



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERIA CELULAR Y BIOCATALISIS



Síntesis enzimática quimioselectiva de análogos de capsaicina  
y su evaluación electrofisiológica en canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

P R E S E N T A:

**RUBEN DE REGIL HERNANDEZ**

ASESOR: DR. EDMUNDO CASTILLO ROSALES

CUERNAVACA, MORELOS

2005

U: 349472



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

Este trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Edmundo Castillo,  
en el Grupo de Biocatálisis del Dr. Agustín López-Munguía, del  
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del  
Instituto de Biotecnología de la  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
Cuernavaca, Morelos.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ruben de Regil

Hernandez

FECHA: 7 Oct 2005

FIRMA: 

Agradecemos el apoyo económico de CONACyT con número de  
registro 181146 recibido durante la realización de este trabajo.

Con cariño para mis padres, Rubén y Elia,  
y hermanos, Horacio, Elia y Mario  
y a mi sobrina Eloisa.

## **Agradecimientos**

Al Dr. Agustín López-Munguía C. por la valiosa oportunidad de formar parte de su Grupo de trabajo, por su confianza y su paciencia para conmigo.

Al Dr. Edmundo Castillo por su siempre amable disposición para tratar los temas de mi trabajo, por sus consejos e indispensable ayuda en la clarificación de ideas y objetivos.

Al Dr. Ignacio López González por su dedicada y puntual atención en mi formación electrofisiológica.

Al Dr. Alberto Darszon Israel por la confianza y la atención a su servidor durante mi paso en su Grupo de trabajo.

A mis compañeros y amigos del excelente grupo de biocatálisis: Alina, Angela, Sandrita, Alex, Chelo, Vero, Arlette, Fernando, Male, Erika, Sandra, María y Clarita. Fue una grata convivencia con todos ustedes.

A Judith y a Doña Aure por su valioso e indispensable apoyo en las actividades del laboratorio.

Al Dr. Alberto Darszon, al Dr. Rafael Vázquez, a la Dra. Amelia Farrés, al Dr. Carlos Muñoz y al Dr. Edmundo Castillo quienes formaron parte del honorable jurado. Gracias por sus atenciones, sugerencias y comentarios.

A CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

## INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	IV
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN .....	XI
1. Introducción .....	1
2. Antecedentes.....	4
2.1 Amidas .....	4
2.1.1 Propiedades de las amidas .....	4
2.1.2 Características del enlace amida .....	4
2.1.3 Relevancia del enlace amida .....	5
2.1.4 Capsaicinoides.....	5
2.1.5 Síntesis enzimática de amidas .....	9
2.1.6 Síntesis enzimática de capsaicinoides .....	15
2.2 Lipasas .....	16
2.2.1 Características estructurales de las lipasas .....	17
2.2.2 Especificidad de las lipasas.....	21
2.2.3 Mecanismo cinético de las lipasas.....	25
2.3 Resolución quimioselectiva enzimática .....	29
2.4 Factores que afectan la síntesis enzimática .....	31
2.4.1 Sustratos .....	31
2.4.2 Donadores de acilo.....	31
2.4.3 Nucleófilos .....	32
2.4.4 Solventes.....	33
3. Ingeniería de solventes .....	35
4. Coeficiente de actividad.....	37
4.1 Método UNIFAC.....	39
5. Canales de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de voltaje (CCDV).....	43
5.1 Estructura y función de las subunidades de los CCDV.....	43
5.2 Clasificación funcional de los CCDV.....	44
5.3 Clasificación molecular de los CCDV.....	47
5.4 Canales de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T dependientes de voltaje (CCTDV).....	47

6. Uso de células espermatozóicas de ratón para registros de corrientes tipo T .....	55
7. Justificación .....	57
8. Hipótesis y objetivos .....	58
9. Materiales y métodos .....	60
9.1 Síntesis enzimática .....	60
9.1.1 Materiales .....	60
9.1.2 Metodología de las reacciones de síntesis .....	60
9.1.2.1 Liberación de la Vainillilamina (VAM) .....	62
9.1.2.2 Síntesis y purificación de estándares .....	62
9.1.2.3 Síntesis, purificación y ensayo de hidrólisis de capsato .....	63
9.1.2.4 Técnica de cromatografía Flash .....	64
9.1.2.5 Técnica de cromatografía de capa fina (TLC).....	65
9.1.2.6 Técnica de cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).....	65
9.1.2.7 Método UNIFAC.....	66
9.2 Electrofisiología .....	69
9.2.1 Material biológico .....	69
9.2.1.1 Obtención de las células espermatozóicas de ratón....	69
9.2.1.2 Registros electrofisiológicos de la evaluación de los compuestos .....	69
9.2.1.3 Soluciones de registro.....	71
9.2.1.4 Soluciones de capsaicina y análogos .....	71
10. Resultados y discusión .....	72
10.1 Síntesis de análogos de capsaicina .....	72
10.1.1 Selección de sustratos .....	72
10.1.2 Predicciones termodinámicas empleando el Método UNIFAC .....	74
10.1.3 Cromatografía de sustratos y productos.....	78
10.1.4 Acilación enzimática de sustratos seprados .....	81
10.1.5 Acilación enzimática quimioselectiva en mezcla de sustratos .....	83

10.1.6	Acilación enzimática quimioselectiva de una molécula bifuncional .....	86
10.2	Ensayos electrofisiológicos.....	89
10.3	Identificación de corrientes de Ca <sup>2+</sup> tipo T .....	89
10.4	Efecto de la capsaicina sobre los CCTDV.....	90
10.5	Efecto de algunos análogos de capsaicina sobre los CCTDV...	97
11.	Conclusiones .....	104
11.1	Conclusiones de la síntesis enzimática .....	104
11.2	Conclusiones de la actividad de capsaicinoides en CCTDV..	105
12.	Bibliografía.....	106

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b>	Estructuras de resonancia de amidas .....	4
<b>Figura 2.</b>	Estructura de la capsaicina .....	6
<b>Figura 3.</b>	Capsaicinoides presentes en los chiles .....	7
<b>Figura 4.</b>	Estructuras de compuestos sintéticos que actúan sobre el receptor de capsaicina, el canal TRPV1 .....	9
<b>Figura 5.</b>	Reacciones de síntesis catalizadas por lipasas .....	14
<b>Figura 6.</b>	Estructura $\alpha$ - $\beta$ hidrolasa característica de las lipasas .....	18
<b>Figura 7.</b>	Representación tridimensional de la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> cristalizada con Tween 80.....	19
<b>Figura 8.</b>	Tres subsitios en la lipasa de <i>Burkholderia cepacia</i> .....	20
<b>Figura 9.</b>	Subsitios de alojamiento de la parte alcohólica y acilo en la lipasa B de <i>Candida antarctica</i> cristalizada con Tween 80 .....	21
<b>Figura 10.</b>	Reconocimiento enantiomérico de las lipasas .....	23
<b>Figura 11.</b>	Mecanismo molecular de la catálisis de las serín-hidrolasas .....	27
<b>Figura 12.</b>	Representaciones tridimensionales de la interacción del Tween 80 y la vainillilamida del ácido cáprico (VAmC10) con el sitio activo .....	28
<b>Ecuación 1.</b>	Definición de actividad termodinámica.....	37
<b>Figura 13.</b>	Relación actividad-concentración de algunos sistemas de fases acuosos-orgánicos .....	38
<b>Figura 14.</b>	Reacción química.....	39
<b>Ecuación 2.</b>	Constante de equilibrio en función de actividades termodinámicas .....	39
<b>Figura 15.</b>	Esquema de un canal de $\text{Ca}^{2+}$ dependiente de voltaje.....	44
<b>Figura 16.</b>	Dendograma de CCDV en humano.....	45
<b>Figura 17.</b>	Características biofísicas de las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T..	50
<b>Figura 18.</b>	Esquema simplificado del fenómeno del dolor .....	53

<b>Tabla 1.</b>	Concentración de sustratos y enzima en las síntesis de amidas y ésteres en solventes orgánicos.....	61
<b>Tabla 2.</b>	Concentraciones usadas en la reacción realizada con mezcla de 2 nucleófilos, VAM y VAOH .....	62
<b>Figura 19.</b>	Reacción de la liberación de la vainillilamina del clorhidrato mediante N-N-diisopropiletilamina (DIPEA).....	62
<b>Figura 20.</b>	Método UNIFAC.....	67
<b>Tabla 3.</b>	Componentes y concentraciones de la solución externa en la que se suspendieron las células espermatozógenas de ratón .....	71
<b>Tabla 4.</b>	Componentes y concentraciones de la solución interna. ....	71
<b>Figura 21.</b>	Estructuras de la capsaicina y de los dos análogos pungentes.....	73
<b>Figura 22.</b>	Reacciones de síntesis enzimática de amidas análogas de capsaicina .....	73
<b>Figura 23.</b>	Reacciones de las síntesis enzimática de ésteres análogos de capsaicina.....	74
<b>Tabla 5.</b>	Descomposición de los análogos de capsaicina en sus grupos funcionales. ....	75
<b>Figura 24.</b>	Coefficientes de actividad de la VAmC10 en diferentes mezclas de solventes con n-hexano.....	76
<b>Tabla 6.</b>	Coefficientes de actividad ( $\gamma^{\infty}$ ) calculados con el método UNIFAC para los cuatro análogos de capsaicina.....	77
<b>Figura 25.</b>	Contornos topográficos de los compuestos bencílicos y vainilloides. ....	79
<b>Figura 26.</b>	Cromatogramas de los compuestos bencílicos y vainilloides .....	79
<b>Tabla 7.</b>	Coefficientes de actividad y conversiones alcanzadas en las reacciones de síntesis de análogos de capsaicina.....	81
<b>Tabla 8.</b>	Componentes y concentraciones usadas en la síntesis enzimática con dos nucleófilos .....	84

<b>Tabla 9.</b>	Conversiones obtenidas en la síntesis enzimática con dos nucleófilos.....	84
<b>Tabla 10.</b>	Resumen comparativo de los $\gamma^\infty$ y las conversiones logradas en las síntesis enzimática de análogos de capsaicina .....	85
<b>Figura 27.</b>	Reacción de esterificación y amidación para la resolución de la molécula bifuncional ( $\pm$ )3-amino-1,2-propanodiol con ácido-oleico .....	86
<b>Tabla 11.</b>	Descomposición en grupos de los productos de síntesis (1) y (2) de la reacción del ( $\pm$ )3-Amino-1,2-propanodiol con ácido oleico .....	87
<b>Tabla 12.</b>	Coefficientes de actividad calculados para los productos (1) y (2) y la conversión obtenida para cada uno en su síntesis enzimática .....	87
<b>Figura 28.</b>	Características biofísicas de las corrientes registradas en células espermatoogénicas de ratón .....	90
<b>Figura 29.</b>	Estructuras de la capsaicina, del capsiato y de la VAM .....	90
<b>Figura 30.</b>	Efecto inhibitorio de la capsaicina sobre las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T .....	91
<b>Figura 31.</b>	Curso temporal del ensayo de inhibición de las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T.....	92
<b>Figura 32.</b>	La capsaicina inhibe las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T sin interactuar con el sensor de voltaje .....	93
<b>Figura 33.</b>	Trazos escalados de la corriente control y de la corriente en presencia de capsaicina .....	94
<b>Figura 34.</b>	Dependencia de voltaje de la inhibición de las corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T con capsaicina (50 $\mu\text{M}$ ) .....	95
<b>Figura 35.</b>	Curva dosis-respuesta de la capsaicina en los CCTDV .....	96
<b>Figura 36.</b>	Corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T remanentes al aplicar los compuestos.....	97
<b>Figura 37.</b>	Registros de las corriente de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T en condiciones control y en presencia de Olvanil 50 $\mu\text{M}$ .....	98

**Figura 38.** Contornos topográficos de la VAmC8 y VAmC10 en HPLC.. 98

**Figura 39.** Registros de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T obtenidos en la  
evaluación de la los capsaicinoides sintetizados ..... 99

**Figura 40.** Gráfica Pungencia-Inhibición de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T..101

## ABREVIATURAS

$\gamma$ , coeficiente de actividad.

$\gamma^\infty$ , coeficiente de actividad a dilución infinita.

$\tau_{act}$ , constante activación.

$\tau$ , constante de tiempo.

$\mu\text{M}$ , micromolar.

**2M2B**, 2-metil-2-butanol.

**3APDOH**, ( $\pm$ )3-amino-1,2-propanodiol.

**5-HT**, 5-Hidroxi-triptamina (serotonina).

**AcC10**, ácido cáprico.

**AcC8**, ácido caprílico.

**ACN**, acetonitrilo.

**AcOle**, ácido oléico.

$a_i$ , actividad termodinámica de la especie química  $i$ .

