protón que había donado en la primer etapa y el ión hidroxilo resultante actúa como nucleófilo, atacando al carbono carbonilo del complejo acil-

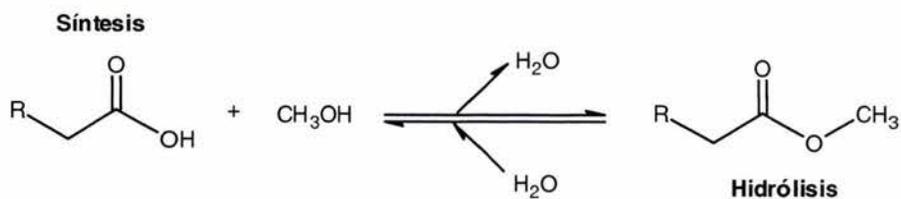
enzima. Al realizarse el ataque nucleofílico del segundo sustrato se forma un nuevo intermediario tetraédrico estabilizado por el agujero oxianión, e inmediatamente, el protón tomado por la histidina retoma a la serina rompiendo así el complejo acil-enzima liberando de esta manera, al ácido carboxílico ( $P_2$  Fig. 10,  $R_1COOR_2$  Fig. 11), y regresando a la enzima en su estado original.



**Figura 11.** En A el sitio activo de la enzima está en su estado basal. En B, con la entrada del sustrato al sitio activo se produce la migración del protón tal que la serina queda activada, seguido de la formación del complejo acil-enzima en C y por último, en D, el segundo sustrato efectúa un ataque nucleofílico que desencadena el regreso del protón regresando así a la conformación basal del sitio activo (A). En la hidrólisis del metil oleato por ejemplo  $R_1COX$  = metil oleato en donde  $R_1$  = ácido oleico,  $X$  = Omet,  $XH$  = metanol,  $R_2 = H$ ,  $R_1COOR_2$  = ácido oleico libre.

El segundo sustrato es el que define el tipo de reacción, si es una amina, la reacción se conoce como aminólisis, si es amoniaco, entonces la reacción es una amoniólisis, si es un alcohol es alcoholólisis, si es un tiol es tiólisis, etc (Fig. 12).

Síntesis e hidrólisis

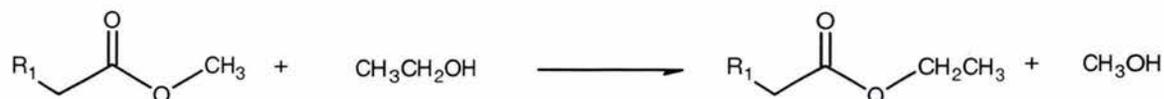


Transesterificación

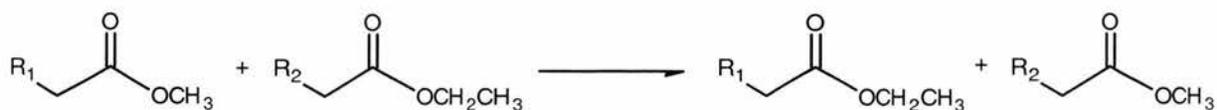
**Acidólisis**



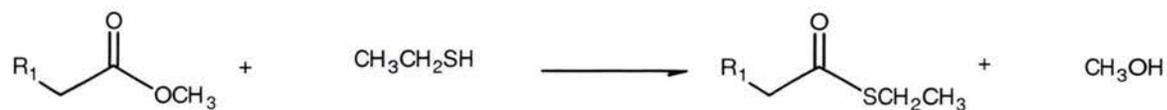
**Alcoholólisis**



**Interesterificación**



**Tiólisis**



**Amoniólisis**



**Aminólisis**



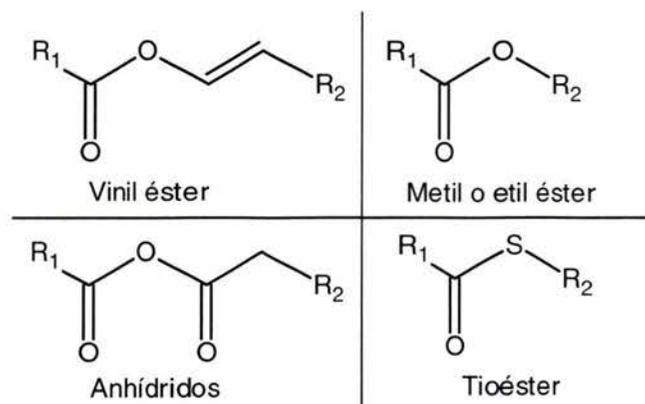
**Figura 12.** Reacciones catalizadas por lipasas, en donde el segundo sustrato es el que define el tipo de reacción.

### 1.3. Sustratos utilizados en la síntesis de amidas por medio de lipasas.

#### 1.3.1. Donadores de acilo.

Como lo enfatiza Verger (Schmid R. D., et al. 1998), las lipasas pueden ser redefinidas como carboxil-esterasas que catalizan la hidrólisis o síntesis de acilglicérols de cadena larga, y aunque el término cadena larga no está bien definido podemos decir que a este grupo pertenecen los residuos acilo con una longitud de cadena de diez o más carbonos. Debe aclararse que no por ello las lipasas no sean capaces de hidrolizar o sintetizar moléculas con residuos acilo de menor número de carbonos, aunque de manera menos eficiente.

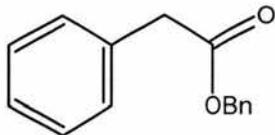
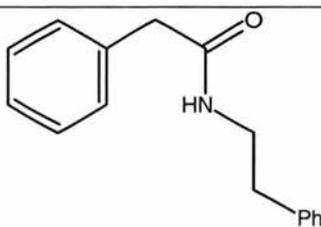
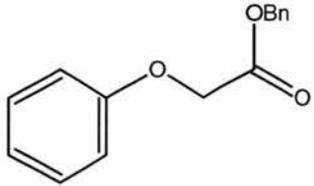
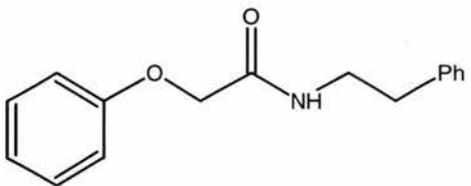
La elección del donador de acilo es una premisa esencial en las reacciones de síntesis por medio de lipasas y es crucial conocer tanto la reactividad del donador, como la afinidad de la enzima por el sustrato. Para evitar la reversibilidad de la reacción, varios donadores de acilo pueden ser candidatos para la síntesis de amidas, como es el caso de ésteres activados, vinil ésteres, anhídridos, tioésteres, entre otros. Sin embargo, todos los donadores antes mencionados no pueden ser utilizados en la síntesis de amidas por medio de lipasas, debido a la alta nucleofilicidad de las aminas, lo que provoca una reacción espontánea de estos donadores. Por todo lo anterior, y a diferencia de la síntesis de ésteres, en la síntesis de amidas es preferible el uso de metil o etil ésteres (Fig. 13) (Gotor V. 1999).



**Figura 13.** Donadores de acilo activados utilizados en la biocatálisis.

Adamczyk y col. (Adamczyk M., et al. 1999) comparan la amidación de monoésteres con “linkers oxigenados” contra sus análogos alifáticos (Tabla 3). Ellos observan que en la amidación por medio de lipasas, los ésteres con “linkers oxigenados” aumentan la reactividad (97% de conversión a las 24 h), comparada con los ésteres alifáticos (31% conversión a las 24 h) y concluyen que la preferencia de la lipasa por los ésteres con “linkers oxigenados” en esta reacción, se debe a que el efecto inductivo del oxígeno vecinal vuelve al grupo carbonilo del éster más electrofílico, lo que favorece el ataque nucleofílico de la amina.

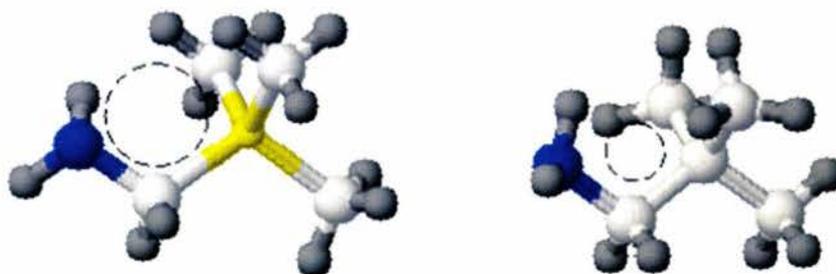
**Tabla 3.** En la amidación de la reacción A), el éster no tiene el “linker oxigenado”, en cambio, en la reacción B) el sustrato si tiene dicho “linker” y como se puede observar en los porcentajes de conversión esto acelera la reacción.

Sustrato	Producto	% Conversión		
		24h	48h	168h
A) 		31	49	78
B) 		97	99	99

### 1.3.2. Agentes nucleofílicos.

En general, en la síntesis química es muy importante el nucleófilo que se utiliza, ya que la velocidad inicial de la reacción depende del poder nucleofílico del sustrato. En el caso de la síntesis enzimática no siempre es así, se ha reportado el uso de tres diferentes tipos de nucleófilos, encontrándose que la velocidad inicial de reacción con el complejo acil-enzima no corresponde al poder nucleofílico de los sustratos para la síntesis enzimática de amidas, tioésteres y ésteres (Öhrner N., et al. 1996). Los autores atribuyen esta falta de correlación a la velocidad de transferencia del protón del nucleófilo a la histidina de la triada catalítica durante el ataque nucleofílico al complejo acil-enzima; la cual, parece ser menor para la amina que la correspondiente al alcohol.

En contraposición, apoyando las teorías de la química orgánica, está el grupo de Kawamoto y col. (Kawamoto T., et al. 1999), quienes comparan dos sustratos análogos en estructura con diferente poder nucleofílico en la síntesis de amidas (Fig. 14). Los autores concluyen que efectivamente es el alto poder básico o nucleofílico el que incrementa la velocidad inicial de síntesis.



**Figura 14.** Del lado izquierdo se muestra el compuesto (aminometil)trimetilsilano y a la derecha su análogo de carbono. Aunado al efecto del mayor poder nucleofílico del compuesto con silicio ( $pK_a = 11.2$ ) contra su análogo de carbón ( $pK_a = 10.3$ ), los autores sugieren que también el (aminometil)trimetilsilano está estéricamente menos impedido, lo que favorece el ataque nucleofílico. En blanco los átomos de carbono, en gris los hidrógenos, en azul el nitrógeno y en amarillo el silicio.

Otro punto importante de este rubro es el volumen del grupo aceptor o nucleófilo y se ha observado que hasta cierto límite este no es un impedimento para llevar a cabo la reacción. Tal es el caso de la condensación del ácido oleico y la glucamina o por ejemplo, la síntesis de ésteres de vitaminas a partir del retinol, siendo este grupo de un tamaño considerable (Maugard T., et al. 1997b; Maugard T., et al. 2000). Por otro lado, Maugard y col. estudiaron la quimioselectividad de la lipasa B de *C. antarctica* variando las condiciones ácido-base del medio de reacción y demostraron que en un medio ácido se favorece la esterificación, mientras que en un medio básico la amidación y proponen que en el medio ácido se protona el grupo amino, que a su vez imposibilita el ataque al complejo acil-enzima, y en contraparte en el medio básico el grupo amino es más reactivo y favorece la amidación (Maugard T., et al. 1998).

### 1.3.3. Solventes.

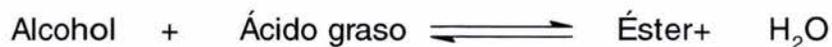
Por naturaleza, la mayoría de las enzimas actúan en medios acuosos; sin embargo, para efectos prácticos, el agua es un solvente pobre para casi todas las reacciones de química orgánica preparativa. Los intentos de extrapolar la catálisis a medios orgánicos datan de finales del siglo pasado, y en esta transición, la biocatálisis ha pasado por solventes miscibles con el agua y medios bifásicos hasta llegar a solventes completamente anhidros (Klibanov A. M. 2001; Krishna S. H., et al. 2002). Esto ha dado lugar, además de la posibilidad de llevar a cabo reacciones que en medio acuoso son difíciles de realizar o simplemente no suceden, se pueda manipular la quimio, regio y enantioselectividad de la enzima.

En un principio se creía que la baja eficiencia de las enzimas en medios orgánicos se debía a la desnaturalización de la proteína o bien, que había cambios conformacionales tan drásticos que repercutían directamente en la actividad catalítica de la enzima. Contrario a lo que se suponía, Desai y Klibanov (Desai U. R., et al. 1995), con análisis de espectroscopia de alta resolución (NMR), encontraron que en acetonitrilo, tetrahidrofurano, etil acetato y butanol, la tripsina de bovino no sufre cambios conformacionales significativos, a pesar de que se sabe que termodinámicamente esto no es posible. Dicho por el mismo Klibanov,

las enzimas en medios orgánicos termodinámicamente tienden a desnaturalizarse, sin embargo están cinéticamente impedidas a hacerlo.

A pesar de los esfuerzos por eliminar la mayor cantidad de agua del medio de reacción con el fin de llevar a cabo reacciones de hidrólisis inversa o síntesis, esto no es conveniente en la práctica, pues se sabe que una cantidad mínima de este solvente es indispensable para mantener las capacidades catalíticas de la enzima. Por pequeña que sea ésta cantidad, el agua que se encuentra unida a la enzima le brinda estabilidad estructural. La mayoría de los solventes polares tienen una afinidad alta por el agua y tienden a inactivar a las enzimas ya que secuestran dichas moléculas indispensables. Por el contrario, solventes hidrofóbicos como el *n*-hexano, son de los más usados en la biocatálisis pues su poca afinidad por el agua no conlleva una deshidratación de la proteína. Si la reacción produce agua, por lo general, se ha observado un decremento en el rendimiento de una reacción de hidrólisis inversa, además de una disminución en la estabilidad de la enzima. Por esta razón se han propuesto varios métodos para controlar la cantidad de agua disponible ( $a_w$ ) como son: la evaporación del agua producida con presiones reducidas, su adsorción, tamices moleculares, resinas de intercambio iónico y la adición de hidratos de sales.

En las reacciones en las que se produce agua (Fig. 15), el objetivo principal en el control termodinámico del agua, o actividad de la misma, está íntimamente relacionado con el desplazamiento del equilibrio hacia la acumulación del producto de acuerdo a la definición matemática de la constante de equilibrio ( $K_e$ ) (Ec. 1).



**Figura 15.** Síntesis enzimática de éster, reacción en la que se produce agua.

$$K_e = \frac{a_{\text{éster}} \times a_{\text{agua}}}{a_{\text{alcohol}} \times a_{\text{ácido}}} \quad (1)$$

El valor de esta constante de equilibrio es único para cada reacción, la cual es independiente del solvente en el cual se lleve a cabo la catálisis. Por otro lado, la representación matemática de la actividad termodinámica de cada compuesto está en función del producto entre la concentración molar y el coeficiente de actividad de ese producto (Ec. 2), por lo que al sustituir la ecuación 2 en la ecuación 1, da como resultado la expresión de la constante de equilibrio en función de la fracción molar de los componentes de la reacción por sus coeficientes de actividad (Ec. 3).

$$a_i = \gamma_i \times X_i \quad (2)$$

$$K_e = \frac{\gamma_{éster} \times \gamma_{agua}}{\gamma_{alcohol} \times \gamma_{ácido}} \times \frac{C_{éster} \times C_{agua}}{C_{alcohol} \times C_{ácido}} \quad (3)$$

Si bien la constante de equilibrio para cada reacción es independiente del solvente en el que se lleve a cabo la reacción, los coeficientes de actividad no lo son, de esta manera, la elección del medio de reacción apropiado para desplazar el equilibrio hacia la acumulación del producto deseado está en función de los coeficientes de actividad de las especies involucradas. En otras palabras la elección del solvente para cada reacción es un compromiso entre el coeficiente de actividad de los productos y su concentración o fracción molar. En particular, al disminuir el coeficiente de actividad del producto de interés, se incrementa la fracción molar del mismo manteniendo la actividad termodinámica requerida que cumpla con el valor de la constante de equilibrio. Por el contrario para un producto indeseado como el agua, lo que se requiere es la disminución en la fracción molar de la misma, por lo que para ello es necesario un aumento en su coeficiente de actividad o bien la eliminación de esta por los métodos antes descritos.