**ASOG**, Analytical-Solution-Of-Groups.

**ATP**, trifosfato de adenosina.

**BAmC10**, bencilamida del ácido cáprico.

**BEsC10**, benciléster del ácido cáprico.

**BOH**, alcohol bencílico.

**CCDV**, canales de calcio dependientes de voltaje.

**CCTDV**, canales de calcio tipo T dependientes de voltaje.

**CGPR**, péptido relacionado al gen de calcitonina.

**cm**, centímetro.

**DHP**, dihidropiridinas.

**DIPEA**, diisopropiletilamina.

**DMF**, dimetil formamida.

**DMSO**, dimetil sulfóxido.

**DNA**, ácido desoxiribonucleico.

**Do**, Dortmund.

**DRG**, ganglio de la raíz dorsal.

**EtAc**, acetato de etilo.

**GABA**, ácido  $\gamma$ -amino butírico.

**gr**, gramo.

**HEX**, n-hexano.

**HPLC**, cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

**hrs**, horas.

**IBTU**, N-(4-clorobencil)-N-(4-hidroxi-3-yodo-5-metoxibencil)tiourea.

**IC<sub>50</sub>**, concentración que inhibe el 50% del efecto.

**ICa<sub>T</sub>**, corriente de Ca<sup>2+</sup> tipo T.  
**k<sub>cat</sub>**, número de recambio (moles de sustrato transformadas por mol de enzima por segundo).  
kDa, kilodaltones.

**kHz**, kilohertz.

**K<sub>m</sub>**, constante de Michaelis-Menten.

**k<sub>uncat</sub>**, número de recambio en sentido inverso de la reacción.

**MΩ**, megaOhms.

**M**, molar.

**mg**, miligramos.

**min**, minutos.

**mL**, mililitros.

**mm**, milímetros.

**mM**, milimolar.

**ms**, milisegundos.

**mV**, milivoltios.

**Na-HEPES**, (n-[2-hidroxietil] piperazina-N-[2-etanosulfónico]) sal de sodio.

**NGF**, factor de crecimiento neural.

**nm**, nanómetro.

**nM**, nanomolar.

**°C**, grados celsius.

**P**, coeficiente de partición.

**pA**, picoamperios.

**Patch-Clamp**, fijación de voltaje en microáreas de membrana.

**pH**, potencial de hidrógeno.

**pS**, picosiemens.

**RMN**, resonancia magnética nuclear.

**rpm**, revoluciones por minuto.

**S<sub>n</sub>2**, sustitución nucleófila bimolecular.

**TFA**, ácido trifluoroacético.

**TLC**, cromatografía de capa fina.

**TRPV1**, receptor de capsaicina (Transient Receptor Potential Vanilloid 1).

**UNIFAC**, UNIQUAC Functional-group Activity Coefficients.

**UNIQUAC**, Universal Quasi Chemical theory.

**VAM**, vainillilamina.

**VAmC10**, vainillilamida del ácido cáprico.

**VAmC8**, vainillilamida del ácido caprílico.

**VAOH**, alcohol vainillílico.

**VEsC10**, vainilliléster del ácido cáprico.

**VLE**, equilibrio vapor-líquido.

**V<sub>m</sub>**, potencial de prueba.

**V<sub>max</sub>**, velocidad máxima de síntesis enzimática.

$X_i$ , fracción molar de la especie química i.

## 1. INTRODUCCION

El avance en las tecnologías para la producción ó el aislamiento de moléculas farmacéuticamente activas tales como la Selección de Alto Rendimiento (High Throughput Screening), la Síntesis de Alto Rendimiento (High Throughput Synthesis) (Ortholand *et al.*, 2004) y la química combinatoria han desplazado en la última década a los métodos tradicionales de selección y desarrollo de fármacos (Butler, 2004; Koehn *et al.*, 2005; Ortholand *et al.*, 2004). Sin embargo, los productos naturales continúan desempeñando un papel preponderante como agentes activos por sí mismos, como precursores de fármacos y como estructuras base para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos. De hecho, los productos biogénicos fueron la base de cerca del 50% de los fármacos introducidos en el mercado en los últimos 20 años. Gracias a su indiscutible diversidad química (Ortholand *et al.*, 2004), continuarán participando de manera fundamental como sustancias activas, y moléculas modelo (Vuorela *et al.*, 2004).

Una de las moléculas naturales que ha recibido particular atención en farmacología por su efectos fisiológicos paradójicos (dolor y analgesia), es la capsaicina, molécula responsable de la pungencia de los chiles. Aunque son usados comúnmente como especia, los chiles también se han empleado desde hace siglos por sus efectos medicinales, principalmente en el tratamiento de trastornos estomacales y como agentes para el control del dolor e inflamación (Janusz *et al.*, 1993). Actualmente se comercializan analgésicos de aplicación local en los que la capsaicina es el único componente activo, siendo las cremas Zostrix® y Axsain® las más populares en Estados Unidos (Schnitzer, 1993).

La necesidad de obtener nuevos analgésicos más efectivos, ó moléculas base con este potencial, como la capsaicina, radica en el gran número de individuos que se ven afectados por síntomas de dolor tanto

agudo como crónico de diversa índole (>25% de la población norteamericana) (Altier *et al.*, 2004). Esto a su vez repercute en costos laborales que resultan de la improductividad de quienes sufren de dolor crónico, costos que, solo en Estados Unidos se estima alcanzaron aproximadamente 90,000 millones de dólares (Altier *et al.*, 2004).

En este sentido, la comprensión del efecto analgésico de la capsaicina y sus derivados cobra relevancia. Este fenómeno se abordó inicialmente diseñando bloqueadores del receptor a capsaicina, el canal iónico TRPV1, (Bley, 2004; Dray *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 2000), que es el responsable de desencadenar la transmisión de la señal dolorosa. Sin embargo, en años recientes otra aproximación se ha comenzado a investigar: la analgesia mediada por canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y en particular por los de bajo umbral de activación tipo T (CCTDV) (Dogrul *et al.*, 2001; Todorovic *et al.*, 2001).

En este contexto, resulta importante encontrar un método eficiente y escalable para la obtención de capsaicina. No obstante, la disponibilidad de esta importante molécula se ve afectada por el bajo contenido de capsaicina en los chiles (<1%), y la pérdida inevitable en cada fase de su extracción, hace necesaria su obtención por métodos sintéticos (Govindarajan *et al.*, 1991; Kurian *et al.*, 2002).

Entre los métodos de síntesis disponibles, los métodos de síntesis química tienen ciertas desventajas debido al incremento en los costos de energía dada la necesidad de emplear frecuentemente temperaturas y presiones altas. Además existe una clara necesidad de desarrollar procesos de producción no contaminantes y amigables con el medio ambiente (Sheldon, 2000). En este sentido, los métodos biocatalíticos de síntesis son cada vez más atractivos para los procesos de producción industrial ya que presentan ventajas sustanciales sobre la síntesis química. Entre estas ventajas se encuentra su naturaleza sustentable debida entre otras características al uso

de temperaturas y presiones cercanas a las ambientales. Esto hace a los procesos más seguros y más limpios ya que generalmente no se requieren de agentes químicos adicionales, y los biocatalizadores pueden ser reciclados.

Por otro lado, las reacciones de transesterificación son de las más comunes en síntesis química ya sea en procesos químicos ó enzimáticos. Como es sabido, en estos procesos intervienen grupos funcionales nucleófilos y electrófilos para realizar la transferencia del grupo acilo. En muchas ocasiones se presenta la necesidad de trabajar con moléculas bifuncionales que contienen dos ó más grupos químicos, generalmente nucleófilos, entre los cuales los grupos alcohólicos y las aminas son bastante comunes. La presencia de varios de estos grupos en la misma molécula dificulta los procesos de esterificación ya que el proceso debe ser discriminatorio para esterificar solo aquellos grupos seleccionados. Esta no es una tarea trivial cuando lo que se desea es acilar un grupo hidroxilo en presencia de un grupo amino, ya que las aminas son más reactivas que los alcoholes y las amidas (producto de la esterificación de una amina) son más estables que los ésteres (producto de la esterificación de un alcohol).

En este trabajo, se propone la resolución biocatalítica quimioselectiva por esterificación de una mezcla de sustratos amina-alcohol, los cuales son precursores de compuestos análogos a la capsaicina. En vista de la capacidad de la capsaicina de inhibir canales de  $Ca^{2+}$  de alto umbral de activación (Balla Z *et al.*, 2001; Bielefeldt, 2000; Bleakman *et al.*, 1990; Docherty *et al.*, 1991; Lo *et al.*, 1995), se pretende evaluar el efecto de dichos análogos en los CCTDV mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (Patch-Clamp).

## 2. ANTECEDENTES

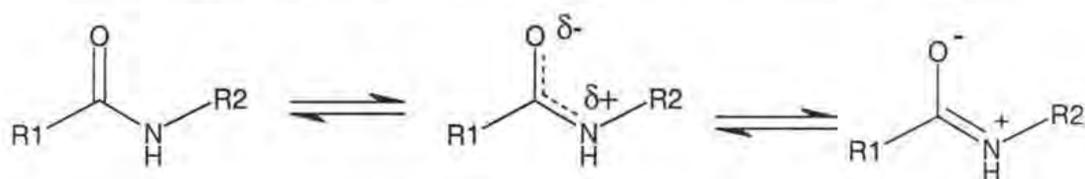
### 2.1 Amidas

#### 2.1.1 Propiedades de las amidas.

Existen cuatro familias químicas derivadas de los ácidos carboxílicos: cloruros, anhídridos, ésteres y amidas. En las amidas, grupo -OH se reemplaza por un grupo -NH<sub>2</sub>. Las amidas tienen puntos de ebullición altos (> 200°C) debido a su alta capacidad de formar puentes de hidrógeno entre ellas y son las moléculas de mayor estabilidad química entre las cuatro familias (Morrison *et al.*, 1998a).

#### 2.1.2 Características del enlace amida.

El doble enlace entre el oxígeno y el carbono se encuentra en resonancia con el nitrógeno. Esta característica le confiere a la molécula, por una parte, la rigidez del enlace, provocando que los tres átomos, C, N y O, se encuentren en un mismo plano. Por otra parte la baja reactividad, característica de las amidas es también originada por esta resonancia que mantiene comprometidos a los electrones del oxígeno y del nitrógeno en este estado. Al orientarse la nube electrónica del nitrógeno hacia el carbono para formar el doble enlace se genera un dipolo más fuerte. Los tres estados estructurales que participan en la resonancia se muestran en la figura 1.



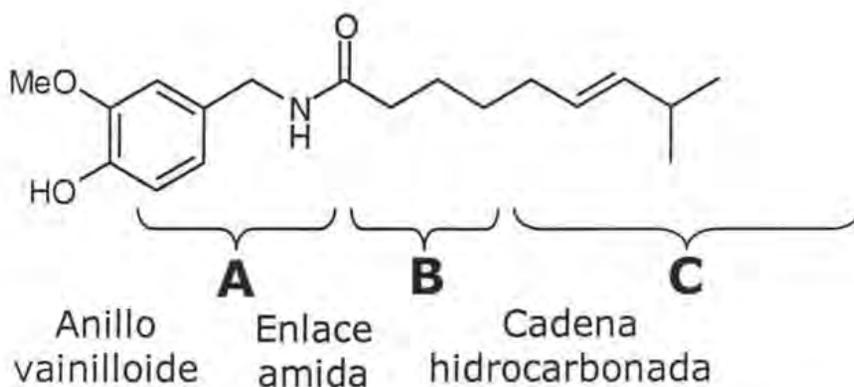
**Figura 1. Estructuras de resonancia de amidas.** La resonancia involucra al nitrógeno el cual contribuye con electrones para formar el doble enlace entre él y el carbono. En este estado, el oxígeno queda en un estado más electronegativo y el hidrógeno más electropositivo dando lugar a un dipolo más fuerte.

### 2.1.3 Relevancia del enlace amida

Las amidas de ácidos grasos se han obtenido generalmente por catálisis química clásica reaccionando aminas ó amoníaco a altas temperaturas con derivados de ácidos carboxílicos (cloruros ó anhídridos) llevándose a cabo una sustitución nucleofílica que requiere de condiciones de reacción relativamente peligrosas. A escala industrial, se obtienen por calentamiento de las sales de amonio de ácidos carboxílicos (Morrison *et al.*, 1998b). Se emplean como lubricantes en la industria de los plásticos (Litjens *et al.*, 1999; Opsahl, 1992), y debido a sus propiedades tensoactivas/surfactantes se utilizan como aditivos en la industria farmacéutica y cosmética (Presenz, 1996; Sivasamy *et al.*, 2001). En el sector farmacéutico, el enlace amida se encuentra presente en el 50% de los fármacos sintéticos, en el 10% de los fármacos naturales (no protéicos) y en el 40% de los fármacos en desarrollo (Henkel *et al.*, 1999). Debido a su estabilidad y baja reactividad, el enlace amida es esencial en la estructura de aminoácidos y proteínas, ya sean enzimas, anticuerpos, canales iónicos u hormonas. Este tipo de moléculas necesariamente coexiste con otras para interactuar y es en este punto donde la presencia del enlace amida se expande a moléculas de naturaleza no protéica generando miles de estructuras diferentes que han dado lugar a la investigación médica y farmacéutica. El enlace amida también se encuentra presente en una molécula de particular interés, la capsaicina, la cual genera la sensación picante en los chiles y en la que se basa el desarrollo del presente trabajo.