La enantioselectividad, ha sido una de las variables manipulables con el uso de solventes orgánicos. Cabe aclarar que esta manipulación no es el cambio de selectividad enantiomérica (de R a S o viceversa). De manera general, lo que se

ha logrado con el uso de distintos medios orgánicos es incrementar la enantioselectividad de las proteínas o bien, el exceso enantiomérico de la reacción (%ee\*) (de Castro M. S., et al. 1998; Hwang B. Y., et al. 2000; Kahlow U. H. M., et al. 2001; Ottosson J., et al. 2002).

Aunque la mayoría de los estudios utilizan solo un solvente, existen trabajos en los que se reporta que con la mezcla de solventes se han podido obtener polaridades que un solo solvente no ofrece. Con estas mezclas, se ha mejorado el control termodinámico de la reacción, y gracias a ello, la regioselectividad se ha manipulado con excelentes resultados (Bellot J. C., et al. 2001; Castillo E., et al. 2003; Rendon X., et al. 2001).

La quimioselectividad también ha sido materia de investigación en ésta área de la biocatálisis. Tal es el caso del trabajo de Duarte y col. en el que se demuestra que al manipular la hidrofobicidad del solvente se puede favorecer la síntesis de ésteres, en el caso de utilizar el n-hexano como medio de reacción, o bien de amidas, en el caso de 2-metil-2-butanol (Duarte D. R. 2002).

Gracias al surgimiento de una nueva clase de medios de reacción, los líquidos iónicos, las posibilidades en biosíntesis se abren aún más de las que se han explorado en solventes orgánicos tradicionales. En estos solventes, a pesar de ser altamente polares, las enzimas no se desactivan o desnaturalizan como en el caso de los solventes orgánicos polares. Esta nueva rama de la biocatálisis, ha permitido la síntesis de ésteres y amidas obteniendo buenos resultados en aspectos como la regioselectividad y enantioselectividad (Park S., et al. 2001), y se han alcanzado o incluso mejorado las velocidades de reacción como en el caso de alcoholisis y amoniólisis (Lau R. M., et al. 2000). Aunque falta mucho por elucidar de las características de estos líquidos iónicos y de las ventajas que aportan a la biocatálisis, los resultados que se han obtenido con ellos son muy alentadores.

---

\* El porcentaje del exceso enantiomérico (%ee) para una mezcla de los enantiómeros (+) y (-), en donde F(+) y F(-) es la fracción molar, está definido como  $[ F(+) - F(-) ] * 100$ , por lo que  $F(+) + F(-) = 1$  (IUPAC 1997).

#### 1.4. Síntesis de capsaicinoides por medio de lipasas.

Los capsaicinoides son moléculas de gran interés ya que han demostrado tener varias aplicaciones atractivas (Kobata K., et al. 1998a; Kobata K., et al. 1998b); sin embargo, el uso de estos compuestos es limitado debido a su efecto pungente y a la irritación que causa al contacto con la piel. Por lo anterior, la búsqueda de moléculas análogas que no tengan los efectos antes mencionados ha sido exhaustiva (Janusz J. M., et al. 1993) y dicha exploración ha encontrado como herramienta de apoyo a la biocatálisis, particularmente a las lipasas.

Se han sintetizado una gran variedad de compuestos análogos a la capsaicina por medio de las lipasas siguiendo distintas estrategias experimentales. En primera instancia se probó la síntesis de moléculas análogas a la capsaicina mediante la amidación de la vainillinamina con derivados de ácidos grasos y aceites naturales, utilizando un buffer de fosfatos como medio de reacción (Kobata K., et al. 1998a; Kobata K., et al. 1998b). En estos reportes, donde la lipasa de *Pseudomonas cepacia* (Lipase PS) y la lipasa B de *C. antarctica* mostraron el mejor desempeño, se obtuvieron conversiones pobres (45%-59%) después de 72 h de reacción. Otra aproximación en la síntesis de moléculas análogas a la capsaicina por medio de lipasas es mediante la transacilación de sustratos disponibles en la naturaleza (capsaicina y dihidrocapsaicina como donadores del anillo vainilloide, y ácidos grasos libres y aceites naturales como donadores del residuo acilo) en dos medio de reacción distintos, *n*-hexano (Kobata K., et al. 1999) y CO<sub>2</sub> supercrítico (Kobata K., et al. 2003); sin embargo, las conversiones obtenidas no son muy buenas (78% de conversión en *n*-hexano después de 144 h y 54% de conversión en CO<sub>2</sub> supercrítico al cabo de 72 h de iniciada la reacción).

Como se mencionó en el apartado anterior, tanto en la biocatálisis, como en la química orgánica, la elección del medio de reacción es una de las premisas más importantes ya que se ha demostrado que de él dependen factores tanto termodinámicos y cinéticos así como del propio biocatalizador (p.e. estabilidad de la enzima, actividad enzimática, eficiencia o conversión al equilibrio, enantio, regio y quimioselectividad, entre otras) (Irimescu R., et al. 2004; Klibanov A. M. 1997; Klibanov A. M. 2001; Rendon X., et al. 2001; Reyes-Duarte D., et al. 2002). En

este sentido, se ha demostrado que en la síntesis de ésteres a partir de un poliol la acumulación preferencial de mono, di o tri-ésteres está íntimamente relacionada con la naturaleza del solvente o mezcla de solventes (Bellot J. C., et al. 2001; Castillo E., et al. 2003; Klivanov A. M. 2001; Rendon X., et al. 2001).

Un ejemplo de lo anterior es el uso del 2-metil-2-butanol (2M2B) como medio de reacción para la síntesis de amidas, que está fundamentado principalmente en la alta solubilidad de los sustratos y del producto, lo cual repercute en la conversión al equilibrio. En particular, en la síntesis de la amida (olvanil) que parte de la vainillinamina y el ácido oleico, se demostró que al equilibrio, las conversiones obtenidas en 2M2B (98%) son mucho mayores que en *n*-hexano (60%). Los autores atribuyen esta diferencia en la conversión a la alta solubilidad del producto en 2M2B comparada con la del *n*-hexano, en otras palabras, la baja actividad termodinámica del producto en 2M2B favorece su acumulación al equilibrio (Reyes-Duarte D., et al. 2002). Por el contrario, en la síntesis del oleato de vainillilo (éster análogo al olvanil), al comparar la acumulación de producto en *n*-hexano (100%) contra la obtenida en 2M2B (75%), se observa que ésta se ve favorecida en el solvente hidrofóbico (Duarte D. R. 2002). Lo anterior nos da la pauta a suponer que en general, la síntesis de ésteres se favorece en solventes hidrofóbicos y la de amidas en solventes polares.

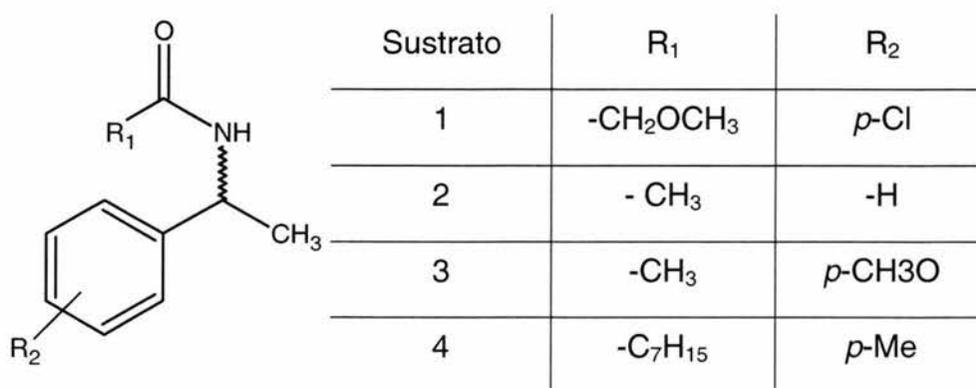
### **1.5. El uso de lipasas en la hidrólisis de amidas.**

Probablemente, por no ser sustratos naturales de las lipasas, la hidrólisis de amidas por medio de estas enzimas no ha sido estudiada en detalle; sin embargo, los pocos logros que se detallan a continuación, dan pie a suponer que encontrando las condiciones ideales la reacción puede llevarse a cabo.

Al igual que en la síntesis de amidas, el grupo acilo juega un papel muy importante ya que la formación del complejo acil-enzima debe ser favorecida por la presencia de cadenas hidrofóbicas que colaboran de manera importante el fenómeno de activación interfacial.

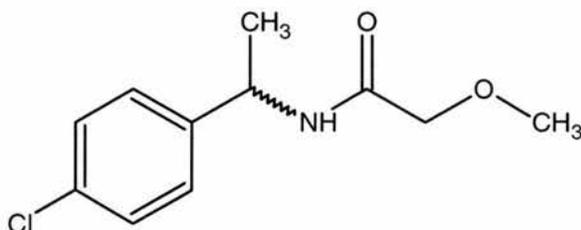
En este rubro, a pesar de que la investigación ha sido poca, resalta el trabajo de Henke y Bornscheuer (Henke E., et al. 2003) en el que someten a

hidrólisis varias amidas. De los resultados obtenidos, destaca una amida con cadena alifática de 8 carbonos que pudo ser hidrolizada por la lipasa B de *C. antarctica* en su forma comercial (Chirazyme L2). Cabe mencionar que los autores no exponen que la dificultad para efectuar la reacción de hidrólisis de las amidas se deba al tamaño de la cadena alifática, sin embargo, esta resulta ser la única diferencia estructural significativa que distingue a la amida hidrolizada de aquellas en las que no se observó reacción, estas últimas con cadenas alifáticas menores a 3 carbonos (Fig. 16).



**Figura 16.** Estructuras de amidas hidrolizadas por el grupo de Henke y col. de las cuales la amida 4 es la que se hidroliza mejor.

Aunado a lo anterior, Wagegg y col. (Wagegg T., et al. 1998) compararon la hidrólisis entre las amidas [1-(4-clorofenil)-etil]-2-acetamida y sus correspondientes metoxiacetamida y butírica (Fig. 17), concluyendo que el uso de un residuo metoxi incrementa la velocidad de hidrólisis probablemente por que 1) se altera el modo de unión con la lipasa, como lo muestra el modelado por computadora, 2) se incrementa la solubilidad de la amida o 3) este residuo causa una atracción de electrones del grupo carbonilo, lo que facilita la formación del complejo acil-enzima. En este mismo artículo, con el fin de aumentar la solubilidad de la amida en el medio de reacción y así aumentar la velocidad de hidrólisis, los autores reportan el uso de co-solventes, dentro de los que destacan hexano, diclorometano, TBME y diisopropil-eter, sin embargo, no se obtienen mejores resultados que los obtenidos utilizando buffer de fosfatos como medio de reacción.



**Figura 17.** Metoxiacetamida ópticamente activa.

Recientemente en nuestro grupo de investigación se logró la hidrólisis de la capsaicina. De dicho trabajo se concluye que además de la preferencia de la enzima por los grupos acilo de cadena larga (Cadena > 8C's), la pseudo-solubilización del sustrato y la formación de una bifase aceitosa favorecen el proceso de hidrólisis. En otras palabras la diferencia entre las velocidades iniciales obtenidas en un experimento hecho a 45 °C y otro a 70 °C, se deben a la fusión de la capsaicina (p.f. 65 °C), lo que aumenta la solubilidad del sustrato en el medio, además de formar una autentica bifase, promoviendo el mejor desempeño de la lipasa (Duarte D. R., et al. 2000).

### 1.6. Panorama global de los antecedentes.

Recapitulando los antecedentes podemos tener un panorama global del estado del arte en lo que refiere a la síntesis e hidrólisis de amidas por medio de lipasas.

Como se ha descrito, la síntesis de amidas por medio de lipasas se ha convertido en una herramienta poderosa en el área de la síntesis química. De los conocimientos más importantes que se han obtenido en la síntesis de amidas por medio de lipasas destaca la manipulación de la quimio, regio y enantioselectividad de dicha catálisis en función de la naturaleza del solvente. Por ejemplo, hablando en términos de quimioselectividad, se ha demostrado que la síntesis preferencial de amidas se lleva a cabo en solventes polares como el 2M2B y que en *n*-hexano se favorece la síntesis de ésteres. Otra premisa importante, si no es que la más

trascendental en términos de su atractiva aplicación tecnológica, es la manipulación enantioselectiva en la síntesis de amidas.

En la hidrólisis de amidas por medio de lipasas, a pesar de que son pocos los reportes, las contribuciones que se han hecho en este rubro, dan pie a suponer que todo es cuestión de encontrar factores que determinan la susceptibilidad de las amidas, así como las condiciones del medio de reacción que favorezcan esta catálisis.

En conjunto, la síntesis e hidrólisis enzimática de amidas como proceso, son una herramienta poderosísima por todas las ventajas que la biocatálisis ofrece como la quimio, regio y enantioselectividad además del uso de condiciones suaves. En particular, en la resolución de mezclas racémicas, debido a que los procesos de química orgánica constan de varias etapas además de no ser enantioselectivos, el desarrollo de una tecnología en la que se incorpore la resolución por síntesis aunada a la resolución por hidrólisis (easy on – easy off) sería de una trascendencia biotecnológica importante.

## 2. JUSTIFICACIÓN.

Los resultados que se han obtenido gracias a la manipulación de la termodinámica de las reacciones enzimáticas mediante el uso de solventes orgánicos de distinta naturaleza, aunados a los recientes conocimientos adquiridos de la íntima relación que existe entre la estructura y función de las enzimas, han hecho que la biocatálisis amplíe su área de aplicación como herramienta tecnológica.

En particular, dentro del amplio número de enzimas existentes, se ha demostrado que las lipasas son muy versátiles, estables en solventes orgánicos y tienen una relajada especificidad lo que ha permitido llevar a cabo reacciones de una amplia gama de sustratos. En este mismo sentido, dentro de las características más importantes de las lipasas, destaca su alta enantio, quimio y regioselectividad, lo que permite su aplicación en procesos de química fina.

Quizá por ser los sustratos naturales de las lipasas, la síntesis e hidrólisis de ésteres por medio de estas enzimas han sido ampliamente estudiadas y los resultados se han extrapolado a reacciones tales como: tiólisis, interesterificación, alcoholólisis, acidólisis, entre otras. A principio de los 90, se encontraron aplicaciones de las lipasas en la síntesis de amidas y muchos de los conocimientos adquiridos hasta ese entonces en la síntesis de estères fueron aplicados. El objetivo principal del presente trabajo es determinar el efecto del solvente y de la naturaleza de los sustratos tanto en la velocidad de reacción así como en la conversión al equilibrio.

Por otro lado, a pesar de la versatilidad de las lipasas en términos de las múltiples reacciones que pueden llevar a cabo, son pocos los reportes que existen en cuanto a la hidrólisis de amidas y se ha aceptado que estas enzimas tienen poca o nula actividad amidasa. A pesar de ello, en función de los resultados obtenidos a partir de la hidrólisis de la capsaicina, en nuestro grupo de investigación creemos que esta idea generalizada es errónea. Por ello, se decidió estudiar en detalle, tomando como base a la molécula de la capsaicina, las

características estructurales de amidas susceptibles a hidrólisis por medio de lipasas, así como las condiciones del medio que favorecen la reacción.

En conjunto, la síntesis e hidrólisis de amidas por medio de lipasas podría convertirse en una herramienta de aplicación biotecnológica interesante, que en principio contribuiría en procesos de resolución de mezclas de aminas ópticamente activas mediante la acilación y desacilación enantioselectiva de las mismas.

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.**

#### **3.1. Hipótesis.**

La hidrólisis de amidas por medio de lipasas está íntimamente relacionada con las propiedades estructurales del sustrato y las condiciones del medio de reacción.

#### **3.2. Objetivo general.**

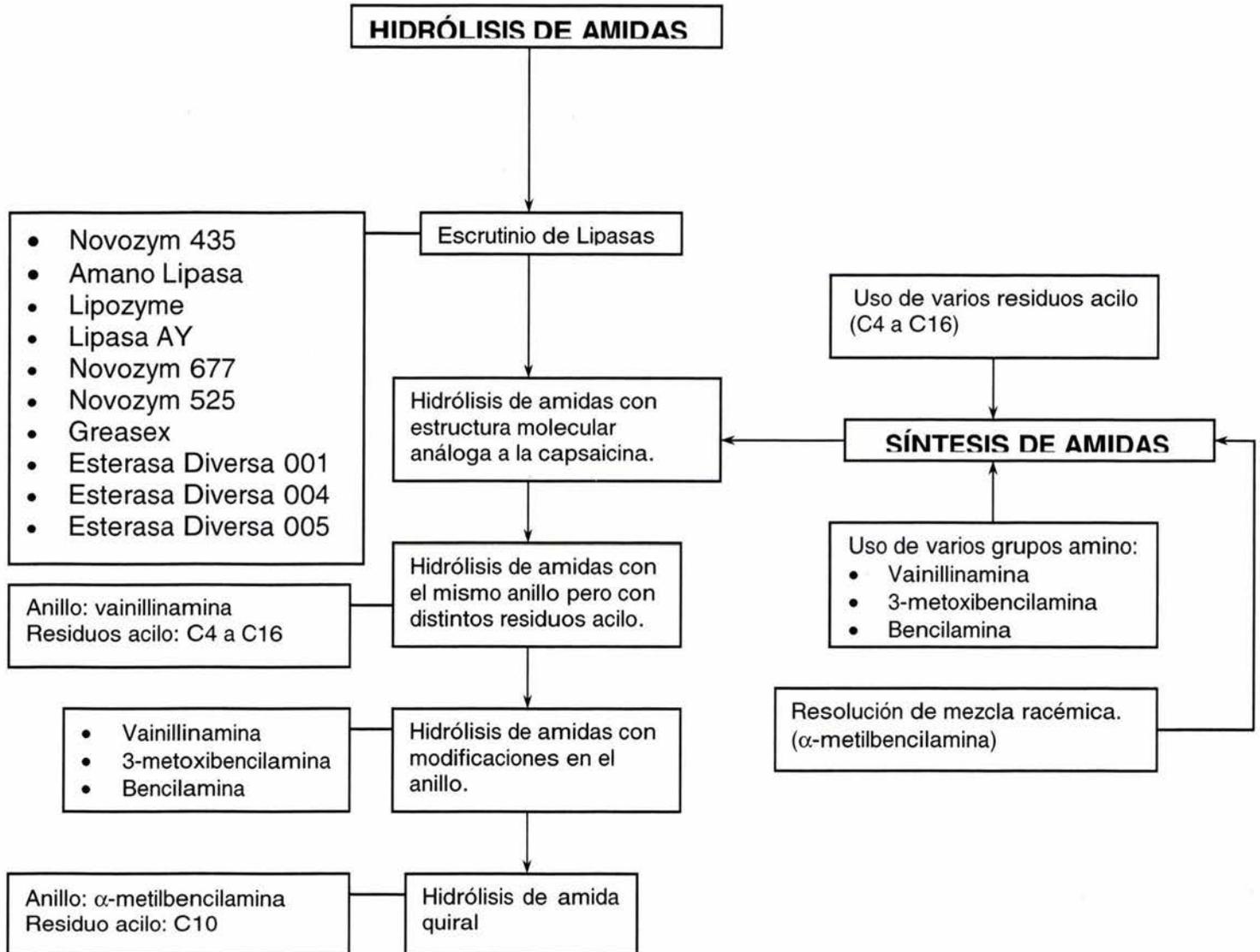
Estudiar a detalle los parámetros que determinan la hidrólisis de amidas por medio de lipasas.

#### **3.3. Objetivos particulares.**

1. Realizar un escrutinio de lipasas capaces de llevar a cabo la hidrólisis de la capsaicina.
2. Analizar las propiedades estructurales del sustrato que favorecen la hidrólisis de amidas por medio de lipasas.
  - Naturaleza y longitud del residuo acilo.
  - Influencia de los sustituyentes del anillo vainilloide.
3. Establecer las condiciones del medio de reacción que favorecen la hidrólisis de amidas por medio de lipasas.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 4.1. Estrategia experimental.



## 4.2. Materiales.

El metanol (99%) y 2-metil-2-butanol (2M2B, 99.7%) se obtuvieron de J.T. Baker (Edo. de México, México). Los compuestos, clorhidrato de vainillina (sal Vainillina-HCl, 98%), 3-metoxibencilamina (98%),  $\alpha$ -metilbencilamina (99%), ácido decanoico (99%), etil butirato (99%), etil caprilato (99%) y el tamiz molecular (8-12 mesh) se adquirieron de Aldrich (WI, USA), la capsaicina (98% y 60%), los ácidos, oleico (98%), mirístico (99-100%), láurico (99%), palmítico (99%), el metil caproato (99%), la N,N-diisopropiletilamina (DIPEA, 99%) y bencilamina (99%) de Sigma Chemical Co. (MO, USA). Las enzimas Greasex, Lipozyme, Novozym 435, Novozym 677 BG y Novozym 525, se obtuvieron de Novozymes A/C (México); Lipase F y Lipase AY de Amano (VA, USA); Esterasa 001, 004 y 005 de Diversa (USA). Las placas ALUGRAM SIL G/UV<sub>254</sub> para TLC marca MACHEREY-NAGEL se obtuvieron de TECROM (D.F., México).

## 4.3. Cuantificación de las aminas.

### 4.3.1. Tratamientos previos.

Para las reacciones de síntesis y de hidrólisis, antes de analizar la muestra por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es necesario centrifugarla para inyectar solo el sobrenadante. Con este tratamiento previo precipitan partículas tanto del tamiz molecular (solo presente en reacciones de síntesis), como de soporte de la enzima (presente en ambas reacciones), provenientes de la desintegración de las perlas a causa de la agitación.

En el caso de analizar la muestra solo con fines cualitativos por cromatografía de capa fina (TLC), no es necesario ningún tratamiento previo.

#### 4.3.2. Análisis cualitativo (TLC).

Para el análisis por capa fina de las reacciones de hidrólisis de capsaicina destacan las siguientes características:

- Fase móvil: acetonitrilo/agua al 1% ácido acético (40:60) v/v.
- Placas: ALUGRAM SIL G/UV254. Sílica Gel 60 de 10 x 10 cm, y espesor de 0.25 mm.
- Revelador de vainillinamina: Ninhidrina. Presenta un color amarillento, tal como ocurre con el imino ácido prolina (Hames B. D., et al. 1997).
- Revelador de ácidos grasos insaturados (8-metil-6-nonanoico) y capsaicinoides: Revelador azul de cobre (acetato de cobre 285 mM / ácido fosfórico al 85% 50:50 v/v).

Los valores de frente relativo ( $R_f$ ) se presentan en la tabla 4.

**Tabla 4.** Valor  $R_f$  de vainillinamina y capsaicina.

Compuesto	$R_f$
Capsaicina	$0.52 \pm 0.03$
Vainillinamina	$0.82 \pm 0.05$

#### 4.3.3. Análisis cuantitativo (HPLC).

Para este análisis se utilizó un equipo de cromatografía Waters con detector de arreglo de diodos (PDA, Photo Diode Array), haciendo un barrido de longitudes de onda de 195 a 300 nm, con una resolución de 1.2. Las reacciones de síntesis y las de hidrólisis se cuantificaron por medio de la desaparición o aparición de la amina, respectivamente. Las longitudes de onda a la cual se detectaron las aminas son las siguientes: la vainillinamina se detectó a 280, 230 o 202 nm, la bencilamina a 254 nm o 206, la  $\alpha$ -metilbencilamina a 256 nm o 206 y la 3-

metoxibencilamina a 275 o 200, la detección a las distintas longitudes de onda depende de la concentración de la muestra. Las columnas cromatográficas utilizadas fueron: Spherisorb 80-5 ODS-2 (4.6 x 250 mm) para la vainillinamina y  $\alpha$ -metilbencilamina; Supelcosil C18 (3.9 x 300 mm) para la bencilamina y Waters Spherisorb ODS-2 5  $\mu$ m para la 3-metoxibencilamina. Todas requieren precolumna.

Tanto las condiciones para revelar las aminas, como los tiempos de retención se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5.** Condiciones y tiempos de retención de las aminas para el análisis en HPLC. Tr es el tiempo de retención (min), F el flujo de la fase (ml/min), la cantidad de los solventes es porcentual (%) y D es la longitud de onda (nm) de detección.

Amina	Tr	F	MetOH	CH <sub>3</sub> CN	H <sub>2</sub> O	D
Vainillinamina	3.5 $\pm$ 0.3	1	50	0	50	280, 230, 202
3-metoxibencilamina	4.01 $\pm$ 0.1	1	0	70	30	275, 200
Bencilamina	5.00 $\pm$ 0.01	1	85	0	15	254, 206
$\alpha$ -metilbencilamina	5.2 $\pm$ 0.2	1	50	0	50	256, 206

#### 4.4. Metodología para la síntesis de amidas.

Todas las reacciones de síntesis se hicieron a 45 °C con la lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada, Novozym 435 (20 mg/ml), en viales de 7 ml con 5 ml de volumen de reacción, a una concentración equimolar de sustratos de 20 mM. El solvente utilizado fue 2-metil-2-butanol (2M2B) previamente deshidratado con tamiz molecular. En la síntesis de aquellas amidas que parten del clorhidrato de vainillinamina hubo necesidad de liberar la amina en primera instancia, para después añadir el segundo sustrato (donador de acilo) y la enzima. En la síntesis de las bencilamidas,  $\alpha$ -metilbencilamida y 3-metoxibencilamidas no hubo necesidad de la preliberación de la amina, por ello, los sustratos y la enzima se agregaron simultáneamente. Con el propósito de controlar la actividad de agua, en el medio de reacción se agregan 100 mg de tamiz molecular. Como donadores de

acilo se utilizaron los ácidos grasos libres palmítico (C16), mirístico (C14), oleico (C18:1), cáprico (C10) y laúrico (C12); y en su presentación como ésteres se dispuso del etil caprilato (C8) y butirato (C4), así como del metil caproato (C6).

#### 4.4.1. Liberación del clorhidrato de vainillinamina (Van-HCl).

El efecto de la concentración de amina terciaria (DIPEA) y de la vainillinamina en forma de sal (Van-HCl) es un parámetro que ya había sido reportado en un proyecto anterior a este. En él se estableció que la relación DIPEA/Van-HCl óptima es 18:1, también se encontró que con un tiempo mínimo de 30 minutos de incubación se logra un aumento en la velocidad inicial de síntesis. Tiempos de preincubación mayores no tienen ningún efecto ya que la velocidad inicial de síntesis permanece constante (Fig. 18) (Reyes-Duarte D., et al. 2002).

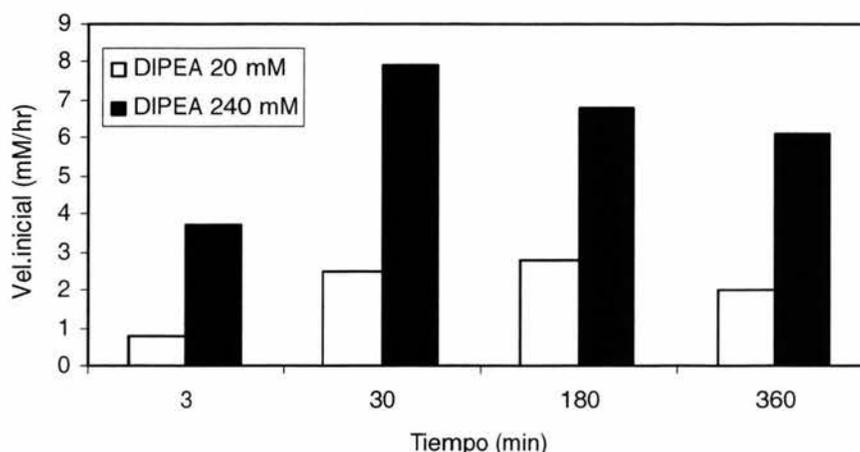


Figura 18. Relación DIPEA / Van-HCl y tiempo de preincubación óptimos.

#### 4.5. Método de purificación.

En lo que concierne a la recuperación de los productos se desarrolló un método de purificación que consta de cuatro etapas. El primer paso es la precipitación de la enzima y el tamiz molecular por medio de una centrifugación en frío (12 °C a 10,000 rpm por 12 min), seguida de la evaporación del solvente (2M2B) en un rotavapor Büchi 461 (85 °C, 100 rpm, -60 Pa). Una vez evaporado todo el solvente, prosigue la disolución del ácido graso en hexano, dicho solvente no disuelve la amida y amina residual, esta etapa del proceso consta de 3

repeticiones. Para separar la amida de la amina residual, recurrimos a la alta solubilidad de las aminas en agua y la baja o nula solubilidad de las amidas en este medio, esta fase del proceso también se compone de 3 repeticiones.

#### **4.6. Metodología para la hidrólisis de amidas.**

##### **4.6.1. Escrutinio de enzimas hidrolíticas.**

Para este ensayo se probaron varias lipasas disponibles en el laboratorio a una relación de 6mg/ml, Novozym 435 (lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada), Novozym 525 (lipasa B de *C. antarctica* en solución), Lipasa F (*Rhizopus oryzae*), Lipozyme (*M. miehei*), Lipasa AY (*C. rugosa*), Novozym 677 (*Thermomyces lanuginosa*), Greasex (proteína recombinante), Esterasa Diversa 001, 004 y 005 (esterasas obtenidas de una librería de enzimas recombinantes). En él se utilizó a la capsaicina como sustrato a una concentración de 1.2 mg/ml, en viales de 7 ml con un volumen de reacción de 5 ml, utilizando como medio de reacción agua desionizada. Ésta búsqueda de enzimas capaces de hidrolizar a la capsaicina se llevó a cabo a una temperatura de 70°C.