### 2.1.4 Capsaicinoides

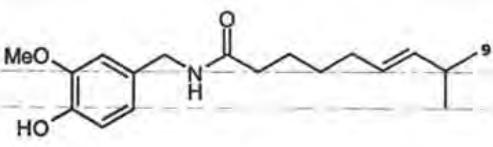
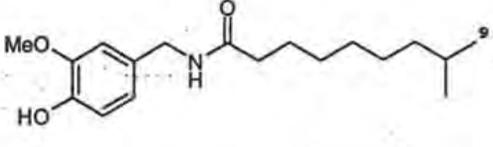
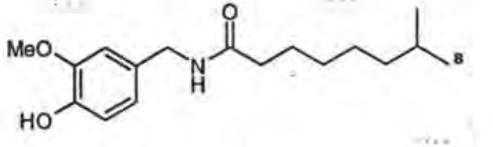
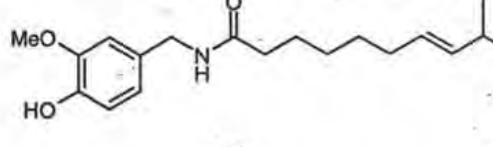
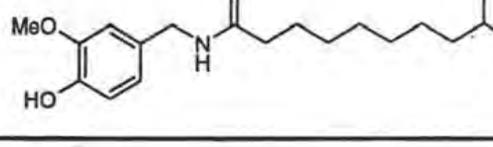
La capsaicina es un alcaloide cristalino responsable del sabor picante de los chiles del género *Capsicum annum* cuya estructura se muestra en la figura 2.



**Figura 2. Estructura de la capsaicina.** Se indican las tres regiones en las que puede dividirse: A) Región del anillo vainilloide, B) Región de enlace y C) Región del acilo. (Walpole *et al.*, 1993a)

Se concentra principalmente en la placenta del fruto (venas). No se alcanza a apreciar olor ni sabor, es ligeramente soluble en agua pero muy soluble en alcohol, grasa y aceites. Los principales capsaicinoides presentes en el extracto cristalino son capsaicina (69%), dihidrocapsaicina (22%) y tres compuestos menores: nordihidrocapsaicina (7%), homocapsaicina (1%) y homodihidrocapsaicina (1%) (DeWitt, 2005). La capsaicina pertenece a la familia de los capsaicinoides, entre los que se encuentran la piperina y el zingeron, de origen natural, que están presentes en la pimienta y el jengibre respectivamente. Dado que la estructura común de todos estos análogos de capsaicina es el anillo vainilloide, el cual es esencial para la actividad biológica, también se les ha dado el nombre de vainilloides (Szallasi *et al.*, 1993). La figura 3 muestra las estructuras de los capsaicinoides naturales presentes en los chiles.

Una de las escalas para medir la pungencia de los chiles es la Scoville en la que 1 ppm de compuesto equivale a 15 unidades Scoville. Los chiles habaneros, considerados los más picantes, poseen de  $1 \times 10^5$  a  $3 \times 10^5$  unidades Scoville.

Compuesto	Estructura	Pungencia (U.Scoville)
Capsaicina		16,000,000
Dihidrocapsaicina		16,000,000
Nordihidrocapsaicina		9,100,000
Homocapsaicina		8,600,000
Homodihidrocapsaicina		8,600,000

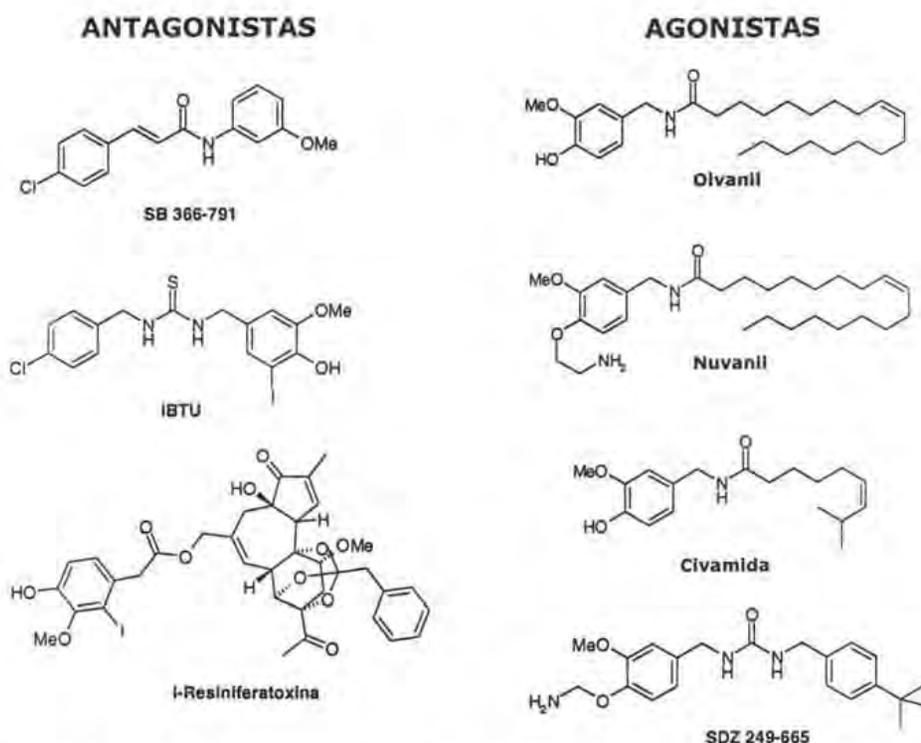
**Figura 3. Capsaicinoides presentes en los chiles.** El número en la estructura indica la longitud de la cadena.

mientras que la capsaicina pura posee  $16 \times 10^6$  (Margen *et al.*, 1992). Aunque son usados comúnmente como especia, los chiles se han empleado desde hace siglos por sus efectos medicinales, principalmente para tratar trastornos estomacales y como agentes locales para el control del dolor e inflamación (Janusz *et al.*, 1993). El aceite de clavo también se usaba para mitigar el dolor de dientes (Lembeck, 1987) en el cual se encuentran presentes la capsaicina y otros de sus análogos estructurales tales como el eugenol. Jancsó y col. (Jancsó *et al.*, 1967) demostraron por primera vez que la capsaicina no solo activa las neuronas sensoriales produciendo dolor, sino que confiere a los mamíferos resistencia a estímulos dolorosos. Aunque existen comercialmente analgésicos de aplicación local con capsaicina en

base emoliente (Zostrix® , 0.025% capsaicina y Axsain® , 0.075% capsaicina) el uso de capsaicina como analgésico sigue siendo limitado por los efectos dolorosos e irritantes que provoca, por su carácter neurotóxico, por la falta de evidencia contundente en su eficacia como analgésico local y por las alteraciones en la presión arterial y la broncoconstricción que induce (Dray *et al.*, 1996; Low *et al.*, 1995; Nolano *et al.*, 1999; Szallasi *et al.*, 1993; Szallasi *et al.*, 1999; Urban *et al.*, 2000).

El bajo contenido de capsaicina en los chiles (0.2-1% peso) y la pérdida inevitable en cada fase de su extracción (Govindarajan *et al.*, 1991; Kurian *et al.*, 2002) hacen necesaria la obtención de esta molécula ó sus derivados por métodos sintéticos para su aplicación comercial. Entretanto, las desventajas del uso de la capsaicina, como analgésico local, se han tratado de superar mediante la síntesis de análogos de capsaicina, que posean las propiedades analgésicas sin los efectos secundarios de la capsaicina. Ejemplos de estos intentos son la síntesis de una variedad de compuestos antagonistas al receptor de capsaicina, el canal TRPV1, algunos de ellos con buenos resultados como el SB-366791 (Gunthorpe *et al.*, 2004), la I-resiniferatoxina (Wahl *et al.*, 2001), el IBTU (Toth *et al.*, 2004) y otros (Lee *et al.*, 2003; Szallasi *et al.*, 2004), los cuales inhiben el fenómeno de dolor. También se han sintetizado compuestos agonistas con actividad analgésica con diferentes grados de pungencia. Entre los que presentan escasa pungencia se encuentran el Olvanil (Appendino *et al.*, 2005; Urban *et al.*, 2000; Wahl *et al.*, 2001) y el SDZ-249-665 (Urban *et al.*, 2000). El Nuvanil (Dray *et al.*, 1996) y la Civamida (Hua *et al.*, 1997; Rapoport *et al.*, 2004) también poseen propiedades analgésicas pero provocan sensaciones picantes o irritantes. Las estructuras de estos compuestos se muestran en la figura 4. Sin embargo, la complejidad del fenómeno de nocicepción (dolor) (Benham *et al.*, 2002; Besson *et al.*, 1987; Clapham, 2003; Di Marzo *et al.*, 2002; Gunthorpe *et al.*, 2002; Millan, 1999; Szallasi *et al.*, 1996; Szallasi *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2005), así como resultados no concluyentes e incluso contradictorios respecto a la combinación de factores necesarios para

entender la coexistencia de los diferentes tipos de nocicepción y la analgesia (Low *et al.*, 1995), debidos posiblemente a las diversas metodologías usadas para evaluar los compuestos, hacen necesario realizar mas investigación al respecto.



**Figura 4. Estructuras de compuestos sintéticos que actúan sobre el receptor de capsaicina, el canal TRPV1.** Los compuestos agonistas activan el canal y los antagonistas impiden o interrumpen el estado activado. La analgesia causada por los agonistas probablemente se deba a la cinética de las corrientes que cada compuesto genere. La analgesia provocada por los antagonistas es por inhibición competitiva en el sitio de unión con el agonista.

### 2.1.5 Síntesis enzimática de amidas

En vista de la necesidad de obtener capsaicina ó sus análogos de manera práctica y en cantidades suficientes para su uso industrial surgen las alternativas química y biocatalítica para su producción. El incremento en los costos energéticos desfavorecen la síntesis química ya que temperaturas y presiones altas son comunes en muchos procesos de síntesis química. En años recientes y como respuesta a la necesidad de legislar sobre el impacto

ambiental que ocasiona la industria manufacturera, ha crecido el interés en productos producidos con tecnologías de bajo impacto ambiental y con materias primas renovables (Committee on Biobased Industrial Products *et al.*, 1999). Este interés ha hecho que los métodos biocatalíticos de síntesis sean cada vez más las vías de producción preferidas. El uso de enzimas para síntesis orgánica es una práctica que se encuentra ampliamente documentada (Drauz *et al.*, 2002; Faber, 2000; Patel, R. N., 2000), en particular el de las enzimas hidrolíticas tales como proteasas, esterasas y lipasas. Esto es debido, por un lado, a su alta disponibilidad y estabilidad, a la viabilidad termodinámica de las reacciones inversas y al hecho de que aceptan una gran variedad de sustratos, además de que por lo general poseen alta selectividad (Bornscheuer, U.T. *et al.*, 1999; Schmid *et al.*, 1998).

La síntesis enzimática de amidas surgió como una alternativa a la síntesis química y requiere necesariamente de un medio diferente al acuoso (Bordusa, 2002; Bousquet *et al.*, 1999; West *et al.*, 1990; Zacks *et al.*, 1985). El agua es el medio natural de funcionamiento de las enzimas, sin embargo en el contexto de química industrial, tiene un bajo perfil como solvente ya que la mayoría de compuestos orgánicos de interés comercial son poco solubles en agua o inestables en ella. De hecho, se requiere de un medio orgánico anhidro para minimizar la hidrólisis e inducir la síntesis (Bordusa, 2002; Pedersen *et al.*, 2002). La síntesis enzimática presenta las siguientes ventajas :

- Permite obtener velocidades de reacción más rápidas ( $k_{cat}/k_{uncat}$  hasta  $10^{17}$ ) que en ausencia de biocatalizador (García-Junceda *et al.*, 2004; Koeller *et al.*, 2001).
- Se requieren condiciones de reacción más suaves que en las síntesis química. Esto se traduce en procedimientos más limpios, seguros y económicamente más atractivos. (Sheldon *et al.*, 2004)

- Las enzimas presentan estereo- y regioselectividad y es posible manipular estas propiedades mediante modificaciones al medio de reacción (Sellek *et al.*, 1999; Sheldon *et al.*, 2004; Wescott, C. R. *et al.*, 1997). Esto evita la necesidad de la protección de grupos moleculares, requisitos en la síntesis química (Sheldon *et al.*, 2004).
- El biocatalizador se puede reciclar (Carrea *et al.*, 2000).