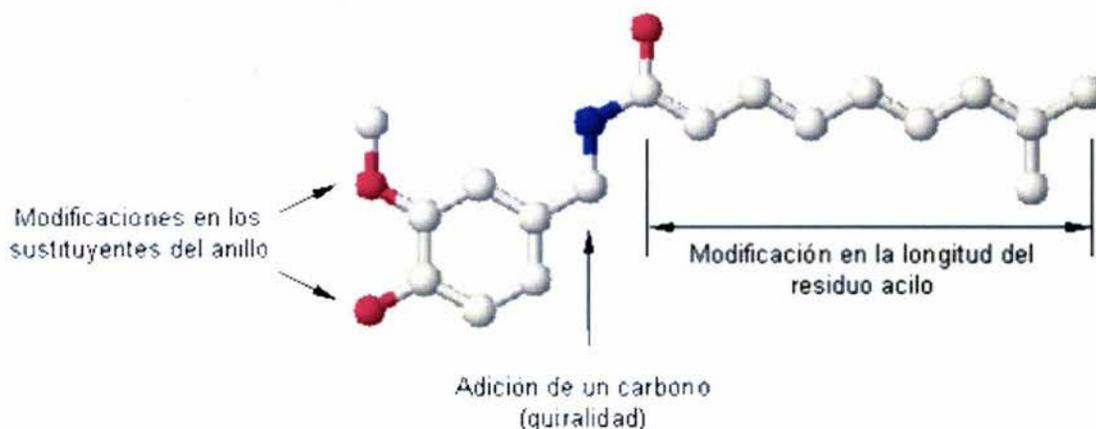
##### **4.6.2. Análisis de las propiedades estructurales del sustrato.**

Una vez identificada la lipasa con la que se decidió trabajar, se llevaron a cabo reacciones de hidrólisis de compuestos con diferencias estructurales. Estas reacciones se llevaron a cabo en agua desionizada, en donde la concentración de enzima fue de 6 mg/ml y en todos los casos se utilizaron viales de 7 ml con 5 ml de volumen de reacción. La concentración de los sustratos (0.1 mM a 4 mM) y la temperatura (45 °C ó 70 °C) variaron dependiendo de lo que se quería comprobar.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1. Síntesis de amidas por medio de lipasas.

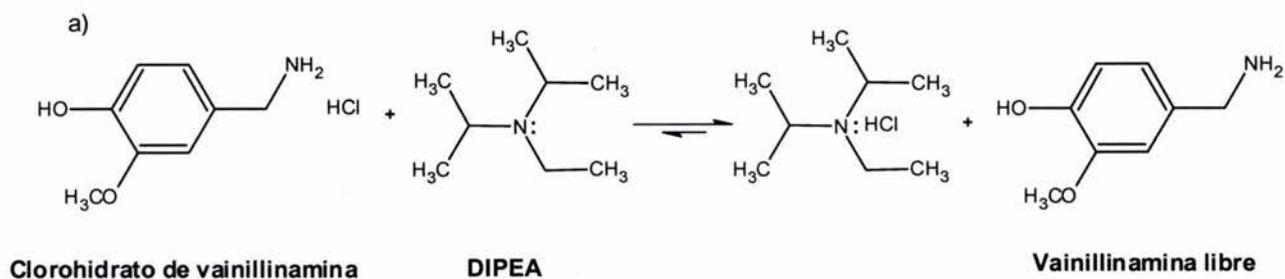
Tomando como molécula modelo a la capsaicina, se sintetizaron diferentes tipos de amidas en las que se varió tanto la cadena hidrofóbica, como los sustituyentes del anillo (Fig. 19).



**Figura 19.** Sitios de las modificaciones hechas basadas en la estructura molecular de la capsaicina.

#### 5.1.1. Síntesis de vainillinamidas.

En la figura 20 se esquematiza la reacción de síntesis de las vainillinamidas.



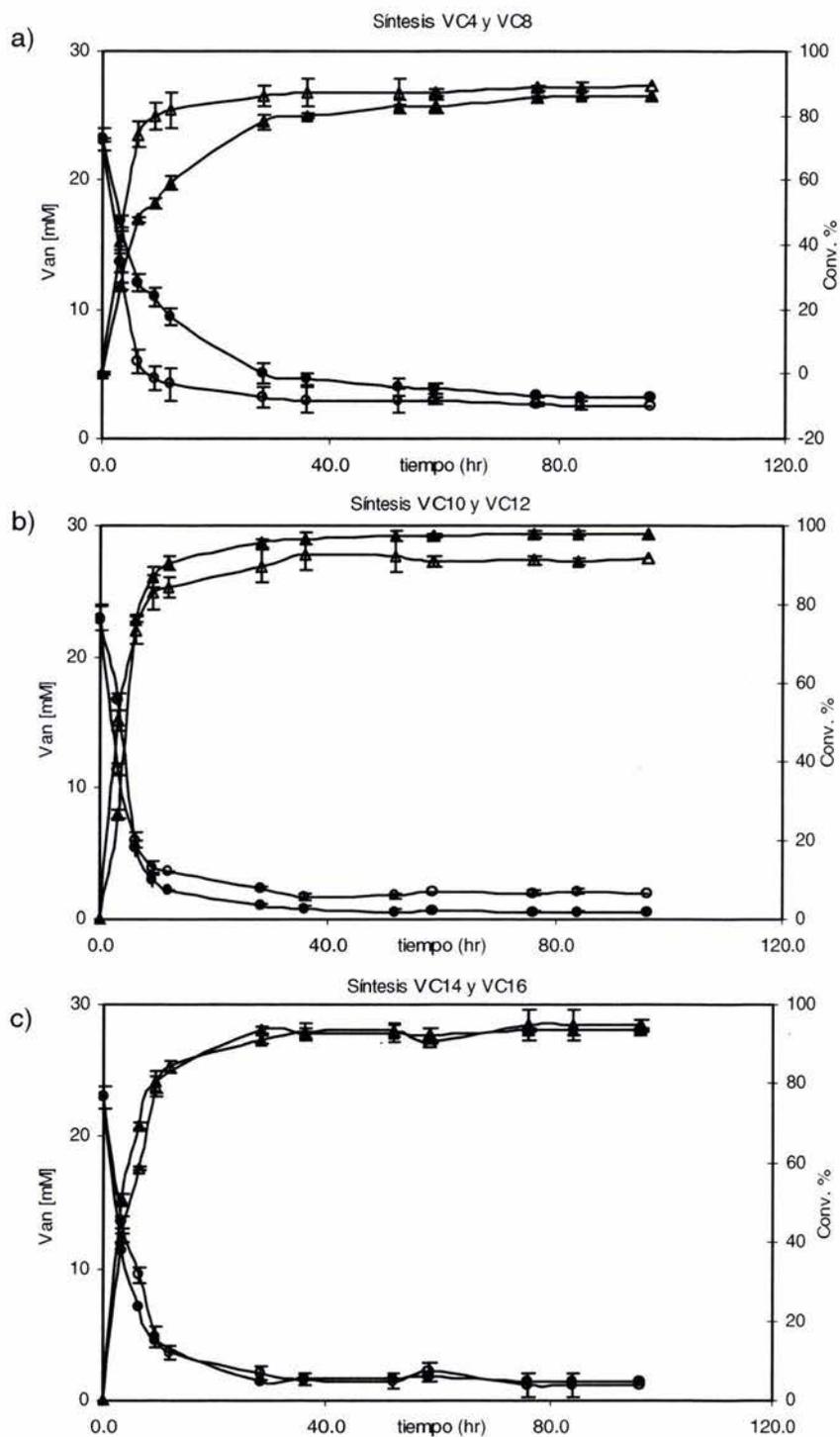


**Figura 20.** a) tratamiento de la amina protegida con el fin de liberarla de su forma de clorhidrato, b) la condensación enzimática de la amina liberada con el ácido graso.

La síntesis de estos nuevos capsaicinoides se llevó a cabo a 45 °C, en 2M2B debido a que en este solvente el producto muestra una alta solubilidad y por ende una baja actividad termodinámica, lo que favorece su acumulación en el medio. Se utilizó una concentración equimolar de sustratos igual a 20 mM. Cabe aclarar que la naturaleza del donador de acilo no es la misma en todos los casos. Para las amidas de cadena hidrofóbica con número de carbonos de 16 a 10 se partió de ácidos grasos libres, y para aquellas amidas con residuo acilo de 8 a 4 se partió de ésteres; metil éster para el caso de C6 y etil ésteres para el caso de C8 y C4. La lipasa utilizada fue la lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada (Novozym 435) a una concentración de 20 mg/ml.

La condensación del ácido con la vainillina se puede dividir en dos etapas, la primera consiste en la desprotección de la sal, Van-HCl, por medio de una amina terciaria, DIPEA (Fig. 20 a). Es preciso recordar que tanto la relación DIPEA/Van-HCl (18:1), como el tiempo de preincubación (30 min) para la liberación del clorhidrato han sido previamente detallados (Fig. 18) (Duarte D. R. 2002).

Como se puede observar en la figura 21, a las 28 horas de transcurrida la reacción se obtienen conversiones cercanas al 90% para todos los casos, salvo para aquellas amidas que parten de un éster (C<sub>4</sub> y C<sub>8</sub>), en las que se obtienen conversiones de 78% y 86% respectivamente al cabo del mismo tiempo de transcurrida la reacción. Las reacciones se llevaron hasta las 96 h y como se muestra en la tabla 6, al cabo de este tiempo el porcentaje de conversión máxima fue de 95% en todos los casos.



**Figura 21.** Cinéticas de síntesis de nuevos capsaicinoides (% de conversión ▲,△ y vainillinamina consumida ○,●). a) Síntesis de amida con residuo acilo de 4C's, símbolos cerrados y 8C's abiertos C8, b) 10C's símbolos cerrados y 12C's abiertos y c) 14C's símbolos cerrados y 16C's abiertos. Para todas la cinéticas n = 3.

**Tabla 6.** Porcentaje de conversión de las vainillinamidas empleando diferentes ácidos grasos.

Tiempo			
28 h		96.5 h	
Amida	Conv. (%)	Amida	Conv. (%)
C4	78.04 ± 0.92	C4	86.07 ± 0.51
C8	86.21 ± 0.63	C8	89.14 ± 0.47
C10	95.51 ± 0.46	C10	97.88 ± 0.32
C12	89.73 ± 0.84	C12	91.71 ± 0.15
C14	93.55 ± 0.76	C14	93.55 ± 0.23
C16	91.09 ± 0.39	C16	94.99 ± 0.04

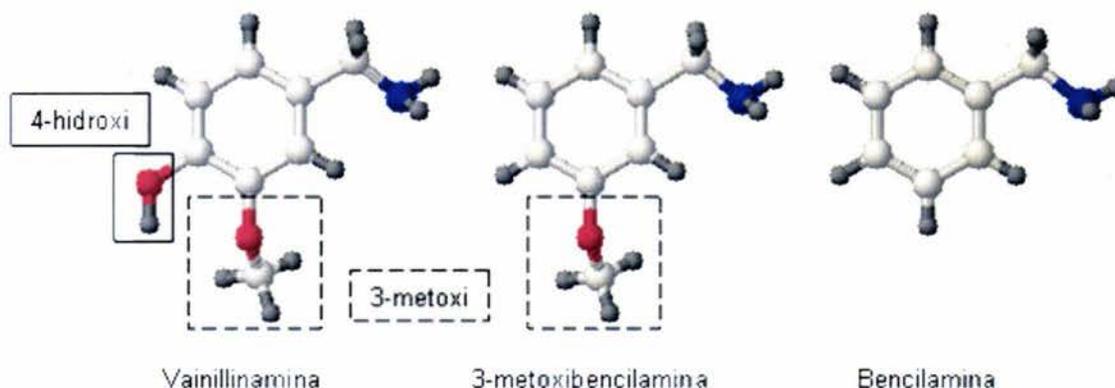
A pesar de que se ha reportado un mejor rendimiento en las reacciones de síntesis de amidas con lipasas usando metil y etil ésteres como donadores de acilo activados (Gotor V. 1999), en nuestro caso observamos el fenómeno inverso; es decir, al comparar las síntesis de las amidas que parten de un éster contra aquellas que parten de un ácido graso libre, las primeras alcanzan menor conversión al equilibrio.

Por otro lado, con los resultados obtenidos hasta este punto, comprobamos que el sistema propuesto por Duarte y col. (Duarte D. R. 2002) (medio de reacción, temperatura, tiempo de preincubación, relación DIPEA/Van-HCl, enzima, tamiz molecular), es muy conveniente para la síntesis de vainillinamidas, dado que los coeficientes de actividad termodinámica de las amidas en 2M2B, favorecen el desplazamiento del equilibrio hacia la acumulación de las mismas, todo ello, con el debido control de la actividad termodinámica del agua.

### 5.1.2. Síntesis de bencilamidas y 3-metoxibencilamidas.

Al observar que en la síntesis de los nuevos capsaicinoides se obtienen conversiones por arriba del 90%, sin importar la naturaleza del residuo acilo (Fig. 21) y con el objetivo de estudiar los factores que favorecen la síntesis de amidas

análogas a la capsaicina, se probó la capacidad del sistema en la síntesis de amidas con modificaciones en el anillo vainilloide. Para ello se recurrió a una amina mono-sustituída (3-metoxibencilamina) y otra sin sustituyentes (bencilamina) (Fig. 22). En la síntesis de estas amidas no es necesaria la liberación de la amina ya que estas no vienen protegidas en su forma comercial.



**Figura 22.** Modificaciones de las aminas utilizadas.

Al igual que las amidas que parten de la vainillinamina, la síntesis de las amidas condensadas a partir de la bencilamina y de la 3-metoxibencilamina, resultan en conversiones por arriba del 90% (Tabla 7 y 8).

**Tabla 7.** Conversiones de las bencilamidas con diversos ácidos grasos.

<b>Tiempo</b>			
<b>17.5 h</b>		<b>72.5 h.</b>	
Amida	Conv. %	Amida	Conv. %
C4	88.6 ± 0.38	C4	91.5 ± 0.06
C6	88.5 ± 0.17	C6	95.5 ± 0.08
C8	80.0 ± 0.28	C8	93.1 ± 0.32
C10	91.3 ± 0.02	C10	95.2 ± 0.16
C12	90.8 ± 0.41	C12	95.3 ± 0.26

**Tabla 8.** Conversión de las 3-metoxibencilamidas con distintos residuos acilo.

<b>Tiempo</b>			
<b>23 h</b>		<b>70.7 h</b>	
Amida	Conv. %	Amida	Conv. %
C6	94.9 ± 0.20	C6	95.0 ± 0.46
C8	93.7 ± 0.50	C8	94.1 ± 0.07
C10	94.0 ± 0.41	C10	95.2 ± 0.92
C12	89.1 ± 2.79	C12	96.3 ± 0.21

Al igual que lo observado en la síntesis de las vainillinamidas, la conversión al equilibrio es independiente de la naturaleza del residuo acilo y de modificaciones en el anillo, lo cual se deduce de las altas conversiones obtenidas.

Con el fin de elucidar cual es el factor que determina el alto rendimiento en la síntesis de este tipo de amidas, en un proyecto paralelo a este, se compararon las conversiones de la condensación del residuo acilo de 10C's con vainillinamina y bencilamina en *n*-hexano y 2M2B. De dicho experimento se obtuvieron tres observaciones:

- La solubilidad de las aminas en *n*-hexano es muy pobre.
- Las conversiones alcanzadas en *n*-hexano son, por mucho, menores a las obtenidas en 2M2B.
- Las bajas conversiones obtenidas en *n*-hexano pueden deberse a un efecto sinérgico entre la escasa solubilidad de las aminas, lo que dificulta su disponibilidad para la enzima y la baja solubilidad de las amidas, lo que conlleva a aumentar su actividad termodinámica y en consecuencia a disminuir su acumulación en el medio.

Con lo anterior, por un lado, comprobamos las observaciones reportadas (Reyes-Duarte D., et al. 2002), en donde se describe que la acumulación de este tipo de amidas (anillo-residuo acilo) se ve favorecida en el solvente de naturaleza

polar (2M2B). Por otro lado, estas observaciones nos hacen suponer que la diferencia entre las conversiones al equilibrio en 2M2B comparadas con las obtenidas en *n*-hexano, no solo está en función del coeficiente de actividad termodinámica de la amida, sino que puede ser un efecto sinérgico entre la solubilidad de los sustratos y productos. En otras palabras, al ser la actividad termodinámica un reflejo de la disponibilidad de un compuesto en cierto solvente, la baja disponibilidad (solubilidad) de las aminas en *n*-hexano limita su utilización en la reacción enzimática. Por otro lado, de acuerdo a la ecuación 3, la máxima acumulación de un producto en el medio de reacción se logra cuando se tienen los coeficientes de actividad termodinámica más bajos, cosa que no sucede para las amidas en el sistema *n*-hexano. De hecho, en este medio de reacción, la baja solubilidad de estas moléculas refleja su alta disponibilidad, entendida como un valor alto de  $\gamma_i$ .

### 5.1.3. Síntesis de la $\alpha$ -metilbencilamida.

Al haber comprobado que a las condiciones de síntesis probadas se obtienen muy buenos rendimientos, se decidió estudiar la capacidad del sistema en la resolución de mezclas racémicas, y para ello recurrimos a la condensación del ácido cáprico con la  $\alpha$ -metilbencilamina (Fig. 23), de la cual se obtuvieron  $44.6 \pm 2.45$  y  $46 \pm 2.00$  % de conversión al cabo de 80 y 92 h respectivamente.

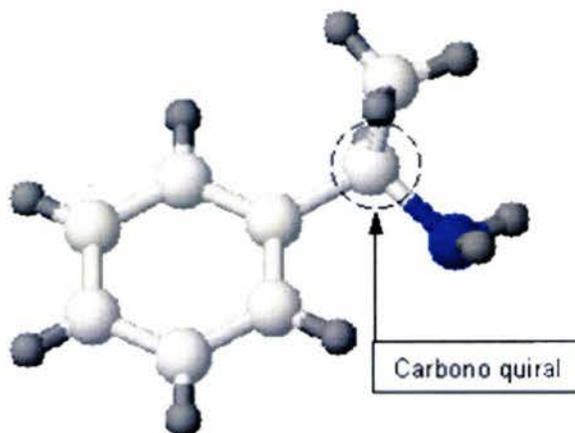


Figura 23. Amina quiral,  $\alpha$ -metilbencilamina.

Estas conversiones nos hacen suponer que la lipasa es capaz de resolver la mezcla racémica. En otras palabras, al obtener solo el 46% de conversión al equilibrio después de 92 horas, inferimos que la lipasa reconoce mayoritariamente un enantiómero (R ó S). La deducción anterior se apoya en las conversiones similares obtenidas en las síntesis de las otras amidas (vainillinamidas, bencilamidas y 3-metoxibencilamidas), en donde las conversiones por arriba del 95% después de 76 horas, equivalen a las conversiones obtenidas para un solo enantiómero. De manera particular, como en este caso, para aquellos productos obtenidos a partir del residuo acilo de 10C's de longitud.

## 5.2. Análisis comparativo de la síntesis de amidas.

La mayor parte de los trabajos que hay en síntesis de amidas centran su atención en la naturaleza del grupo acilo y son pocos en los que se hace un estudio global en donde se reconozca la importancia de los sustituyentes o naturaleza química del agente nucleofílico.

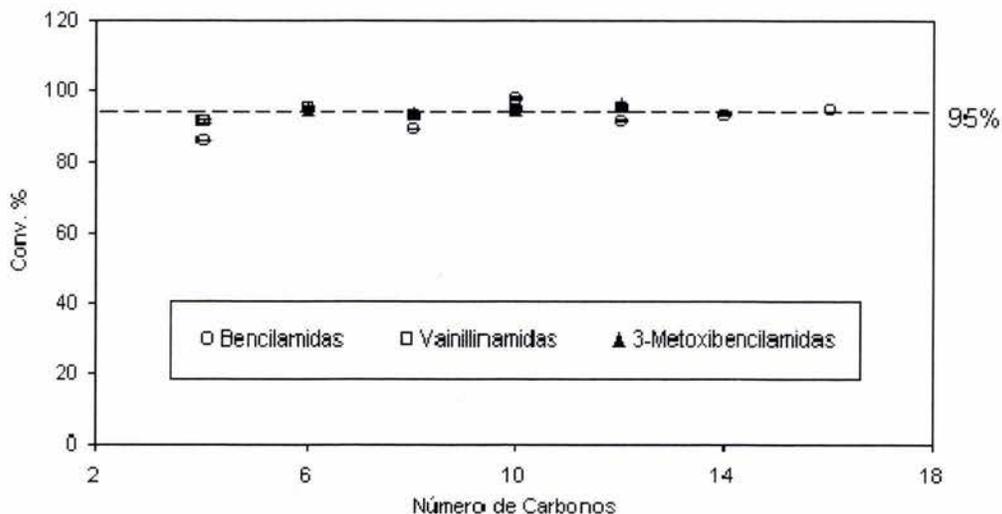
En las reacciones de síntesis aquí estudiadas destacan las excelentes conversiones alcanzadas así como el poco tiempo que se requiere para alcanzar el equilibrio. Esto permite deducir que el efecto que tiene el medio de reacción es significativamente más intenso que el efecto de la naturaleza de los sustratos que intervienen en el proceso.

Al comparar el coeficiente de partición de las aminas ( $\log P$  o bien "hidrofilicidad") podemos observar que existen diferencias significativas entre ellas (vainillinamina  $\log P = 0.06^*$ , 3-metoxibencilamina  $\log P = 1.0^*$ , bencilamina  $\log P = 1.09$  (Sangster J. 1989)). Como se ha comentado con anterioridad, en la síntesis enzimática, la solubilidad de los componentes de la reacción en el medio es un factor determinante en la conversión al equilibrio, sin embargo, a pesar de existir una diferencia en los coeficientes de partición ( $\log P$ ) en el solvente utilizado

---

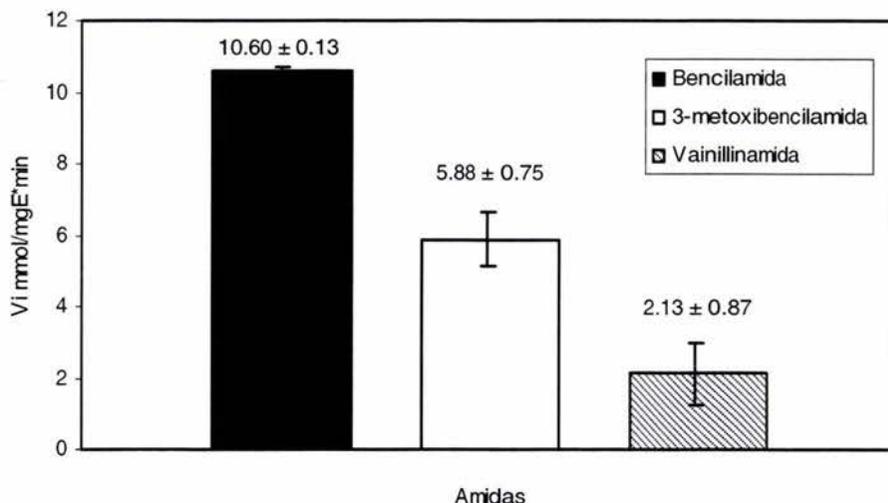
\* Valores calculados con el programa ACD Labs.

(2M2B), no hay correlación de éste coeficiente con las conversiones al equilibrio (Fig. 24).



**Figura 24.** Efecto del residuo acilo en las conversiones al equilibrio en la síntesis de amidas. Para todas la síntesis  $n = 3$ .

En términos de velocidad inicial, el pKa de las aminas se puede correlacionar con el poder nucleofílico del compuesto, es decir, a menor pKb o mayor pKa, el poder nucleofílico es mayor y a mayor poder nucleofílico, la velocidad inicial de síntesis supone debe ser mayor. Al comparar los pKa's de las aminas (vainillinamina pKa1 = 10.16\*, 3-metoxibencilamina pKa1 = 9.63\*, bencilamina pKa1 = 9.5\*), observamos que presentan una correlación no lineal con las velocidades iniciales de síntesis como se muestra en la figura 25.



**Figura 25.** Velocidades iniciales de la síntesis de las aminas con el residuo acilo de 8C's. Todas las reacciones se hicieron por triplicado.

La correlación entre la velocidad inicial de síntesis y el poder nucleofílico de los sustratos es un tema en el que hay controversia. Por un lado está el grupo de Kawamoto y col. (Kawamoto T., et al. 1999), que afirman la existencia de una correlación directa entre el poder nucleofílico del sustrato y la velocidad inicial de síntesis de amidas con lipasas. En contraposición está el grupo de Öhrner y col. (Öhrner N., et al. 1996), que al comparar entre la velocidad inicial de síntesis enzimática de amidas, tioésteres y ésteres no encuentran dependencia con el poder nucleofílico de los sustratos. En este mismo sentido, el análisis comparativo entre las velocidades de síntesis y los pKa's de nuestros sustratos apoya lo reportado por Öhrner y col., en donde, contrario a la química orgánica, la velocidad inicial de síntesis no está en función del poder nucleofílico del sustrato o aceptor de acilo. Incluso, la velocidad inicial de síntesis es indirectamente proporcional al pKa de las aminas, por lo que al parecer, son los impedimentos estéricos entre los sustituyentes del anillo los que dificultan la catálisis y provocan una disminución en las velocidades iniciales de síntesis.

Tanto en las conversiones al equilibrio como en las velocidades iniciales de síntesis, al comparar la naturaleza del residuo acilo observamos que entre todas las longitudes de cadena probadas no hay mayor diferencia, salvo para aquella

amida que parte del etil butirato, el cual, por ser un sustrato con una cadena alifática tan pequeña, no es un sustrato adecuado para las lipasas.

### 5.3. Hidrólisis de amidas por medio de lipasas.

#### 5.3.1. Escrutinio de lipasas.

Este ensayo se llevó a cabo con las siguientes lipasas: Novozym 435, Amano Lipasa, Lipozyme, Lipasa AY, Novozym 677, Novozym 525, Greasex, Esterasa Diversa 001, 004 y 005. Las lipasas, a diferencia de otras enzimas, llevan a cabo la catálisis de manera preferencial en la bifase formada por el sustrato y el medio de reacción (Pleiss J., et al. 2000). Por ello, este ensayo se llevó a cabo en agua a una temperatura de 70 °C, a la cual el sustrato utilizado (capsaicina) se funde (p.f. 65 °C), formando así una bifase líquido-líquido con el medio.

El análisis cualitativo de este ensayo se llevó a cabo en TLC y de todas las lipasas probadas, la lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada, Novozym 435, fue la que presentó mayor conversión al término de la reacción. Cabe mencionar que la misma lipasa en solución, Novozym 525, también hidrolizó a la capsaicina, pero en menor proporción (Tabla 9).

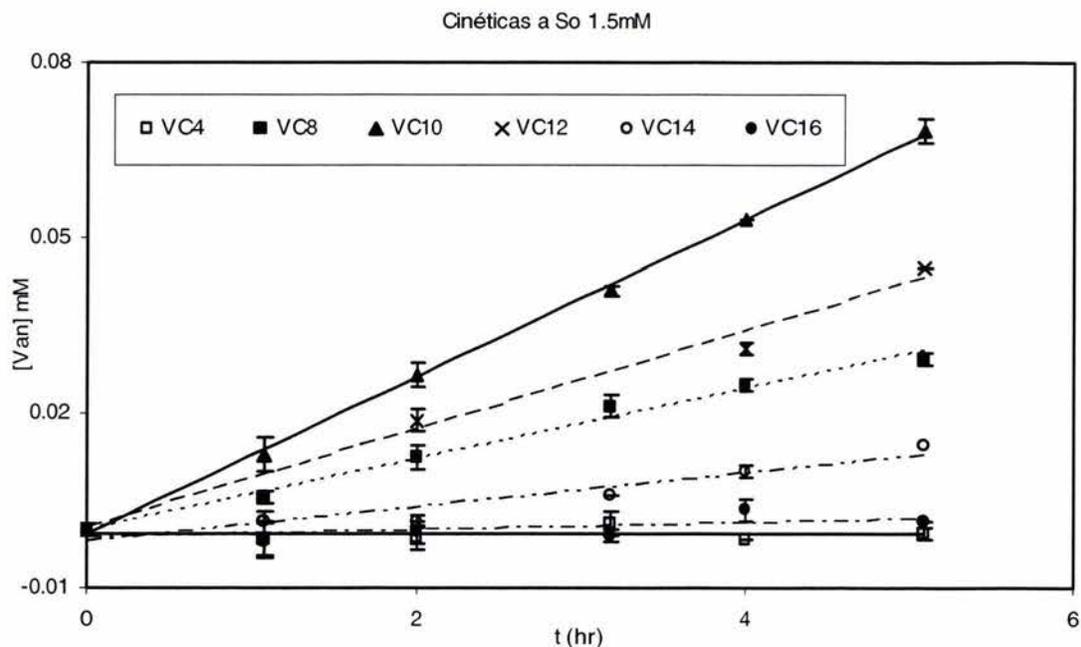
A partir de este resultado, decidimos continuar los ensayos de hidrólisis posteriores con la lipasa Novozym 435.

**Tabla 9.** Enzimas capaces de hidrolizar a la capsaicina. Con el símbolo (+) se denota aquellas que si llevaron a cabo la catálisis y por el contrario, con el símbolo (-), aquellas que no lo hicieron.

LIPASA	HID.	LIPASA	HID.	LIPASA	HID.
Novozym 435	+	Lipasa AY	-	Greasex	-
Amano Lipasa	-	Novozym 677	-	E. Diversa 1, 4 y 5	-
Lipozyme	-	Novozym 525	+		

### 5.3.2. Efecto de la cadena alifática.

De manera similar a la síntesis de amidas, se decidió estudiar el efecto de la cadena hidrofóbica en la hidrólisis de amidas por medio de lipasas. Para tal efecto se sometieron las vainillinamidas sintetizadas previamente ( $C_4$  a  $C_{16}$ ) a hidrólisis por medio de la lipasa Novozym 435. Los ensayos se llevaron a cabo en viales de 7 ml con un volumen de reacción de 5 ml de agua desionizada, todos ellos a una temperatura de  $70\text{ }^\circ\text{C}$ , con 6 mg/ml de enzima y a una concentración de sustrato de 1.5 mM. Como se puede observar en la figura 27, en la que se representa la velocidad inicial de hidrólisis en función del número de carbonos del residuo acilo, existe una preferencia de la enzima por el sustrato con longitud de cadena alifática de 10 carbonos.



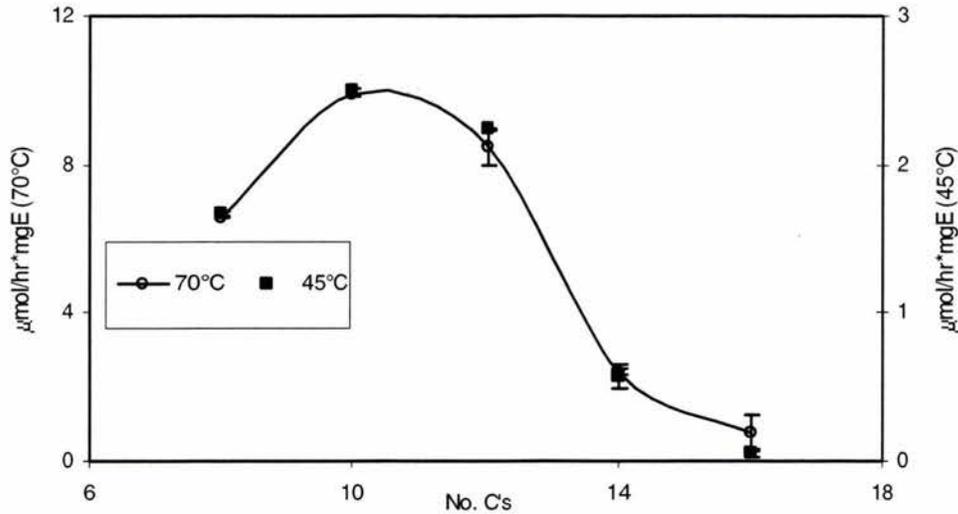
**Figura 26.** Hidrólisis de las vainillinamidas ( $C_4$  a  $C_{16}$ ) a  $70\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $[S] = 1.5\text{ mM}$  y 6 mg/ml de enzima. Amidas con residuo acilo de 4C's ( $\square$ ), 8C's ( $\blacksquare$ ), 10C's ( $\blacktriangle$ ), 12C's ( $\times$ ), 14C's ( $\circ$ ) y 16C's ( $\bullet$ ) de longitud. Para todas las reacciones  $n = 3$ .