En medios orgánicos en particular, las ventajas de la síntesis enzimática son:

- Es posible solubilizar especies hidrofóbicas y eliminar reacciones secundarias que ocurren en medios acuosos. (Carrea *et al.*, 2000; Ghanem *et al.*, 2005; Klivanov, A.M., 2003; Klivanov, A. M., 2001; Rahman *et al.*, 2005; Sellek *et al.*, 1999)
- Se reduce la contaminación microbiana (Carrea *et al.*, 2000; Sellek *et al.*, 1999).

El primer trabajo sobre el uso de enzimas hidrolíticas para la producción de amidas a nivel industrial (N-acilación de aminoácidos) lo reportó la compañía Novo-Nordisk (Godtfredsen *et al.*, 1990). Posteriormente la compañía Henkel KGAA reportó N-acilaciones de aminoácidos, hidrolizados de proteínas y/o sus derivados, usando lipasas y proteasas como catalizadores (Vonderhagen *et al.*, 1999).

En trabajos subsecuentes se reportó la evaluación de la capacidad de las proteasas y amidas para sintetizar aminoácidos y péptidos (Bradbury *et al.*, 1991). Las desventajas de las proteasas en la síntesis de amidas en solventes orgánicos son su alta preferencia por aminoácidos como sustratos y su labilidad ante solventes y temperatura (Bordusa, 2002; Maugard *et al.*, 1997). De hecho, la disminución en actividad catalítica es con frecuencia la principal desventaja no solo en el uso de proteasas sino también para el resto de las hidrolasas (Klivanov, A. M., 1997). A pesar de estas desventajas

se han llevado a cabo algunos trabajos exitosos de síntesis de amidas con proteasas en solventes orgánicos (Bordusa, 2002; Clapes *et al.*, 1999; Piera *et al.*, 2000).

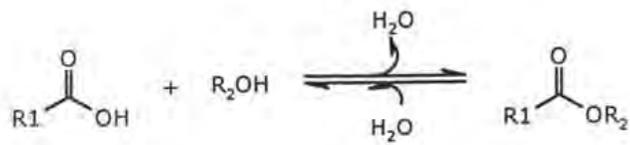
La contribución de las amidasas en la síntesis de amidas en solventes orgánicos está representada principalmente por las penicilinas amidasas G y V que se han empleado para sintetizar antibióticos  $\beta$ -lactámicos a partir del ácido 6-amino-penicilánico o del ácido 7-amino-desacetoxi-cafalosporánico con donadores de acilo específicos (Kallenberg *et al.*, 2005). Las amidasas también se han empleado para la resolución de aminas quirales (Van Rantwijk *et al.*, 2004) y para transacilación (Fournand *et al.*, 2001). Uno de los primeros investigadores en documentar esta última actividad fue Grossowicz al sintetizar ácidos hidroxámicos (RCONHOH) mediante la sustitución de los grupos amido de la glutamina y asparagina con hidroxilamina empleando extractos de *Proteus Vulgaris X-19* (Grossowicz *et al.*, 1950). En otro estudio, Thiery y col. reportaron la capacidad de la amidasa de *Rhodococcus sp R312* para transferir acilos de amidas, ácidos y ésteres a la hidroxilamina dando lugar a los ácidos hidroxámicos correspondientes y amonio (Thiéry *et al.*, 1986). Más recientemente, Kobayashi y col. lograron sintetizar hidrazidas con la amidasa de *Rhodococcus rhodocrous J1* mediante la transferencia del acilo de un amida a la hidrazina (Kobayashi *et al.*, 1999).

Por otro lado, la aplicación de esterases a la síntesis de amidas no ha sido reportada, a pesar de poseer esta actividad. Sin embargo, su uso en la industria alimentaria, de perfumes y farmacéutica ha sido significativa para la producción de ácidos carboxílicos, precursores de compuestos aromáticos y fármacos quirales (Panda *et al.*, 2005). Por ejemplo, la esterasa de *Trichosporon brassicae* y de *Pseudomonas sp. S34* se han usado para la resolución de la mezcla racémica (*S*)- y (*R*)-cetoprofeno, donde el enantiómero (*S*)- es efectivo como antiinflamatorio y analgésico en casos de artritis, quemaduras por exposición solar, menstruación y fiebre, y

el enantiómero (*R*)- como aditivo en cremas dentales para prevenir enfermedades periodontales (Kim, G. J. *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2002). Las esterasas, a diferencia de las lipasas, aceptan preferentemente como sustratos a ésteres solubles en agua o triglicéridos de cadena corta como la tributirina (Bornscheuer, U. T. *et al.*, 2002), poseen una moderada enantioselectividad, y para efectos de este trabajo su preferencia por acilos de cadena corta (hasta 6 C) es una desventaja (Bornscheuer, U. T., 2002).

En este contexto, las lipasas por la naturaleza de su actividad catalítica son una mejor opción que las esterasas y las proteasas para la biosíntesis en solventes orgánicos. Esto es debido a su mayor estabilidad en solventes y su capacidad de aceptar una amplia diversidad de sustratos, catalizando biotransformaciones en las que interviene el grupo carboxilo como son la esterificación, la transesterificación, la perhidrólisis y la aminólisis usando nucleófilos como alcoholes, hidroperóxidos o aminas (Rantwijk *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 1998). En la figura 5 se presentan las diferentes reacciones catalizadas por lipasas.

### Síntesis



### Hidrólisis

### Transesterificación

#### Acidólisis



#### Alcoholólisis



#### Interesterificación



#### Tiólisis



#### Aminólisis



#### Amoniólisis



Figura 5. Reacciones de síntesis catalizadas por lipasas.

### 2.1.6 Síntesis enzimática de capsaicinoides.

La importancia de la capsaicina y de sus derivados como moléculas de estudio y agentes analgésicos, ha generado el interés por sintetizar estas moléculas, sin embargo, pocos son los reportes en la literatura sobre síntesis enzimática de capsaicinoides. La síntesis enzimática de capsaicinoides, además de nuestro Grupo, se ha reportado en la literatura solamente por Kobata y colaboradores. Este grupo realizó una selección de enzimas y sintetizó capsaicinoides empleando vainililamina y ésteres de ácidos grasos libres (Kobata *et al.*, 1998a) ó aceites naturales (Kobata *et al.*, 1998b) obteniendo amidas análogas a capsaicina (capsaicinoides) con longitud de cadena 4, 6, 14 y 18:1 (Olvanil), 18:2 y 18:3. No obstante que sus primeros reportes son de síntesis en dos fases (acuosa y orgánica), y en promedio obtuvieron bajas conversiones (9-20%), las conversiones obtenidas con la lipasa B de *Candida antarctica* y la lipasa de *Burkholderia cepacia* fueron relativamente aceptables (50% y 59% respectivamente). Posteriormente, una vez seleccionada a la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en resina acrílica (Novozym 435) como la mejor lipasa para sus síntesis, realizaron transacilaciones en n-hexano entre capsaicina y diferentes donadores de acilo (Kobata *et al.*, 1999). Sus resultados muestran que para la producción de Olvanil, el uso de aceite de oliva como donador de acilo (dada su alta proporción -83%- de ácido oléico) genera una mejor conversión (62%) que el uso de otros donadores de acilo. En un trabajo reciente de síntesis enzimática de capsaicinoides en solventes orgánicos, Kobata y col. sintetizaron ésteres análogos de capsaicina (capsiatos) y analizaron el efecto del solvente, de la proporción de sustratos, del contenido de agua, y del tipo de donador de acilo en la conversión de las reacciones enzimáticas (Kobata *et al.*, 2002). Este grupo reportó un importante efecto en la conversión al cambiar las proporciones de los sustratos, efecto que pierde importancia cuando se incluye tamiz molecular (perlas) en la reacción para absorción de agua. Respecto al tipo de donador

de acilo, se obtienen prácticamente las mismas conversiones con donadores de acilo de diferente longitud de cadena.

En nuestro grupo de trabajo, Reyes D. inició la línea de estudio de la síntesis e hidrólisis de capsaicinoides de cadena larga en solventes orgánicos (Reyes-Duarte, 2002); obtuvo conversiones de aminas a amidas cercanas al 100% en 2-metil-2-butanol y de 65-75% en n-hexano. Se obtuvieron conversiones variables en la síntesis de ésteres a partir de alcoholes en 2-metil-2-butanol y de 60-70% en n-hexano. Torres G., también en nuestro grupo de trabajo, sintetizó capsaicinoides en 2-metil-2-butanol variando la longitud de la cadena y los sustituyentes del anillo vainillílico encontrando, en congruencia con Kobata, que la longitud de cadena no influye en la conversión al equilibrio (Torres, 2004). También reportó que los sustituyentes en el anillo vainilloide pueden estar ejerciendo impedimentos estéricos dado que se observa una disminución en la velocidad de síntesis al aumentar el volumen de los sustituyentes.

## 2.2 Lipasas

Las lipasas se pueden obtener de microorganismos, plantas y animales superiores, sin embargo el 80% de las lipasas comercialmente disponibles son de origen fungal o bacteriano (Schmid *et al.*, 1998). De los 6 grupos en que se clasifican las enzimas, las hidrolasas son el grupo que incluye al mayor número de enzimas de aplicación industrial (>80%). Este grupo incluye a las lipasas. Las lipasas catalizan reacciones de hidrólisis de triacilglicéridos produciendo ácidos grasos libres, monoacilglicéridos, diacilglicéridos y glicerol (Patel, M. T. *et al.*, 1996). De acuerdo al sistema numérico categórico de EC ((NC-IUBMB), 1999) las lipasas están clasificadas como triacilglicerol lipasas (EC 3.1.1.3) dentro del grupo de las hidrolasas de ésteres carboxílicos (EC 3.1.1), es decir, sus sustratos

naturales son los triacilgliceroles ó triglicéridos. A diferencia de la esterasas, las lipasas hidrolizan ésteres de cualquier longitud de cadena

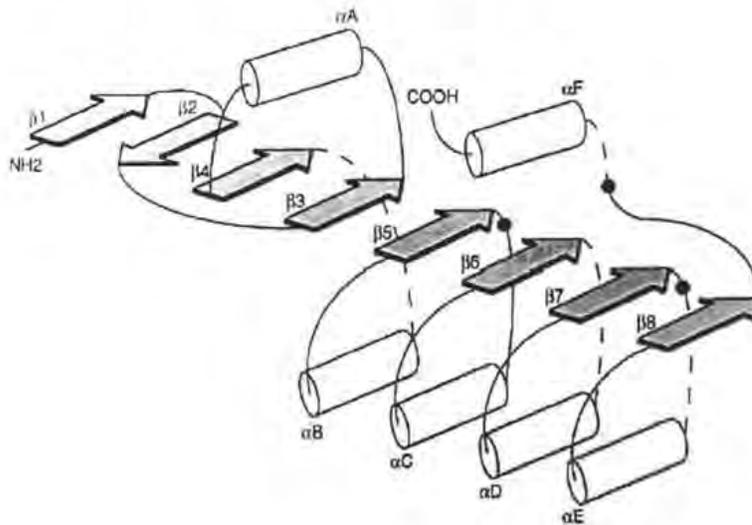
### 2.2.1 Características estructurales de las lipasas

La mayoría de las lipasas poseen un peso molecular que se ubica en el rango de 19 a 40 kDa (Holmquist, 2000) y tienen una estructura terciaria característica. De manera general, para efectuar la catálisis, primero ocurre un fenómeno llamado "activación interfacial", que consiste en un rearrreglo conformacional en su estructura involucrando principalmente el desplazamiento de una "tapa" oligopeptídica anfifílica que cubre el sitio activo, la cual, en presencia de una interfase orgánica-acuosa ó solo orgánica lo deja expuesto a la entrada del sustrato (Berglund, 2001; Schmid *et al.*, 1998). En cierto momento se pensó diferenciar a las lipasas de las esterasas por fenómeno de "activación interfacial", sin embargo se encontraron lipasas, como la lipasa B de *Candida antarctica*, la de *Pseudomonas glumae* y *Pseudomonas aeruginosa* que no presentan activación interfacial (Krishna *et al.*, 2002).

La gran estabilidad de las lipasas en solventes orgánicos está relacionada con su estructura, particularmente por la alta proporción de aminoácidos hidrofóbicos expuestos cuando el sitio activo se vuelve accesible, provocando de esta manera, que la región de unión a la interfase se convierta en una zona más apolar (Verger, 1997).