Como se ha expresado con anterioridad, las lipasas, contrario a las esterases, tienen gran preferencia por cadenas alifáticas largas ( $>8\text{C}'\text{s}$ ) (Krishna S. H., et al. 2002; Schmid R. D., et al. 1998; Schmitt J., et al. 2002). Esta predilección tiene un comportamiento tipo campana, con un máximo en

determinada longitud de residuo acilo, dependiendo de cada lipasa, en el que al disminuir o aumentar la longitud de la cadena se observa una disminución en la actividad de la lipasa. En este mismo sentido, en la hidrólisis de las vainillinamidas, Novozym 435 muestra cierta preferencia por la amida con residuo acilo de 10C's y la velocidad decae conforme aumenta o disminuye la longitud de la cadena. A pesar de esta observación, hasta este punto dicha preferencia no podía ser determinante ya que los sustratos estaban presentes en estados físicos distintos (a 70 °C las amidas de C<sub>4</sub> a C<sub>12</sub> están presentes en estado líquido y de C<sub>14</sub> a C<sub>18</sub> carbonos en estado sólido). Ésta diferencia en los estados físicos de las amidas podría modificar la preferencia de la lipasa por uno u otro residuo acilo. Por lo tanto, se llevo a cabo un segundo experimento en el que únicamente se varió la temperatura con el objetivo de modificar el estado físico de al menos uno de los sustratos, como se muestra a continuación.

#### **5.3.2.1. La importancia del estado físico de las amidas.**

Debido al fenómeno de activación interfacial característicos de las lipasas (aumento de la actividad en presencia de una bifase aceite-agua), al encontrarse las amidas en estados físicos distintos a 70 °C (líquidas de C<sub>4</sub> a C<sub>12</sub> y sólidas de C<sub>14</sub> a C<sub>16</sub>), la preferencia de la lipasa por la amida con el residuo acilo de 10C's podría interpretarse mal. En otras palabras, mientras que en la hidrólisis de las amidas con residuo acilo de 4C's a 12C's de longitud se produce una clara bifase aceite-agua que podría inducir la activación interfacial de la lipasa, en la hidrólisis de las amidas con cadena alifática de mayor tamaño (C<sub>14</sub> a C<sub>16</sub>), el sistema es heterogéneo (sólido-agua), lo cual podría dificultar el debido funcionamiento de la enzima.



**Figura 27.** Perfil de velocidades iniciales a 45 y 70 °C en función del número de carbonos del residuo acilo. La escala de velocidad inicial de hidrólisis a 45 °C (■) del lado derecho de la figura y a la izquierda la correspondiente a 70 °C (○). La concentración de sustratos fue de 1.5 mM en todos los casos. Para todas las reacciones n = 3.

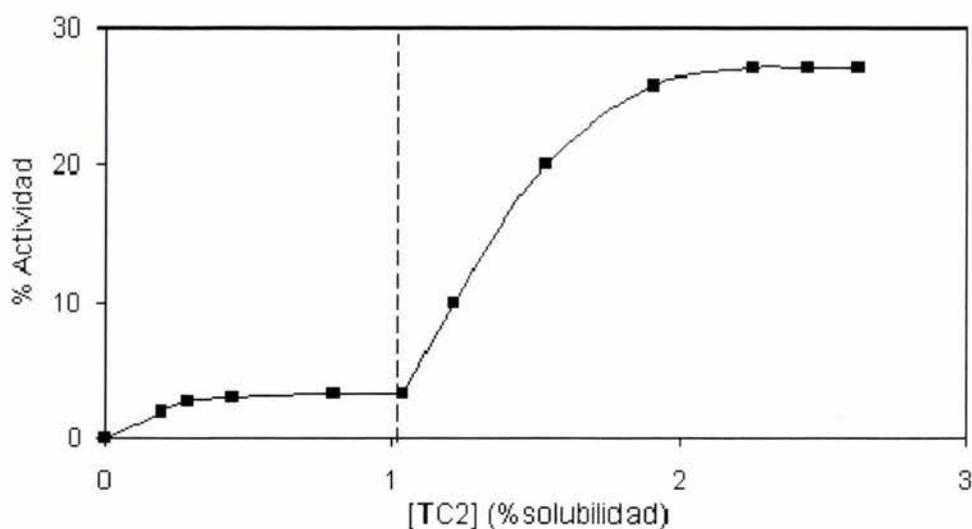
Con la variación en la temperatura se logró modificar el estado físico de la amida con residuo acilo de 12C's, la cual a 70 °C se encontraba en estado líquido y a 45 °C en estado sólido. A pesar de este cambio en el estado físico, el perfil de preferencia de la lipasa no se modificó, tal como se muestra en la figura 28, en la que al comparar la velocidad inicial de hidrólisis a 45 °C y 70 °C, en función del número de carbonos del residuo acilo, el perfil de preferencia de la lipasa no se vio afectado dado que el comportamiento sigmoideal se respeta a ambas temperaturas y gracias a ello, se logró discernir entre la preferencia de la lipasa por un tamaño de cadena y la importancia del estado físico del sustrato.

A pesar de los claros indicios de una preferencia de la lipasa Novozym 435 por la amida con cadena alifática de 10C's, no podíamos descartar la posibilidad de que esta aparente predilección se debiera a las distintas solubilidades de los compuestos. Para responder esta pregunta se llevó a cabo un barrido de concentraciones de sustrato para poder determinar si el fenómeno de activación interfacial estaba presente.

### 5.3.2.2. Barrido de concentración.

El fenómeno de activación interfacial que sufren las lipasas ha sido exhaustivamente estudiado. En mediciones de velocidad inicial es preciso tener precaución pues este fenómeno puede ser causa de falsa interpretación de los resultados. Una manera de evitar este problema al trabajar con lipasas es hacer un barrido de concentración con el fin de determinar si se está o no manifestando dicha activación.

En un barrido de concentración se presenta la activación interfacial a partir del momento en el que la concentración de sustrato alcanza la saturación en el medio y se forma un sistema bifásico. A partir de ese momento, la actividad de la enzima muestra un incremento sustancial y gráficamente el fenómeno queda representado como se muestra en la figura 29.



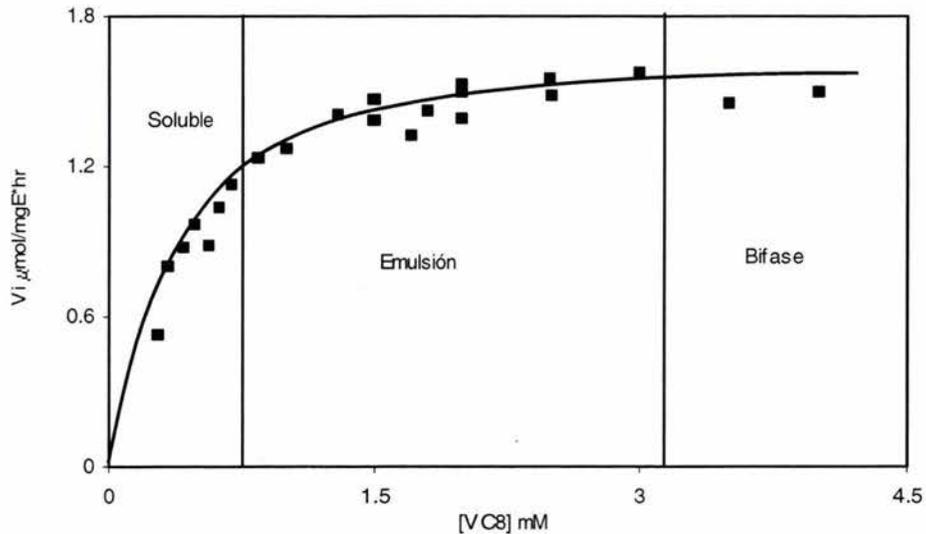
**Figura 28.** Representación del fenómeno de activación interfacial de la lipasa de páncreas de puerco (PPL), en donde se muestra la velocidad de hidrólisis de triacetín (TC2) emulsificado en goma arábica, en función de la concentración de sustrato. La ordenada está expresada como un porcentaje de la velocidad máxima observada en la hidrólisis de trioleína (Vergier R. 1997). La línea punteada representa la concentración de sustrato a la cual el sistema emulsifica.

En la figura anterior se observa la activación interfacial que sufre la lipasa del páncreas de puerco (PPL, por sus siglas en inglés) en la hidrólisis de triacil gliceroles de cadena corta (TC2). Cuando la concentración de TC2 es tan pequeña, que todo se encuentra soluble en el medio, podría pensarse que la lipasa tiene un comportamiento tipo Michaelis Menten normal. Sin embargo, al aumentar la concentración de sustrato hasta la saturación, la actividad específica sufre un repentino y considerable aumento, debido a que en ese punto el fenómeno de activación interfacial comienza a manifestarse.

Con el fin de estudiar la posibilidad de que en nuestro sistema se presentara o no esta situación y así confirmar la preferencia de Novozym 435 por la amida con residuo acilo de 10C's, se llevaron a cabo experimentos a distinta concentración de sustrato. En este barrido de concentración se observaron tres fases o estadios: a concentraciones bajas el sustrato estaba completamente soluble en el medio, al aumentar la concentración se presentó un sistema turbio o emulsificado, y finalmente a concentraciones altas se presentó un bifase entre el medio y el sustrato.

Como se puede observar en la figura 30, a pesar de haber explorado tres estados del sistema (homogéneo, emulsificado y bifásico), la lipasa no sufre un aumento en la actividad, característico de aquellos sistemas en los que se manifiesta la activación interfacial, lo que nos lleva a concluir que efectivamente Novozym 435 tiene una preferencia por la amida con residuo acilo de 10C's y no presenta el fenómeno de activación interfacial.

Cabe aclarar que la lipasa con la que se hizo este ensayo (lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada), presenta en su estructura la  $\alpha$  hélice responsable del fenómeno de activación interfacial en la mayoría de las lipasas. Sin embargo, en el estado basal de esta enzima en particular, ésta hélice se encuentra abierta, por lo que el sitio activo se encuentra expuesto sin necesidad de una interfase agua-aceite (Krishna S. H., et al. 2002). En este mismo sentido, a esta  $\alpha$  hélice en las lipasas de *P. glumae*, *P. aeruginosa*, o *C. antarctica* B, se le ha atribuido una función de anclaje a la interface aceite-agua (Otto R. T., et al. 2000; Verger R. 1997).

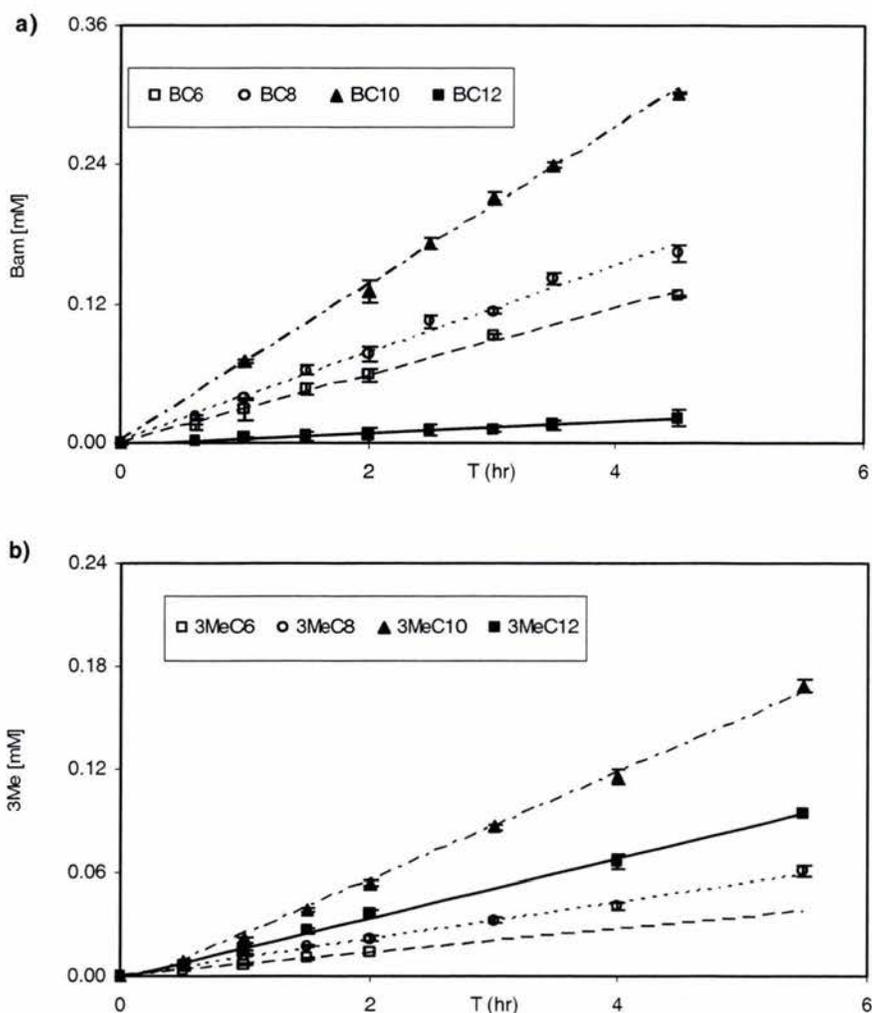


**Figura 29.** Gráfica representativa de la velocidad inicial de hidrólisis de la vainillinamida con residuo acilo de 8C's en función de la concentración de sustrato, en donde se muestra que no hay activación interfacial. Hidrólisis a 70 °C con 6 mg/ml de enzima (Novozym 435) en 5 ml de agua.

### 5.3.3. Efecto del grupo saliente (amina).

Para estudiar las características estructurales del grupo amina que pueden influir en la hidrólisis de amidas por medio de lipasas, recurrimos a las vainillinamidas y a otras dos variantes: monosustituídas (3-metoxibencilamidas) y sin sustituyentes (bencilamidas).

Como se puede apreciar en la gráfica (Fig. 31), el perfil de preferencia de la lipasa por el residuo acilo con cadena de diez carbonos se mantuvo en la hidrólisis de las 3-metoxibencilamidas y bencilamidas.

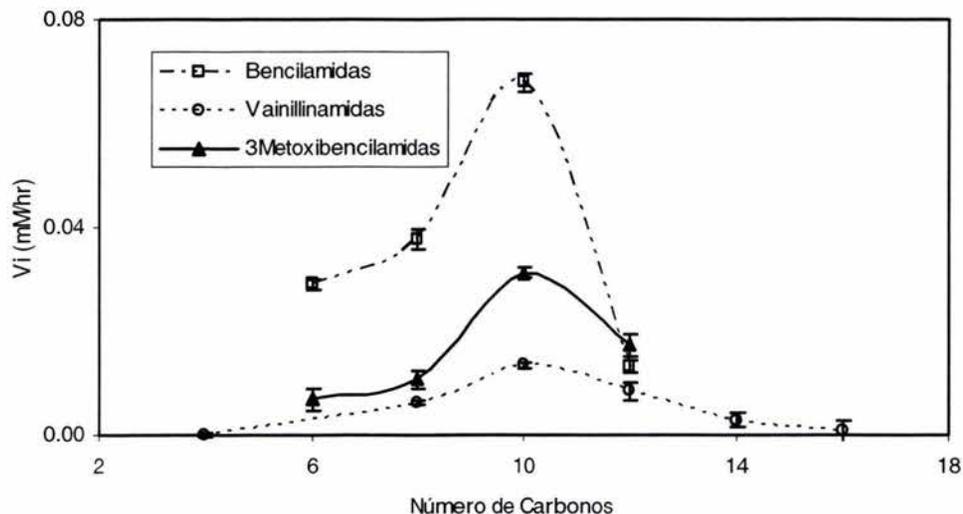


**Figura 30.** Velocidad inicial de hidrólisis de a) benzilamidas y b) 3-metoxibenzilamidas. Amidas con residuo acilo de 6C's ( $\square$ ), 8C's ( $\circ$ ), 10C's ( $\blacktriangle$ ) y 12C's ( $\blacksquare$ ) de longitud. Hidrólisis a 70 °C a una concentración de sustrato de 1.5 mM y 6 mg/ml de enzima (Novozym 435) en 5 ml de agua. Para todas las reacciones  $n = 3$ .

De todas las amidas probadas, incluyendo las vainillinamidas, las amidas bencílicas son las que tienen puntos de fusión más elevados (datos no mostrados), y en las hidrólisis a 70 °C de estas últimas no se presenta una interfase aceite-agua, por lo que, apoyando lo observado en la hidrólisis de las vainillinamidas, la presencia de una interfase no es necesaria para llevar a cabo la catálisis.

Por otro lado, al comparar la velocidad inicial de hidrólisis de todas las amidas en función de la longitud del residuo acilo, observamos que la hidrólisis de

amidas sin sustituyentes (bencilamidas) son más rápidas que las de sus análogos mono (3-metoxibencilamidas) y di-sustituidas (vainillinamidas) (Fig. 32).

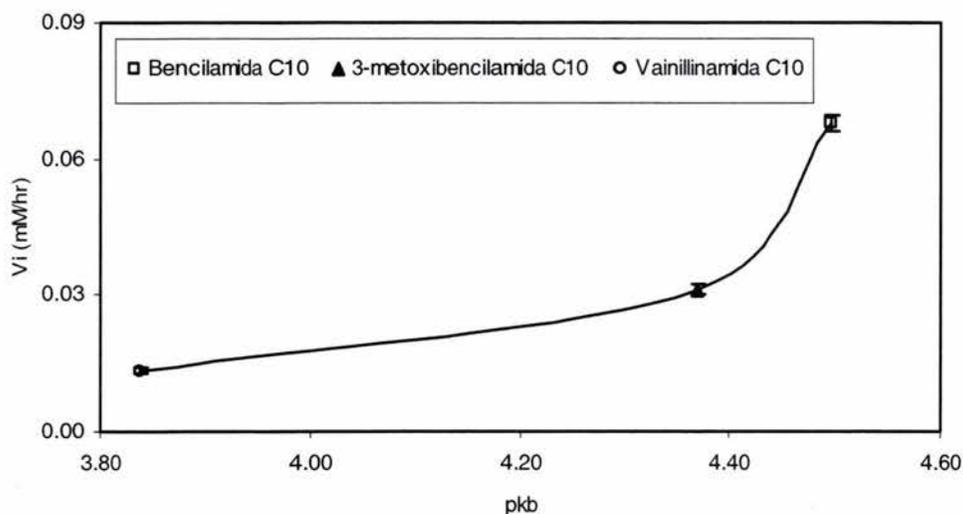


**Figura 31.** Velocidad inicial de hidrólisis de todas las amidas en función del número de carbonos del residuo. Las bencilamidas ( $\square$ ) muestran mayor velocidad de hidrólisis, seguidas de las 3-metoxibencilamidas ( $\blacktriangle$ ) y por último las vainillinamidas ( $\circ$ )

Este resultado nos hace suponer que la presencia de los sustituyentes en el anillo aromático provoca impedimentos estéricos entre la enzima y los sustituyentes del anillo bencénico, lo que dificulta o disminuye la eficiencia de la enzima.

### 5.3.3.1. Poder nucleofílico del grupo saliente.

Sin descartar la posibilidad de que las diferencias en las velocidades de hidrólisis de estas amidas (bencilamidas, vainillinamidas y 3-metoxibencilamidas) esté dada por impedimentos estéricos entre los sustituyentes del anillo y el sitio activo de la enzima, al graficar la velocidad inicial de hidrólisis de cada amida compartiendo el mismo residuo acilo (C10 en este caso) en función de los  $pK_b$ 's de las aminas (poder nucleofílico), observamos que si hay una correlación directamente proporcional (Fig. 33).



**Figura 32.** Velocidad inicial de hidrólisis de las tres amidas con residuo acilo de 10C's en función del pKb del grupo saliente.

La grafica anterior nos sugiere que a menor pKb, equivalente a un mayor poder nucleofílico, la velocidad de hidrólisis es menor lo cual puede interpretarse de la siguiente manera: al romperse el enlace amida y formarse el complejo acil-enzima, la entrada del segundo sustrato que disocie este complejo, está en función del poder nucleofílico de aquellas especies nucleofílicas que se encuentren presentes en el medio, agua (-OH) y amina (-NH<sub>2</sub>) en este caso. En otras palabras, para romper el complejo acil-enzima es necesaria la adición de un nucleófilo fuerte, por lo que al encontrarse en el medio de reacción dos nucleófilos fuertes (OH y NH<sub>2</sub>) la reacción puede seguir dos caminos:

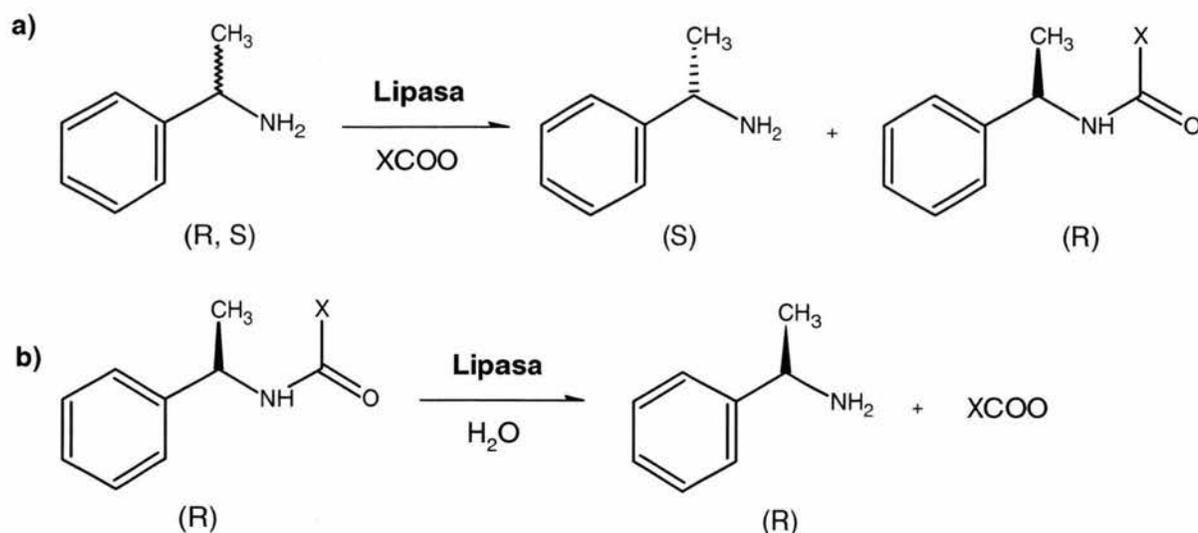
1. La hidrólisis del complejo (ataque nucleofílico del OH del agua)
2. La síntesis de la amida (ataque nucleofílico de la amina)

Por lo tanto, a mayor poder nucleofílico de la amina, se facilita la síntesis de la amida dando como resultado una velocidad de hidrólisis menor.

#### 5.4. Tecnología “Easy-on, Easy-off”.

Como se ha enfatizado durante el desarrollo de este escrito, los grupos amino y amido son de gran importancia tanto en la química a nivel preparativa como en la industria (fármacos, alimentos, agropecuarios, entre otros), y su importancia reside en las propiedades fisicoquímicas que confieren a las moléculas que las contienen. Aunado a ello, estos grupos funcionales, en particular las aminas, son ampliamente utilizados como sintones. En específico, las aminas enantioméricamente puras son intermediarios quirales de gran interés y de gran utilidad en la industria farmacéutica o de química fina. Un método comúnmente utilizado en la resolución de aminas quirales es la acilación enzimática selectiva de las mismas, sin embargo, la desacilación que libera la amina quiral requiere de condiciones muy severas ( $9 < \text{pH} < 2$ ,  $T > 200$  °C) e incompatibles con grupos funcionales sensibles. Por ello, el desarrollo de herramientas que permitan llevar a cabo este proceso en condiciones de pH neutro y temperatura de medio ambiente representa una gran utilidad.

La tecnología “easy-on, easy-off”, en el caso de las aminas, se refiere a la acilación y desacilación enantioselectiva de ellas mediante el uso de enzimas en ambas reacciones. Con más detalle, “easy on” es la acilación enantioselectiva de una mezcla racémica de aminas en donde se obtienen como productos el isómero que no reaccionó y la amina acilada (amida) que si reconoció la enzima (Fig. 34 a). El segundo paso de esta tecnología, “easy off”, es la desacilación o hidrólisis del enantiómero (en su forma amida) obtenido en el primer paso de este proceso. De esta segunda etapa, se obtienen como productos al residuo acilo y la amina quiral correspondiente (Fig. 34 b).



**Figura 33.** Tecnología “easy on, easy off”. En a) se muestra la acilación enantioselectiva de una de las aminas (R) de la mezcla racémica (R, S), reacción de la que se obtiene la amina quiral libre (S) que no fue acilada. En b) se muestra la hidrólisis de la amida acilada (R) en el primer paso, transformación de la que se obtiene la segunda amina (R) de la mezcla racémica. En esta reacción X simboliza una cadena hidrocarbonada de cualquier tamaño.

En la primer parte de este trabajo se demostró que, la lipasa B de *C. antarctica* inmovilizada (Novozym 435) es capaz de llevar a cabo la síntesis de amidas. Además, se comprobó que a partir de la apropiada selección del medio de reacción, el equilibrio en la síntesis de amidas se puede desplazar hacia la acumulación de producto obteniéndose rendimientos mayores al 95% de conversión demostrando que el efecto de la naturaleza del donador de acilo y de los sustituyentes del anillo son de menor influencia que el tipo de enlace que se está formando. Todo lo anterior desemboca en la aplicación de estos conocimientos en la resolución de una mezcla racémica, en particular, en la condensación de la  $\alpha$ -metilbencilamina y el ácido cáprico, de cuyos resultados suponemos enantioselectividad al haberse sintetizado solo el 50% de la concentración de sustrato inicial. En concreto, hasta ese punto del proyecto se logró dar el primer paso en la tecnología “easy-on, easy-off”.

En la hidrólisis de amidas de tipo anillo-residuo acilo, la segunda parte de este trabajo, demostramos que la lipasa Novozym 435 tiene una preferencia por el

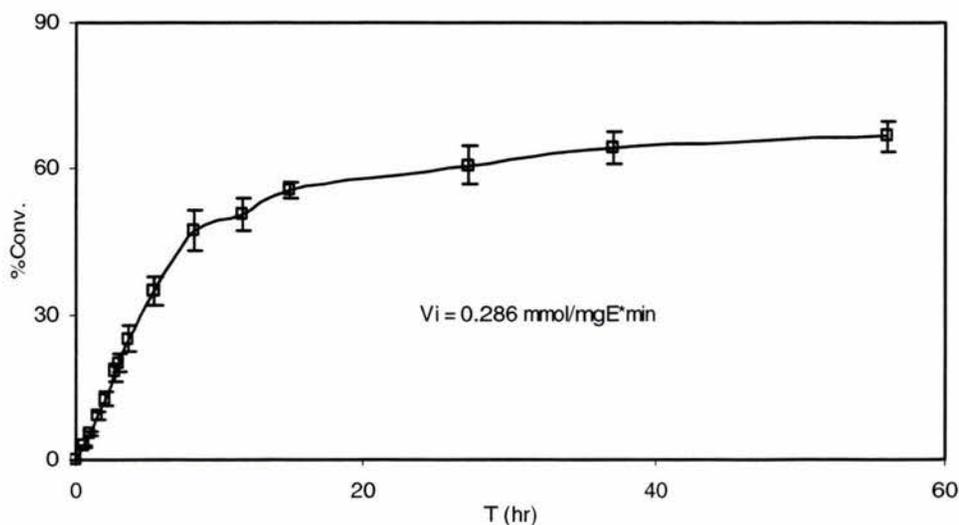
residuo acilo de 10C's de longitud y que gracias a ello, la formación del complejo acil-enzima se ve favorecida, reflejando como efecto directo una velocidad de hidrólisis mayor que aquellas amidas con mayor o menor número de carbonos en el acilo. Por otro lado, se ha propuesto que si bien el pKa de los grupos salientes tiene una correlación con la velocidad inicial de hidrólisis, también pueden existir impedimentos estéricos entre los sustituyentes del anillo y el sitio activo de la lipasa, por lo que los anillos sin sustituyentes se hidrolizan a mayor velocidad. Con estos resultados abrimos la posibilidad de estudiar, comprender y establecer algunos de los parámetros que determinan la factibilidad de la hidrólisis de amidas por medio de lipasas y a su vez explicar el hecho de que otros autores no hayan observado actividad con determinadas amidas. Por lo que, unido a la síntesis de amidas, la desacilación enantioselectiva es el complemento de la tecnología "easy-on, easy-off".

#### **5.4.1. Hidrólisis de la $\alpha$ -metilbencilamida.**

Como se ha expresado con anterioridad, la obtención de aminas quirales a partir de amidas proquirales es un proceso atractivo debido a las aplicaciones que han encontrado estos compuestos tanto en la industria farmacéutica, como en la agroindustria. Sin embargo, la hidrólisis química de amidas quirales no es un proceso selectivo, por lo que el proceso de obtención del enantiómero deseado consta de varias etapas de muy bajos rendimientos. Por lo anterior, el estudio de la resolución de amidas quirales por medio de lipasas no solo representa un aporte de conocimiento científico sino que también constituye un avance tecnológico importante.

Con la experiencia de los resultados obtenidos en este proyecto, en particular lo que refiere a la hidrólisis de amidas, queda de manifiesto que esta catálisis es posible siempre y cuando se encuentren por un lado, las propiedades estructurales de la molécula que favorezcan la formación del complejo acil-enzima y por otro las condiciones del medio de reacción apropiadas que faciliten el ataque nucleofílico al complejo formado. Por lo anterior, la amida quiral que se sometió a hidrólisis fue la amida condensada a partir del ácido cáprico (C10) y la  $\alpha$ -

metilbencilamina (amina sin sustituyentes en el anillo) y como se muestra en la figura 35, de este ensayo se obtiene una alta conversión y una buena velocidad inicial de hidrólisis. Cabe aclarar que esta amida proviene de una síntesis enzimática y como en su momento se aclaró, por las conversiones alcanzadas en ella, suponemos que se trata de un solo enantiómero (R ó S) (Sección 7.1.3).