Estructuralmente, las 11 lipasas cuyas estructuras han sido resueltas, presentan un plegamiento típico de las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas, el cual consiste generalmente en 8 hebras  $\beta$  que corren paralelas excepto la segunda, separadas una de otra por hélices  $\alpha$  como se muestra en la figura 6. Su sitio activo esta compuesto por la triada catalítica Ser-His-Asp/Glu característica

de la serin-hidrolasas y por varios residuos oxianión estabilizadores (Figura 7) (Bornscheuer, U.T. *et al.*, 1999).



**Figura 6. Estructura  $\alpha$ - $\beta$  hidrolasa característica de las lipasas.** Las hélices  $\alpha$  están representadas por cilindros y las hojas  $\beta$  por flechas. La posición de los residuos del sitio activo se muestra con un círculo. La Ser es el residuo indicado inmediatamente después de la hoja  $\beta$ 5. El residuo Asp/His se encuentra después de la hoja  $\beta$ 7 y la His se localiza entre la hoja  $\beta$ 8 y la  $\alpha$ F. Tomado de (Jaeger *et al.*, 1999)

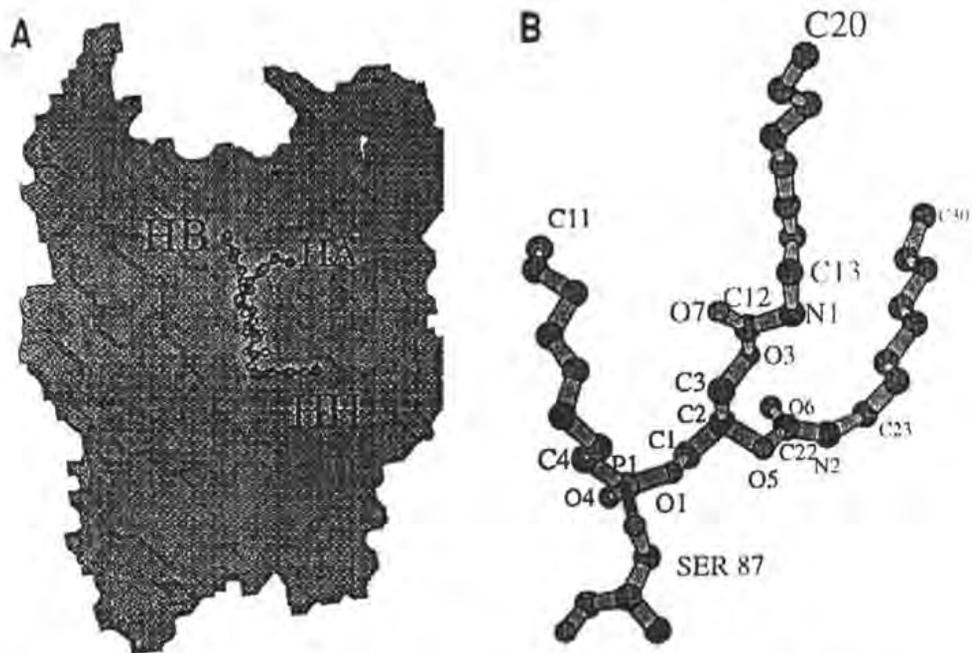
La serina nucleófila está localizada en un pentapéptido altamente conservado, Gly-X-Ser-X-Gly, en el pronunciado doblez entre de la hebra  $\beta$ 5 y la hélice  $\alpha$ C; el aspartato ó glutamato se encuentra justo después de la hebra  $\beta$ 7 unido por puente de hidrógeno a la His, la cual se encuentra cerca del carbono terminal después de la hebra  $\beta$ 8 (Bugg, 2004; Jaeger *et al.*, 1999).



**Figura 7. Representación tridimensional de la lipasa B de *Candida antarctica* cristalizada con Tween 80 (azul claro) como inhibidor.** La triada catalítica Asp-His-Ser se muestra en amarillo, rojo y azul oscuro respectivamente y las interacciones con el inhibidor se indican con líneas. También se señalan las interacciones que forman el intermediario tetraédrico y los oxianiones formados por la Gln106 y Thr40. La representación mostrada es una visualización realizada

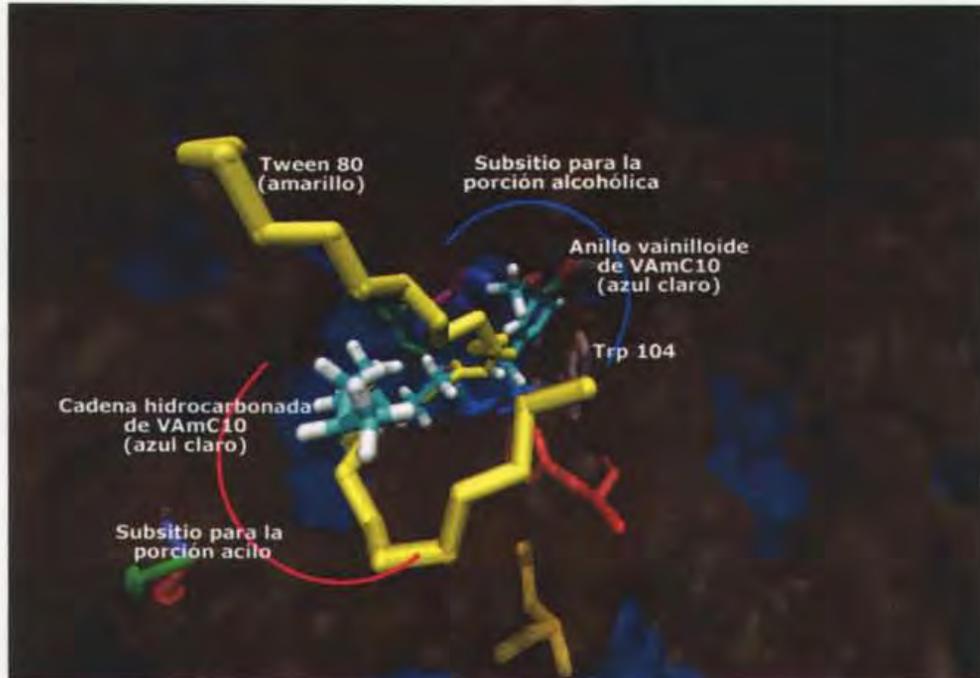
en el programa "Visual Molecular Dynamics" del Theoretical and Computational Biophysics Group de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign. La enzima fue cristalizada con Tween 80 por Uppenberg y col. (Uppenberg *et al.*, 1995).

Lang y col. identificaron en la lipasa de *Burkholderia cepacia* tres subsitios alrededor del sitio activo que sirven de receptáculos a los triacilglicerolos: un agujero oxianión que sirve para estabilizar el intermediario tetraédrico y tres subsitios o "bolsas" que alojan a los ácidos grasos unidos en las posiciones sn-1, sn-2 y sn-3 (Lang *et al.*, 1998a; Lang *et al.*, 1998b). Estos subsitios se presentan en la figura 8. El subsitio para la posición sn-3 es una gran ranura hidrofóbica, en la que se acomoda el acilo. Los subsitios para las posiciones sn-2 y sn-1 conforman un subsitio para la recepción de la parte alcohólica donde el subsitio para la posición sn-1 es más pequeño; ambos subsitios contienen residuos hidrofóbicos e hidrofílicos.



**Figura 8. Tres subsitos en la lipasa de *Burkholderia cepacia*.** Se muestra a un inhibidor trioctil unido covalentemente al O<sub>γ</sub> de la Ser87. **(A)** Mapa de superficie de la lipasa de *Burkholderia cepacia* que muestra al inhibidor unido en una conformación de tenedor. El subsitio HA aloja a la cadena sn-3 del ácido graso. El subsitio HH acomoda a la cadena sn-2 del ácido graso y el subsitio HB une la cadena sn-1. **(B)** Vista magnificada del inhibidor que muestra la unión covalente entre el inhibidor y la enzima. Los átomos C4-C11 constituyen la cadena sn-3, los átomos N1-C20 constituyen la cadena sn-1, y los átomos N2-C30 la cadena sn-2. Tomado de (Lang *et al.*, 1998b)

En otros estudios, Uppenberg y col. identificaron una estructura similar para la lipasa B de *Candida antarctica* formada por dos "túneles" de diferente longitud casi paralelos que parten desde la Ser catalítica hacia la superficie, y en los que la porción del acilo se aloja en el más largo y la porción alcohólica en el más corto (Uppenberg *et al.*, 1995). En la figura 9 se muestra una representación tridimensional de la lipasa B de *Candida antarctica* cristalizada con el surfactante Tween 80 (amarillo) y una superposición de la vainillilamida del ácido cáprico (VAmC10) sintetizada en este trabajo. Cygler y col. por su parte hicieron lo propio para la lipasa de *Candida rugosa* identificando también dos regiones, una para el alojamiento de la porción del acilo y otra para la porción alcohólica (Cygler *et al.*, 1994).



**Figura 9. Subsitios de alojamiento de la parte alcohólica y acilo en la lipasa B de *Candida antarctica* cristalizada con Tween 80 (amarillo).** Vista superior. La vainillilamida del ácido cáprico (VAmC10) sintetizada en este trabajo (en azul claro) se arregló para seguir la conformación del Tween 80. Se señalan con arcos los dos "túneles" para la porción alcohólica y acilo. Se indica en color azul los aminoácidos polares del sitio activo al fondo y en café, los aminoácidos hidrofóbicos de las paredes del sitio activo. La representación mostrada es una visualización realizada en el programa "Visual Molecular Dynamics" del Theoretical and Computational Biophysics Group de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign. La enzima fue cristalizada con Tween 80 por Uppenberg y col. (Uppenberg *et al.*, 1995).

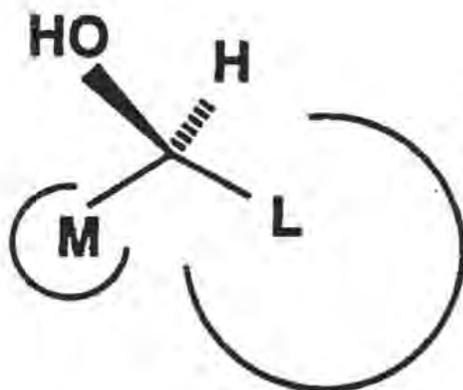
### 2.2.2 Especificidad de las lipasas

En el caso de procesos de síntesis orgánica, un biocatalizador ideal es aquel que puede aceptar una gran variedad de sustratos pero al mismo tiempo mantener una alta enantioselectividad para cada uno. Las lipasas, son de los pocos biocatalizadores que poseen una mejor combinación de ambas características, lo que las coloca con ventajas sobre otras enzimas para procesos biocatalíticos (Cyglér *et al.*, 1994).

En términos de la interacción química entre sustrato y enzima, las lipasas pueden ser: 1) estereoselectivas, 2) regioselectivas, 3) quimioselectivas y 4) tiposelectivas (Charlton *et al.*, 1991).

Las lipasas poseen alta estereoselectividad, que es la capacidad para reconocer determinado enantiómero o diasterómero en una mezcla racémica. Un ejemplo de la capacidad estereoselectiva de las lipasas es la conversión (80%) del ácido mandélico y acetato de vinilo a (S)-O-acetil mandelato con un exceso enantiomérico >98%, catalizado con la lipasa de *Pseudomonas* sp. en éter isopropílico (Strauss *et al.*, 1999a).

Basados en la enantioselectividad, se puede afirmar que la mayoría de las lipasas, excepto las lipasas pancreática porcina y de *Burkholderia cepacia*, favorecen la catálisis de alcoholes alifáticos secundarios y sus derivados (Bornscheuer, U.T. *et al.*, 1999). Dada esta característica, se propuso una regla empírica mostrada en la figura 10 para predecir cual enantiómero tendrá preferencia en reacciones enzimáticas con lipasas. Esta regla se basa en el tamaño de los sustituyentes y postula que la enzima es capaz de reconocer a los enantiómeros de alcoholes secundarios principalmente por efectos estéricos en el acomodo de los sustituyentes en dos subsitios: uno para sustituyentes medianos (M) y otro para sustituyentes grandes (L). Esta regla concuerda con los estudios cristalográficos antes mencionados que identifican subsitios para las porciones acilo y alcohólica. El subsitio para la porción acilo ó de la posición sn-3 corresponde al subsitio definido para los sustituyentes grandes (L) y el subsitio para la porción alcohólica ó de las posiciones sn-2 y sn-1 corresponde a los sustituyentes medianos (M). En un gran número de lipasas el enantiómero (R) es el favorecido para la catálisis.



**Figura 10. Reconocimiento enantiomérico de las lipasas.** La regla empírica predice cual enantiómero de un alcohol secundario reacciona más rápido. M representa un sustituyente de tamaño mediano como CH<sub>3</sub> y L representa a un sustituyente grande como fenol o un carbono tri- o tetra- sustituido. Tomado de (Cygler *et al.*, 1994).