**Figura 34.** Conversión al equilibrio de la hidrólisis de la  $\alpha$ -metilbencilamida C10 a una concentración inicial de 1.5 mM con 6 mg/ml de enzima en 5 ml de agua desionizada. En donde  $n = 3$ .

En la hidrólisis de amidas, de todas con las que se hizo el ensayo (vainillinamidas, 3-metoxibencilamidas y bencilamidas), ésta amida es la que presentó mayor velocidad de hidrólisis, por lo que el resultado no solo es interesante desde el punto de vista enantioselectivo sino que resulta una alternativa por demás atractiva en términos cinéticos.

## 6. CONCLUSIONES.

### 6.1. Conclusiones en la síntesis de amidas por medio de lipasas.

Después de haber sintetizado una serie de amidas con características estructurales similares a la molécula de la capsaicina los resultados nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- Novozym 435 mostró una vez más ser una enzima útil en la acilación de aminas.
- El sistema electo, condiciones de temperatura, tipo de solvente, cantidad de enzima, concentración de sustratos, volumen de reacción, etc., nos permite obtener conversiones por arriba del 95% de conversión para todas las amidas sintetizadas.
- Se demostró que en la síntesis de amidas del tipo anillo-residuo acilo el equilibrio se desplaza hacia la síntesis de las mismas en función de la hidrofobicidad del solvente en el que se lleve a cabo la reacción.
- Se propone que las bajas conversiones obtenidas en *n*-hexano no solo están en función de la solubilidad de las amidas, sino que es un efecto sinérgico entre la solubilidad de los sustratos y productos, así como del tipo de enlace que se forma en la reacción.
- Se demostró que independientemente de la naturaleza del donador de acilo y de la longitud del ácido se obtienen conversiones por arriba del 95%.
- La velocidad inicial de síntesis y la conversión al equilibrio son independientes de los sustituyentes del anillo, del poder nucleofílico de las aminas y del coeficiente de partición de las mismas.
- La enantioselectividad de la lipasa se respeta a pesar de la capacidad del solvente para solubilizar más amida de la obtenida en la síntesis de la  $\alpha$ -metilbencilamida.

- La conversión en la resolución de la mezcla racémica por medio de la síntesis de la amida con el residuo acilo de 10C's de longitud es mayor a las reportadas en otros solventes más hidrofóbicos que el 2M2B.

## 6.2. Conclusiones de la hidrólisis de amidas por medio de lipasas.

Con la hidrólisis de las amidas sintetizadas en este proyecto con características estructurales similares entre ellas podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- La hidrólisis de amidas por medio de lipasas "*in vitro*" es posible siempre y cuando se encuentren las condiciones adecuadas para ello.
- La formación del complejo acil-enzima es crucial en la hidrólisis de amidas y de él depende en gran parte que la catálisis se lleve a cabo.
- La lipasa Novozym 435 tiene una preferencia por la cadena con 10C's de longitud y decae conforme aumentan o disminuyen la cantidad de carbonos de la cadena.
- La velocidad de hidrólisis de las amidas probadas depende de la longitud del residuo acilo, encontrando un máximo en aquellas con residuo acilo de 10C's de longitud.
- Los sustituyentes en el residuo acilo disminuyen la velocidad de hidrólisis de las amidas con estructura molecular parecida a la de la capsaicina y esto puede estar asociado con impedimentos estéricos entre los sustituyentes del anillo y el sitio activo de la enzima.
- La velocidad de hidrólisis por medio de lipasas es dependiente del poder nucleofílico del grupo saliente, cuanto mayor sea este poder, menor es la velocidad de hidrólisis.

- La lipasa mostró en la hidrólisis de la amida quiral que lleva a cabo la catálisis a una buena velocidad inicial y que de ella se obtienen muy buenas conversiones.

**6.3. Conclusiones en conjunto de síntesis e hidrólisis de amidas por medio de lipasas.**

- Se elaboraron las herramientas que permiten el desarrollo de la tecnología “easy on, easy off” en la resolución de la  $\alpha$ -metilbencilamina.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

1. **Adamczyk, M., Grote, J.** (1999) Use of lipase for regioselective one pot amidation and hydrolysis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **9**: 245 - 248.
2. **Bellot, J. C., Choisnard, L., Castillo, E., Marty, A.** (2001) Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification. *Enzyme and Microbial Technology* **28**: 362 - 369.
3. **Bellringer M.** (2004) The chemistry of chilli peppers. <http://www.chemsoc.org/exemplarchem/entries/mbellringer/reference.htm>
4. **Bentley, T. W., Llewellyn, G., McAlister, J. A.** (1996) S(N)2 mechanism for alcoholysis, aminolysis, and hydrolysis of acetyl chloride. *Journal of Organic Chemistry* **61**: 7927 - 7932.
5. **Breuer, M., Ditrich, K., Habicher, T., Hauer, B., Kessler, M., Sturmer, R., Zelinski, T.** (2004) Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angewandte Chemie-International Edition* **43**: 788 - 824.
6. **Castillo, E., Pezzotti, F., Navarro, A., Lopez-Munguia, A.** (2003) Lipase-catalyzed synthesis of xylitol monoesters: solvent engineering approach. *Journal of Biotechnology* **102**: 251 - 259.
7. **Chulalaksananukul, W., Condoret, J. S., Combes, D.** (1992) Kinetics of geranyl acetate synthesis by lipase-catalysed transesterification in n-hexane. *Enzyme and Microbial Technology* **14**: 293 - 298.

8. **de Castro, M. S., Dominguez, P., Sinisterra, J. V.** (2000) Enzymatic amidation and alkoxyacylation of amines using native and immobilised lipases with different origins: a comparative study. *Tetrahedron* **56**: 1387 - 1391.
9. **de Castro, M. S., Gago, J. V. S.** (1998) Lipase-catalyzed synthesis of chiral amides. A systematic study of the variables that control the synthesis. *Tetrahedron* **54**: 2877 - 2892.
10. **Desai, U. R., Klivanov, A. M.** (1995) Flexibility of enzymes suspended in organic solvents probed by time-resolved fluorescence anisotropy. Evidence that enzyme activity and enantioselectivity are directly related to enzyme flexibility. *Journal of the American Chemical Society* **117**: 12657 - 12663.
11. **DeWitt, D.** (2002) The nature of capsaicin. [www.capsaicin.com](http://www.capsaicin.com)
12. **Duarte, D. R.**(2002) Caracterización y aplicaciones de lipasas en la síntesis e hidrólisis de amidas. *Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias*. Instituto de Biotecnología (IBt), UNAM.
13. **Duarte, D. R., Castillo, E., Barzana, E., Lopez-Munguia, A.** (2000) Capsaicin hydrolysis by *Candida antarctica* lipase. *Biotechnology Letters* **22**: 1811 - 1814.
14. **Gotor, V.** (1999) Non-conventional hydrolase chemistry: amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **7**: 2189 - 2197.
15. **Hames, B. D., Hooper, N. M., Houghton, J. D.** (1997) *Instant Notes in Biochemistry 1ra ed.*: 1 - 374.
16. **Henke, E., Bornscheuer, U. T.** (2003) Fluorophoric assay for the high-throughput determination of amidase activity. *Analytical Chemistry* **75**: 255 - 260.

17. **Henkel, T., Brunne, R. M., Müller, H., Reichel, F.** (2004) Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angewandte Chemie-International Edition* **38**: 643 - 647.
18. **Hwang, B. Y., Scheib, H., Pleiss, J., Kim, B. G., Schmid, R. D.** (2000) Computer-aided molecular modeling of the enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward gamma- and delta-lactones. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **10**: 223 - 231.
19. **Irimescu, R., Kato, K.** (2004) Lipase-catalyzed enantioselective reaction of amines with carboxylic acids under reduced pressure in non-solvent system and in ionic liquids. *Tetrahedron Letters* **45**: 523 - 525.
20. **IUPAC** (1997) IUPAC Compendium of Chemical Terminology. <http://www.iupac.org/publications/compendium/index.html>
21. **Janusz, J. M., et al.** (1993) Vanilloids. 1. Analogs of capsaicin with antinociceptive and antiinflammatory activity. *Journal of Medical Chemistry* **36**: 2595 - 2604.
22. **Jensen, R. G., Dejong, F. A., Clark, R. M.** (1983) *Lipids* **18**: 239 - 252.
23. **Kahlow, U. H. M., Schmid, R. D., Pleiss, J.** (2001) A model of the pressure dependence of the enantio selectivity of *Candida rugosa* lipase towards (+/-)-menthol. *Protein Science* **10**: 1942 - 1952.
24. **Kawamoto, T., So, R. S., Masuda, Y., Tanaka, A.** (1999) Efficient enzymatic synthesis of amide with (aminomethyl)trimethylsilane. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87**: 607 - 610.
25. **Klibanov, A. M.** (1997) Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in Biotechnology* **15**: 97 - 101.

26. **Klibanov, A. M.** (2001) Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**: 241 - 246.
27. **Kobata, K., Kawamura, M., Toyoshima, M., Tamura, Y., Ogawa, S., Watanabe, T.** (1998a) Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs by amidation of vanillylamine with fatty acid derivatives. *Biotechnology Letters* **20**: 451 - 453.
28. **Kobata, K., Kobayashi, M., Kinpara, S., Watanabe, T.** (2003) Supercritical CO<sub>2</sub> as a reaction medium for synthesis of capsaicin analogues by lipase-catalyzed transacylation of capsaicin. *Biotechnology Letters* **25**: 1575 - 1578.
29. **Kobata, K., Kobayashi, M., Tamura, Y., Miyoshi, S., Ogawa, S., Watanabe, T.** (1999) Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs by transacylation of capsaicin with natural oils or fatty acid derivatives in n-hexane. *Biotechnology Letters* **21**: 547 - 550.
30. **Kobata, K., Toyoshima, M., Kawamura, M., Watanabe, T.** (1998b) Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs using natural oils as an acyl donor. *Biotechnology Letters* **20**: 781 - 783.
31. **Krishna, S. H., Karanth, N. G.** (2002) Lipases and Lipase-catalyzed esterification reactions in non aqueous media. *Catalysis Reviews* **44**: 499 - 591.
32. **Lau, R. M., van Rantwijk, F., Seddon, K. R., Sheldon, R. A.** (2000) Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Organic Letters* **2**: 4189 - 4191.
33. **Maruyama, T., Nakajima, M., Kondo, H., Kawasaki, K., Seki, M., Goto, M.** (2003) Can lipases hydrolyze a peptide bond? *Enzyme and Microbial Technology* **32**: 655 - 657.
34. **Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Monsan, P.** (1998) Kinetic study of chemoselective acylation of amino-alditol by immobilized lipase in organic

solvent: effect of substrate ionization. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1387**: 177 - 183.

35. **Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D., Monsan, P.** (1997a) Lipase-Catalyzed synthesis of biosurfactants by transacylation of N-methylglucamine and fatty-acid methyl esters. *Tetrahedron* **53**: 7629 - 7634.
36. **Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Petre, D., Monsan, P.** (1997b) Enzymatic synthesis of glycamide surfactants by amidification reaction. *Tetrahedron* **53**: 5185 - 5194.
37. **Maugard, T., Tudella, J., Legoy, M. D.** (2000) Study of vitamin ester synthesis by lipase-catalyzed transesterification in organic media. *Biotechnology Progress* **16**: 358 - 362.
38. **Morrison RT, Boyd RN** (1998) Química orgánica. *Addison Wesley Longman* **5 ed.** Edo. de México, México.
39. **Otto, R. T., Scheib, H., Bornscheuer, U. T., Pleiss, J., Syldatk, C., Schmid, R. D.** (2000) Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in the synthesis of arylaliphatic glycolipids. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **8**: 201 - 211.
40. **Ottosson, J., Fransson, L., Hult, K.** (2002) Substrate entropy in enzyme enantioselectivity: An experimental and molecular modeling study of a lipase. *Protein Science* **11**: 1462 - 1471.
41. **Öhrner, N., Orrenius, C., Mattson, A., Norin, T., Hult, K.** (1996) Kinetic resolution of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by the *Candida antarctica* lipase B. *Enzyme and Microbial Technology* **19**: 328 - 331.
42. **Park, S., Kazlauskas, R. J.** (2001) Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. *Journal of Organic Chemistry* **66**: 8395 - 8401.

43. **Park, Y. H., Lee, S. S.** (1994) Identification and characterization of capsaicin-hydrolyzing enzymes purified from rat liver microsomes. *Biochem. Biol. Mol. Int.* **32**: 351 - 360.
44. **Pleiss, J., Fischer, M., Peiker, M., Thiele, C., Schmid, R. D.** (2000) Lipase engineering database Understanding and exploiting sequence-structure-function relationships. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **10**: 491 - 508.
45. **Rendon, X., Lopez-Munguia, A., Castillo, E.** (2001) Solvent engineering applied to lipase-catalyzed glycerolysis of triolein. *Journal of American Oil Chemists Society* **78**: 1061 - 1066.
46. **Reyes-Duarte, D., Castillo, E., Martinez, R., Lopez-Munguia, A.** (2002) Lipase-catalysed synthesis of olvanil in organic solvents. *Biotechnology Letters* **24**: 2057 - 2061.
47. **Sangster, J.** (1989) Octanol-Water Partition Coefficients of simple Organic Compounds. *Journal of Physical Chemistry* **18**: 1111 - 1229.
48. **Schmid, R. D., Verger, R.** (1998) Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie-International Edition* **37**: 1609 - 1633.
49. **Schmitt, J., Brocca, S., Schmid, R. D., Pleiss, J.** (2002) Blocking the tunnel: engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity. *Protein Engineering* **15**: 595 - 601.
50. **Segel, I. H.** (1975) Enzyme kinetics: behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems. *John Wiley & Sons* **1ra ed.** New York, USA.
51. **Shewale, J. G., et al.** (1987) Evaluation of 6-amino penicillanic acid by p-dimethyl aminobenzaldehyde. *Biotechnology Techniques* **1**: 69 - 72.

52. **Shewale, J. G., Sivaraman, H.** (1989) Penicillin acylase: enzyme production and its applications in the manufacture of 6-APA. *Process Biochemistry* 146 - 154.
53. **Slotema, W. F., Sandoval, G., Guieysse, D., Straathof, A. J. J., Marty, A.** (2003) Economically pertinent continuous amide formation by direct lipase-catalyzed amidation with ammonia. *Biotechnology and Bioengineering* **82**: 664 - 669.
54. **van Holde KE., Mathews CK** (2000) Bioquímica. *McGraw Hill and Interamericana de España* **2 ed.** Madrid, España.
55. **van Langen, L. M., Oosthoek, N. H. P., Guranda, D. T., van Rantwijk, F., Svedas, V. K., Sheldon, R. A.** (2000) Penicillin acylase-catalyzed resolution of amines in aqueous organic solvents. *Tetrahedron-Asymmetry* **11**: 4593 - 4600.
56. **Verger, R.** (1997) 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. *Trends in Biotechnology* **15**: 32 - 38.
57. **Wagegg, T., Enzelberger, M. M., Bornscheuer, U. T., Schmid, R. D.** (1998) The use of methoxy acetoxy esters significantly enhances reaction rates in the lipase-catalyzed preparation of enantiopure 1-(4-chloro phenyl) ethyl amines. *Journal of Biotechnology* **61**: 75 - 78.
58. **Zahn, D.** (2004a) Car-Parrinello molecular dynamics simulation of base-catalyzed amide hydrolysis in aqueous solution. *Chemical Physics Letters* **383**: 134 - 137.
59. **Zahn, D.** (2004b) Investigation of the complex catalyzed amide hydrolysis from reaction coordinate of acid molecular dynamics simulations. *Chemical Physics* **300**: 79 - 83.