En algunas lipasas los dos enantiómeros son capaces de reaccionar y no se puede lograr una resolución aceptable, mientras que en otras, el enantiómero (S) no es capaz de acomodarse en el sitio. Esto resulta de que la histidina y el oxígeno alcohólico no se encuentren a una distancia suficiente para formar el puente de hidrógeno necesario para inducir la formación del intermediario tetraédrico, lo cual genera excesos enantioméricos cercanos al 100%. Nishizawa y col. demostraron en la hidrólisis de ésteres alcohólicos con la lipasa *Burkholderia cepacia* que la velocidad de reacción de formación del intermediario tetrahédrico es el paso limitante de la enantioselectividad (Nishizawa *et al.*, 1997). También demostraron que los efectos estéricos de los grupos acilo y alcohólico de los ésteres no influyen en la afinidad de los enantiómeros hacia el sitio activo, siendo ambas  $K_m$  muy similares pero sí influyen en la habilidad del enantiómero para formar el puente de hidrógeno entre el oxígeno alcohólico y la His.

Se ha comprobado la aplicabilidad de esta regla en muchos casos en los que se ha incrementado la enantioselectividad de la lipasa mediante el aumento de tamaño del sustituyente grande (L) (Johnson *et al.*, 1991; Rotticci *et al.*, 1997; Scilimati *et al.*, 1988) ó incluso se ha invertido la selectividad haciendo el sustituyente mediano (M) más grande que el sustituyente grande (L) (Shimizu *et al.*, 1992).

La regioselectividad, que es la preferencia por actuar selectivamente en una posición específica de la molécula, también es una característica de las lipasas. Basadas en los triacilgliceroles, la regioselectividad de las lipasas puede ser **a)** sn-1,3 específica o **b)** no específica. La selectividad sn-1,3, que es la que poseen el 60% de las lipasas (Schmid *et al.*, 1998), indica la preferencia a hidrolizar los ésteres en las posiciones 1 y 3 del triglicérido (Schmid *et al.*, 1998; Trius *et al.*, 2000). Dado que cada tipo de enzima evolucionó para las necesidades propias del organismo en que se expresa, la regioselectividad, así como otras propiedades de la enzima dependen fuertemente de la fuente de la lipasa (Nicotra *et al.*, 1989). También se ha observado que la regioselectividad depende en gran medida del medio de reacción (MacManus *et al.*, 1997; Rubio *et al.*, 1991), el nivel de hidratación (Kim, J. E. *et al.*, 1998) y el tipo de sustrato (Rich *et al.*, 1995). Ejemplos de regioselectividad de lipasas en solventes orgánicos son el trabajo de acilación de dioles vecinos en esteroides por Silva y col. (Silva *et al.*, 2005), el de Ferrer y col. quienes realizaron monoacilaciones (>95%) 6-O específicas en azúcares (Ferrer *et al.*, 1999) y la esterificación de streptol presentada por Kroutil y col. (Kroutil *et al.*, 2005).

La quimioselectividad es la propiedad de actuar sobre un grupo funcional determinado en presencia de otro con igual ó diferente reactividad. es otra propiedad útil de las lipasas que puede aprovecharse para resolver mezclas racémicas de alcoholes como lo empleó Nanda y col. (Nanda *et al.*, 2004) obteniendo policetoésteres específicos o amidas surfactantes en lugar de ésteres de acuerdo con Maugard y col.(Maugard *et al.*, 1997).

La tiposelectividad, que es la propiedad de hidrolizar ésteres de ácido graso de determinada longitud y saturación (Vaysse *et al.*, 2002), también se ha empleado para caracterizar lipasas (Caro *et al.*, 2000).

Mediante estudios cristalográficos de la lipasa de *Burkholderia cepacia* se han identificado sitios de unión a los acilos de los triacilgliceroles y la

explicación de la selectividad de esta lipasa se reporta principalmente por efectos estéricos causados por uno de los enantiómeros. Sin embargo, no se puede generalizar este razonamiento a otras lipasas, incluso dentro de la misma familia, porque existen otros factores de los cuales depende la selectividad como la naturaleza química y/o el estado físico de los sustratos (Lang *et al.*, 1998b).

Como podría esperarse, todas estas propiedades de las lipasas se encuentran relacionadas entre si y se influyen mutuamente. Esto se puede observar en el estudio de Salazar y col. (Salazar *et al.*, 1999) quienes reportan que la resolución de 3- $\alpha$  naftoxi-1,2-propanodiol con la lipasa B de *Candida antarctica* mediante hidrólisis, ocurre con alta regioselectividad hacia el alcohol primario y baja enantioselectividad pero mediante acilación reportan moderada regioselectividad y mejor enantioselectividad.

### 2.2.3 Mecanismo cinético de las lipasas

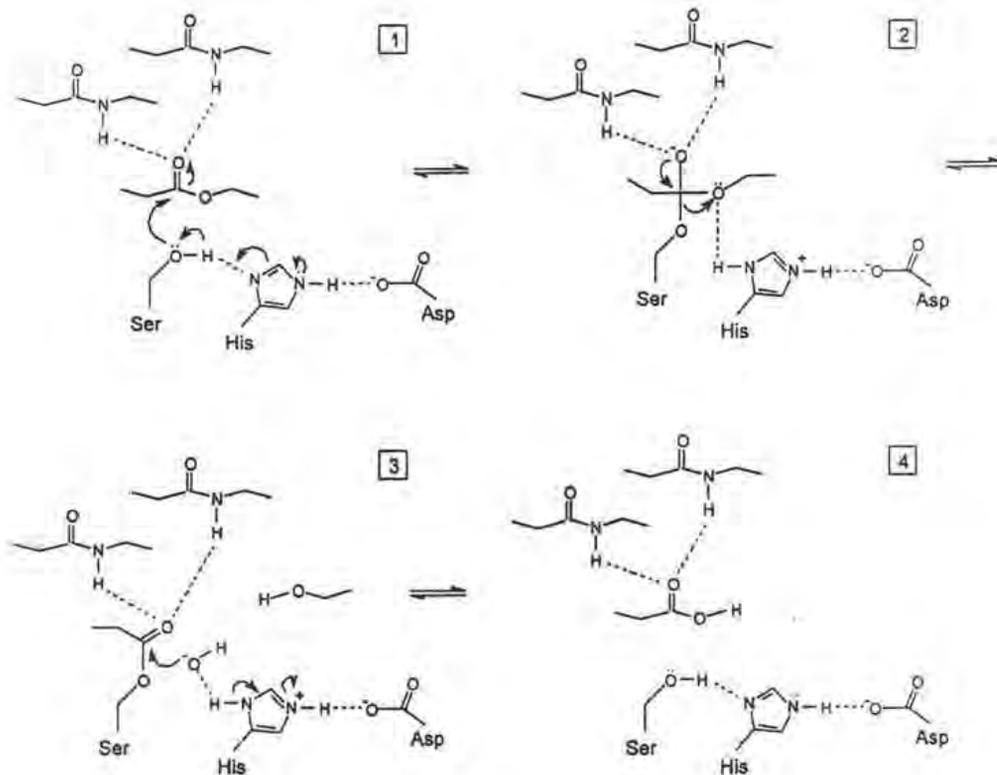
La tríada catalítica Ser-His-Asp/Glu de las lipasas es muy similar a la que presentan las serin-proteasas, lo cual sugiere que la catálisis efectuada por las lipasas procede de la misma manera que en las serin-proteasas.

El comportamiento catalítico de las lipasa se ajusta al modelo de tipo Ping Pong Bi Bi (García *et al.*, 1992), y químicamente es similar a una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ) (Bentley *et al.*, 1996; McMurry, 1994; Morrison *et al.*, 1998a). El modelo Ping Pong Bi Bi establece la entrada de un primer sustrato y la salida de un primer producto seguido de la entrada de un segundo sustrato y la salida de un segundo producto (Segel, 1975).

El mecanismo molecular de la reacción se da en cuatro pasos y se muestra en la figura 11. El primero consiste en el ataque del oxígeno del grupo hidroxilo de la Ser nucleófila al carbono carbonilo activado del enlace

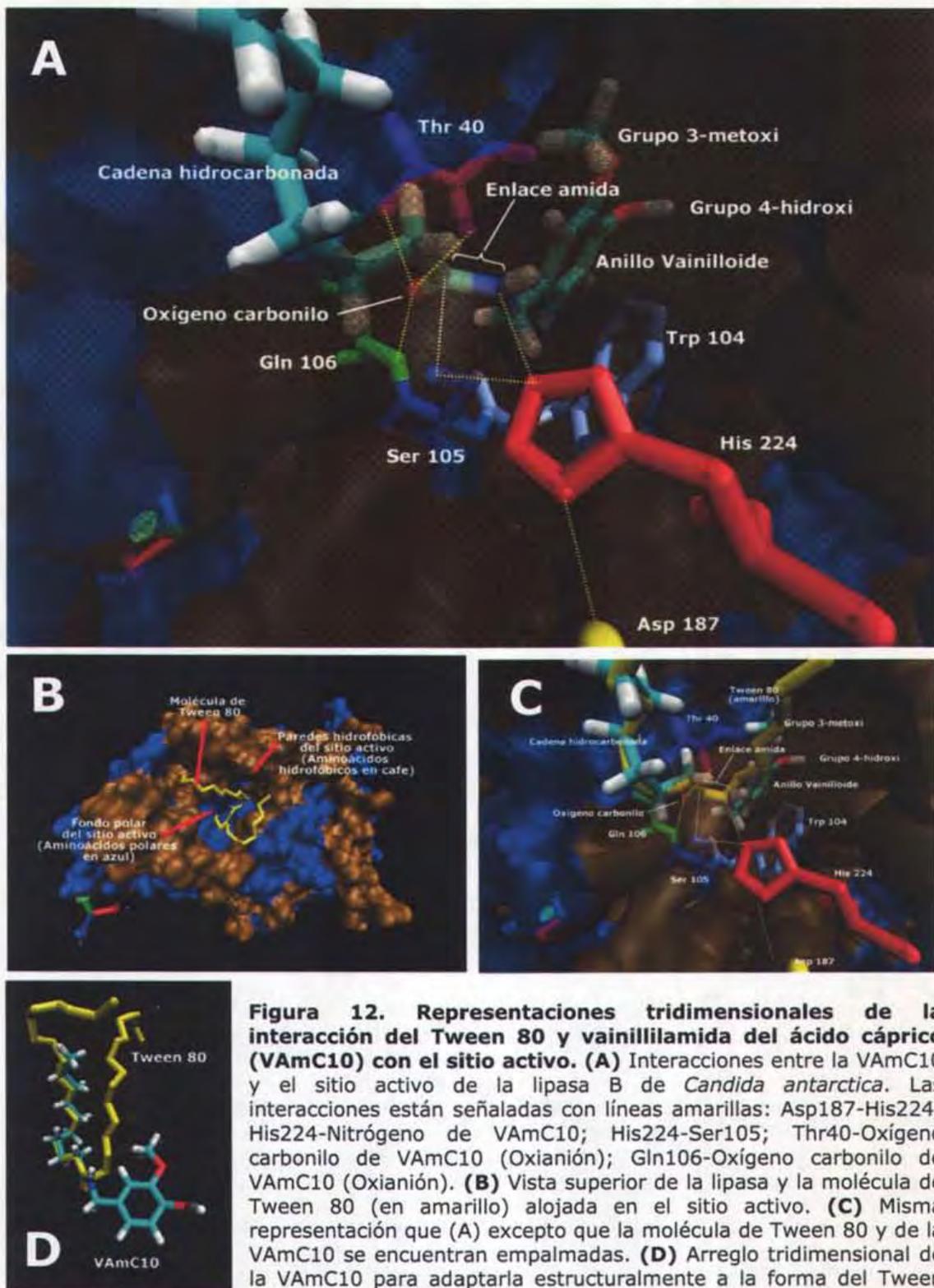
éster del lípido. En el segundo paso se forma un intermediario tetraédrico entre el oxígeno de la Ser, el carbono carbonilo del enlace éster del sustrato, el oxígeno alcohólico del enlace éster y el hidrógeno hidroxilo de la Ser. Este intermediario es estabilizado por un dipolo formado por una de las hélices  $\alpha$  y por al menos dos grupos -NH de cadena principal, que forman un "agujero oxianión". La nucleofilicidad de la Ser se acentúa por la transferencia del protón de su hidroxilo a la His. Esta transferencia se facilita por la presencia del ácido el cual orienta la posición del anillo imidazol de la histidina y neutraliza parcialmente la carga que se genera en él. En la figura 12 se muestran representaciones tridimensionales de las interacciones entre la enzima y Tween 80 (surfactante) y uno de los compuestos sintetizados en este trabajo, la VAmC10.

En el tercer paso, la enzima es esterificada con la porción acilo en la Ser nucleofílica mientras que la porción alcohólica sale como primer producto. Un punto crítico en el mecanismo cinético y que define en parte la enantioselectividad de las lipasas, es la formación del puente de hidrógeno entre el oxígeno alcohólico y la histidina. Cuando un enantiómero (R) entra al sitio activo el oxígeno alcohólico queda posicionado a una distancia favorable para formar este puente de hidrógeno y por lo tanto favorece la formación del intermediario tetraédrico. Un enantiómero (S) adopta una conformación similar a la del (R) pero el oxígeno alcohólico se orienta en dirección opuesta a la His a una distancia mayor lo que dificulta ó imposibilita la formación del intermediario tetraédrico (Cygler *et al.*, 1994; Jaeger *et al.*, 1999; Lang *et al.*, 1998b; Uppenberg *et al.*, 1995).



**Figura 11. Mecanismo molecular de la catálisis de las serín-hidrolasas.** El primer paso es el ataque nucleofílico del oxígeno de la Ser al carbono carbonilo del sustrato. Este ataque da lugar al segundo paso en el que se forma un intermediario tetraédrico. En el tercer paso el grupo alcoholico del sustrato se libera como primer producto, quedando esterificada la enzima en la Ser. En el cuarto paso, el nucleófilo entrante, intercambia un protón con la Ser por el acilo y sale como segundo producto.

El cuarto paso consiste en la desacilación, en el que el segundo sustrato, una molécula de agua ú otro nucleófilo hidroliza el éster en la Ser. La His activa al sustrato nucleófilo por la toma de uno de sus protones. El ión resultante ataca al carbono carbonilo del grupo acilo unido covalentemente a la Ser, formando nuevamente un intermediario tetraédrico. La His dona el protón tomado del sustrato nucleófilo al oxígeno de la Ser, la cual libera el acilo esterificado como segundo producto de la reacción quedando la enzima nuevamente lista para otro ciclo catalítico (Jaeger *et al.*, 1999; Uppenberg *et al.*, 1995).



**Figura 12. Representaciones tridimensionales de la interacción del Tween 80 y vainillilamida del ácido cáprico (VAmC10) con el sitio activo.** (A) Interacciones entre la VAmC10 y el sitio activo de la lipasa B de *Candida antarctica*. Las interacciones están señaladas con líneas amarillas: Asp187-His224; His224-Nitrógeno de VAmC10; His224-Ser105; Thr40-Oxígeno carbonilo de VAmC10 (Oxianión); Gln106-Oxígeno carbonilo de VAmC10 (Oxianión). (B) Vista superior de la lipasa y la molécula de Tween 80 (en amarillo) alojada en el sitio activo. (C) Misma representación que (A) excepto que la molécula de Tween 80 y de la VAmC10 se encuentran empalmadas. (D) Arreglo tridimensional de la VAmC10 para adaptarla estructuralmente a la forma del Tween 80 en el sitio activo. Visualizaciones realizadas en el programa "Visual Molecular Dynamics" del Theoretical and Computational Biophysics Group de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign. La enzima fue cristalizada con Tween 80 por Uppenberg y col. (Uppenberg *et al.*, 1995).

## 2.3 Resolución quimioselectiva enzimática

Dentro de la biocatálisis, la acilación enzimática es la reacción más común en procesos de transesterificación y amidación. En estos procesos, ya sean químicos o enzimáticos se suele presentar la necesidad de trabajar con moléculas bifuncionales que contienen dos o más grupos funcionales con reactividades iguales ó similares. Si no se controla, la reacción con estas moléculas genera mezclas de isómeros mono- y poliacilados, lo cual se traduce en un incremento en subproductos no deseados. El problema de la quimioselectividad se agudiza particularmente en síntesis de varios pasos en las que se requiere de alta quimioselectividad particularmente en las últimas etapas ya que el costo de producción de la molécula sintetizada se incrementa a medida que avanza el número de etapas del proceso.

Cuando se trata de un proceso químico, estas moléculas requieren un tratamiento muchas veces intrincado para poder hacer reaccionar solo los grupos funcionales deseados. Los inconvenientes crecen cuando se desea hacer reaccionar un grupo hidroxilo en presencia de una amina o de un grupo amida en presencia de un grupo éster ya que las aminas son mas reactivas que los alcoholes y las amidas más estables que los ésteres.

La resolución de moléculas bifuncionales por la vía enzimática, por el contrario, es mucho menos laboriosa que la vía química.

Las lipasas se han utilizado ampliamente para la preparación y resolución de alcoholes y aminas quirales, ésteres, ácidos carboxílicos y lactonas mediante la hidrólisis y transesterificación correspondientes (Klibanov, A. M., 1990; Roberts, 1998; Santaniello *et al.*, 1993; Santaniello *et al.*, 1992) y de compuestos bifuncionales (Gotor, 1999). Ejemplos representativos del uso de lipasas en procesos quimioselectivos son la aminólisis de ésteres acrílicos ó propiólicos con aminas aromáticas mediada

por la lipasa de *Candida cylindracea* ó con aminos alifáticas con la lipasa B de *Candida antarctica* (Gotor, 1999).

En la resolución de aminos quirales, Reetz y col. reportaron la acetilación enantioselectiva de aminos primarias quirales con la lipasa B de *Candida antarctica* y resolución cinética dinámica utilizando paladio como catalizador de racemización (Reetz *et al.*, 1994).

Mattson y col. resolvieron una mezcla racémica de ciclohexan-1,2-diaminas por acilación con octanoato de etilo empleando a la lipasa B de *Candida antarctica* (Mattson *et al.*, 1996). Alfonso y col. reportaron la doble resolución racémica de trans-ciclohexano-1,2-diamina usando metil malonato como donador de acilo y la lipasa B de *Candida antarctica* como biocatalizador (Alfonso *et al.*, 1996).

Respecto a la resolución de aminoalcoholes, Chinsky y col. realizaron monoacilación quimioselectiva de 6-amino-1-hexanol (Chinsky *et al.*, 1989). Por su parte Gotor y col. realizaron la resolución de 2-amino-1-alcoholes quirales con la lipasa pancreática porcina y acetato de etilo como donador de acilo (Gotor *et al.*, 1988). En otro estudio, Bevinakatti y col. resolvieron cinéticamente el N,O-diacetil-2-amino-1-butanol en éter diisopropílico con una transesterificación con n-butanol (Bevinakatti *et al.*, 1990). Algunos aminoalcoholes pueden ser resueltos también por transesterificación con sus carbamatos correspondientes como lo demostró Francalanci y col. (Francalanci *et al.*, 1987).

Como se puede apreciar, la resolución de aminos y de alcoholes quirales, o de moléculas bifuncionales de diferente grado de complejidad se puede realizar por lipasas. En particular la lipasa B de *Candida antarctica* destaca como una de las mejores por su alta estabilidad.

## 2.4 Factores que afectan la síntesis enzimática.

### 2.4.1 Sustratos

Aunque las lipasas evolucionaron para catalizar reacciones con triacilglicéridos, las características estructurales del sitio activo y sus alrededores les permiten aceptar una gran variedad de sustratos. La estructura del sitio activo y los subsitios de reconocimiento definen la especificidad de las lipasas por sus sustratos. Esta especificidad puede dirigirse ya sea hacia cierta longitud de cadena del acilo, o hacia un tipo de grupo saliente o de nucleófilo. El medio de reacción, factores termodinámicos, hidrofiliicidad/ hidrofobicidad del medio y de los sustratos, efectos electrónicos y la actividad de agua también contribuyen a su especificidad.

### 2.4.2 Donadores de acilo.

En cuanto a la tiposelectividad de las lipasas, no es posible llegar a una clasificación definitiva de las mismas debido a las diversas conclusiones reportadas en la literatura. Bjorkling y col. (Björkling *et al.*, 1989) observaron baja especificidad de la lipasa B de *Candida antarctica* hacia ácidos grasos desde C<sub>8</sub> a C<sub>18</sub> al esterificar glucosa. Pleiss y col. (Pleiss *et al.*, 1998) reportaron en el mismo sentido alta actividad de esta enzima para ácidos grasos de cadena corta y mediana pero una menor actividad por los de cadena larga. Igualmente, García-Alles y Gotor reportaron una mayor eficiencia catalítica ( $V_{max}/K_m$ ) en la transesterificación de ésteres de ácidos grasos en butanol para los sustratos con acilos C<sub>6</sub> (García-Alles *et al.*, 1998). Por otro lado Pedersen y col. reportaron una variación significativa en las conversiones cuando la longitud de cadena de los donadores de acilo aumentaba de C<sub>12</sub> a C<sub>18</sub> en la síntesis de ésteres de azúcares y bajas conversiones de ácidos grasos de cadena corta (<C<sub>12</sub>) (Pedersen *et al.*, 2002). Ardhaoui y col. por su parte, no observaron selectividad de esta

lipasa empleando ácidos  $C_{12}$ ,  $C_{16}$  y  $C_{18}$  pero sí una baja conversión con  $C_{14}$  en la acilación de flavonoides (Ardhaoui *et al.*, 2004). Otros grupos han indicado que esta misma lipasa tiene preferencia por ácidos grasos de cadena media ( $C_{12}$  a  $C_{14}$ ) (Min Sin *et al.*, 1998).

### 2.4.3 Nucleófilos

Un nucleófilo es una especie química rica en electrones con tendencia a buscar los núcleos de otra especie pobre en electrones, el electrófilo. Los nucleófilos se usan en química orgánica como moléculas de sustitución que reemplazan a átomos ó grupos en otro compuesto (sustitución nucleofílica). Por tanto, la nucleofilicidad expresa la habilidad de una especie para reaccionar en esta manera. No existe una correlación simple entre la estructura química y el poder nucleofílico ya que la nucleofilicidad depende otros factores como:

- La capacidad de la molécula para donar pares de electrones
- La energía de solvatación del nucleófilo (la cual es influenciada por el solvente)
- La fuerza del enlace químico al electrófilo.
- El tamaño (impedimentos estéricos)
- La electronegatividad del átomo nucleofílico.

Para síntesis química, el poder nucleofílico del nucleófilo es el parámetro que rige primordialmente la velocidad de reacción. La síntesis enzimática por otro lado, presenta factores adicionales que también rigen la velocidad de la reacción. Estos factores, como se ha mencionado, son la rapidez en la formación del intermediario tetraédrico y la capacidad del nucleófilo de ceder su protón a la histidina catalítica y aceptar el acilo.

Todos estos factores los podemos ver involucrados en diversos estudios en los que algunos de ellos tienen mayor peso que otros para determinar la velocidad de la reacción. Por ejemplo, Ohrner y col. no encuentran correlación entre la velocidad de reacción y el poder nucleofílico del nucleófilo y lo atribuye a efectos espaciales (estéricos ó de distancia) que disminuyen la habilidad de donar el protón del nucleófilo a la His catalítica (Ohrner *et al.*, 1996). Hacking y col. en el mismo sentido reporta que no existe una correlación entre poder nucleofílico y velocidad de reacción ya que se muestra que la síntesis enzimática usando hidroxilamina es mayor que con hidrazina, sabiendo que la primera tiene menor poder nucleofílico que la segunda a causa de su menor pKa ( $pK_{a_{NH_2OH}}=6.0$  y  $pK_{a_{H_2NNH_2}}=8.0$ ) (Hacking *et al.*, 2000). Por su lado, Kawamoto y col., en opinión opuesta a los anteriores, reporta que la mayor nucleofilicidad del nucleófilo es el factor principal para la mayor velocidad de síntesis observada (Kawamoto *et al.*, 1999).

También es importante considerar que las diferencias en los métodos de síntesis dificultan hacer alguna generalización de estos resultados.

Una característica general de las lipasas respecto a los nucleófilos, especialmente la lipasa B de *Candida antarctica* es que no poseen actividad detectable para muchos alcoholes ó aminas terciarios (Lutz, 2004).

#### 2.4.4 Solventes

La biocatálisis entró en una etapa de grandes expectativas cuando se demostró que las enzimas podían conservar su actividad en solventes orgánicos. Además de que los solventes orgánicos constituyeron una nueva herramienta para estudiar a las enzimas, con ellos se podía modificar, controlar ó incluso revertir las selectividad de las enzimas (Carrea *et al.*, 1995; Wescott, C.R. *et al.*, 1994). Este fenómeno de selectividad se debe en gran parte a las interacciones moleculares entre las especies químicas en

contacto que dan lugar a la solubilidad. Las interacciones que contribuyen en gran medida a la solubilidad son de tipo hidrofílicas ó hidrofóbicas. Uno de los parámetros de medición más comunes para medir la hidrofobicidad de un solvente es el Coeficiente de Partición (P) y generalmente se emplea su logaritmo (LogP). El coeficiente de partición es una medida de la distribución de una especie química en dos solventes y convencionalmente se emplean octanol y agua. Con estos dos solventes lo que se busca es medir la hidrofobicidad ó hidrofiliidad de una molécula. Se comienza a considerar a una molécula como hidrofóbica cuando su LogP es mayor a 0, e hidrofílica cuando es menor a 0.

Aunque las enzimas conservan su actividad en solventes orgánicos, ésta es mucho menor que la exhibida en sistemas acuosos (Klibanov, A. M., 1997). Se racionalizó este fenómeno atribuyéndolo a problemas difusionales, ya que las enzimas son insolubles en casi todos los solventes orgánicos, a cambios estructurales al entrar en contacto con los solventes, a energías de desolvatación, a la reducida flexibilidad conformacional y al proceso de liofilización. De todos estos factores los problemas difusionales y los cambios estructurales se han descartado como causantes de la baja actividad en solventes orgánicos (Klibanov, A. M., 1997). Esta baja actividad se debe principalmente 1) al proceso de liofilización, uno de los más comunes para crear enzimas en polvo, el cual puede causar su desnaturalización, y 2) la rigidez que adquieren las enzimas en medios anhidros a causa de la disminución en la cantidad de agua les confiere menor movilidad en su mecanismo catalítico. Estos dos factores se pueden minimizar, por un lado, llevando a cabo un proceso de liofilización cuidadoso y en el pH óptimo de la enzima, y por otro, se puede mejorar la flexibilidad de las enzimas en solventes orgánicos puros añadiendo pequeñas cantidades de agua ó co-solventes como el glicerol o el etilen glicol que simulen algunas propiedades del agua

Las diferentes estructuras químicas de los solventes les confieren variadas características químicas referentes a fuerzas de atracción y

repulsión que abrieron interesantes áreas de investigación. Una de estas áreas que se incorporó a la biocatálisis fue la ingeniería de solventes.

### **3. Ingeniería de solventes**

El término "ingeniería de solventes" se refiere a la manipulación de la naturaleza del medio donde se lleva a cabo la reacción, con el fin de influir en las propiedades catalíticas de la enzima ó en el rendimiento global del proceso. En un principio, la sustitución del agua por un solvente orgánico en biosíntesis pareció poco atractiva debido que se sabía que las enzimas se desnaturalizan en medios acuosos-orgánicos. Por lo tanto, en medios puramente orgánicos se esperaría el mismo resultado. Posteriormente se comprobó que esta idea era errónea y el hecho de que las enzimas puedan mantener su estabilidad en medios orgánicos anhidros se debe a que existe, en la enzima o en el solvente, una mínima cantidad de agua, suficiente para dar flexibilidad a la enzima y mantener su actividad catalítica. Las primeras 2-3 capas superficiales de agua en la enzima son las más importantes. Entonces al limitar la cantidad de agua al mínimo necesario para tener la flexibilidad para realizar la catálisis, las enzimas son suficientemente rígidas ante la fuerza desnaturalizante de un solvente orgánico pero al mismo tiempo suficientemente flexibles para ser activas (Klibanov, A. M., 2001).

Existe un número elevado de reportes que muestran cambios en la enantio- y regioselectividad en función de la naturaleza del solvente utilizado (Carrea *et al.*, 2000; Wescott, C.R. *et al.*, 1994). Por ejemplo, Fitzpatrick y col. lograron obtener correlaciones del momento dipolar, la constante dieléctrica y la hidrofobicidad como LogP de los solventes probados con la enantioselectividad de la proteasa Subtilisina Carlsberg en la transesterificación del alcohol quiral sec-fenetil y el butirato de vinilo (Fitzpatrick *et al.*, 1991). Otro estudio interesante sobre la influencia de los

repulsión que abrieron interesantes áreas de investigación. Una de estas áreas que se incorporó a la biocatálisis fue la ingeniería de solventes.

### **3. Ingeniería de solventes**

El término "ingeniería de solventes" se refiere a la manipulación de la naturaleza del medio donde se lleva a cabo la reacción, con el fin de influir en las propiedades catalíticas de la enzima ó en el rendimiento global del proceso. En un principio, la sustitución del agua por un solvente orgánico en biosíntesis pareció poco atractiva debido que se sabía que las enzimas se desnaturalizan en medios acuosos-orgánicos. Por lo tanto, en medios puramente orgánicos se esperaría el mismo resultado. Posteriormente se comprobó que esta idea era errónea y el hecho de que las enzimas puedan mantener su estabilidad en medios orgánicos anhidros se debe a que existe, en la enzima o en el solvente, una mínima cantidad de agua, suficiente para dar flexibilidad a la enzima y mantener su actividad catalítica. Las primeras 2-3 capas superficiales de agua en la enzima son las más importantes. Entonces al limitar la cantidad de agua al mínimo necesario para tener la flexibilidad para realizar la catálisis, las enzimas son suficientemente rígidas ante la fuerza desnaturalizante de un solvente orgánico pero al mismo tiempo suficientemente flexibles para ser activas (Klibanov, A. M., 2001).

Existe un número elevado de reportes que muestran cambios en la enantio- y regioselectividad en función de la naturaleza del solvente utilizado (Carrea *et al.*, 2000; Wescott, C.R. *et al.*, 1994). Por ejemplo, Fitzpatrick y col. lograron obtener correlaciones del momento dipolar, la constante dieléctrica y la hidrofobicidad como LogP de los solventes probados con la enantioselectividad de la proteasa Subtilisina Carlsberg en la transesterificación del alcohol quiral sec-fenetil y el butirato de vinilo (Fitzpatrick *et al.*, 1991). Otro estudio interesante sobre la influencia de los

solventes en las propiedades de la enzima es el realizado por Rubio y col. quienes manipularon la regioselectividad mostrando que en tolueno la butanolisis de 1,4-dibutiriloxi-2-octilbenceno con la lipasa *Burkholderia cepacia* desacila preferencialmente el 4-O-butanoato, mientras que en acetonitrilo el 1-O-butanoato es el preferido (Rubio *et al.*, 1991).

En vista de la importancia de todos estos numerosos e interesantes estudios sobre la modificación de la selectividad de las enzimas en solventes orgánicos, se comenzaron a proponer modelos teóricos predictivos para estas propiedades basados en termodinámica. Sin embargo, aunque solo algunos modelos logran predecir adecuadamente, no pueden generalizarse a otros sistemas (Carrea *et al.*, 2000; Raza *et al.*, 2001). Ke y col. elaboraron un modelo basado en la desolvatación del sustrato con resultados contradictorios (Ke *et al.*, 1996). Por otro lado, de las variantes del modelo que desarrollaron Raza y col. que esta basado en diferencias en la energía libre de Gibbs entre los intermediarios tetraédricos de ambos enantiómeros, solo una variante pudo predecir satisfactoriamente los ensayos realizados (Raza *et al.*, 2001).

#### 4. Coeficiente de Actividad

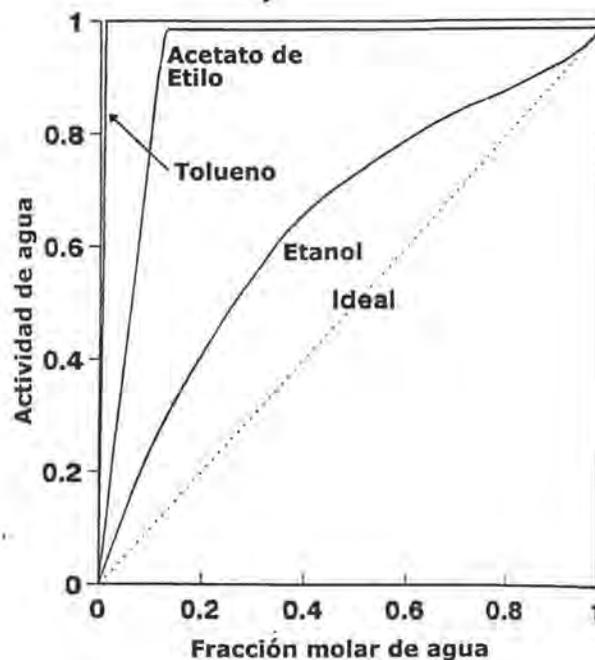
El coeficiente de actividad ( $\gamma$ ) es un parámetro que estima el número de interacciones intermoleculares entre dos ó más especies químicas. Es un factor de ajuste que se emplea para representar comportamientos termodinámicos no ideales de una mezcla de especies químicas. En este sentido, la concentración (o fracción molar,  $X$ ) es el valor total de la cantidad de una especie química que se encuentra presente en una mezcla, y la actividad termodinámica ( $a$ ) es la fracción de la cantidad total de una especie química en una mezcla que se encuentra disponible para participar en cualquier proceso químico ya sea hidratación, solvatación, reacción, absorción, etc. El factor que relaciona estos dos valores (fracción molar y actividad termodinámica) es el coeficiente de actividad como se muestra en la ecuación 1.

$$a_i = \gamma_i X_i \quad 0 < a_i < 1$$

**Ecuación 1. Definición de actividad termodinámica ( $\gamma$ ).**  $a_i$ ,  $\gamma_i$ ,  $X_i$  son la actividad termodinámica, el coeficiente de actividad y la fracción molar del componente  $i$  respectivamente.

El valor de la actividad termodinámica varía entre 0 y 1. El coeficiente de actividad de un componente de una mezcla en solución se hace igual a la unidad cuando éste componente pasa a ser el 100% de la mezcla, es decir que en una sustancia pura la actividad termodinámica es igual a la concentración, y se encuentra disponible en su totalidad para un proceso químico. Cuando el  $\gamma > 1$ , y cuanto más se aleja de este valor, se dice que el componente en cuestión tiene más dificultades para interaccionar con el resto de los componentes y tiende a la inmiscibilidad. Por el contrario, cuando el  $\gamma < 1$  significa que hay más interacciones entre el componente en cuestión y el resto de los componentes del sistema y se traduce en buena solubilidad. Existe un  $\gamma$  particular para soluciones muy diluídas, y es el

coeficiente de actividad a dilución infinita ( $\gamma^\infty$ ). La solución que se considera para calcular el  $\gamma^\infty$  es una sola molécula de la especie 1 diluída en el seno de la especie 2. El  $\gamma^\infty$  representa la mayor no idealidad en un sistema ya que las interacciones de la molécula de la especie 1 solo pueden interactuar con moléculas de la especie 2. Algunos ejemplos de la relación actividad-concentración se muestran en la figura 13.



**Figura 13. Relación actividad-concentración de algunos sistemas de fases acuosos-orgánicos.** La línea diagonal punteada representa una solución ideal ( $\gamma=1$ ) en la que la concentración es igual a la actividad. Los demás sistemas presentan no idealidades siendo el sistema agua-tolueno el menos ideal. La escasa capacidad del tolueno para disolver al agua produce que una mínima cantidad (<1%) de agua sature al tolueno elevando su actividad rápidamente y se produce insolubilidad. Este fenómeno estaría representado por un valor alto de  $\gamma$  que correspondería a una baja fracción molar del agua en el tolueno. Modificado de (Halling, 1994).

Se emplean actividades termodinámicas para expresar la ecuación de equilibrio para una reacción dada, la cual se muestra en la figura 14 y ecuación 2.



Figura 14. Reacción química.

$$K_{eq} = \frac{a_C a_D}{a_A a_B}$$

Ecuación 2. Constante de equilibrio en función de actividades termodinámicas.

En virtud de que el  $\gamma$  de una especie química depende de las otras especies químicas con las que se encuentra presente, entonces es posible modificarlo mediante ingeniería de solventes. Si un cambio en el medio de reacción incrementa  $\gamma$  se está promoviendo inmiscibilidad y si lo disminuye, solubilidad. Entonces si se desea modificar el equilibrio de una reacción hacia la formación de productos sería preciso disminuir las  $\gamma$  entre producto y medio de reacción. Esto se explica recordando que la condición de equilibrio se debe mantener en el valor de la constante de equilibrio, y por lo tanto, al disminuir uno de los factores ( $\gamma$ ), los otros factores (las fracciones molares de los productos) tenderán a subir. La ingeniería de solventes empleada en esta tarea se puede ayudar de métodos predictivos como el UNIFAC , para poder seleccionar una mezcla de solventes adecuada para los objetivos deseados.

#### 4.1 Método UNIFAC

Generalmente en la industria química los productos de interés tienen que ser purificados o separados de otros componentes que resultaron en exceso o como subproductos de reacciones secundarias. Los métodos más

comunes de separación son la destilación, extracción, absorción y sus combinaciones (Kleiber *et al.*, 1998). Sin embargo, debido al incremento en los costos energéticos, los métodos de separación basados en extracción líquido-líquido se han vuelto más atractivos (Magnussen *et al.*, 1981). Tanto para los procesos de destilación como para los de extracción líquido-líquido, el coeficiente de actividad ( $\gamma$ ) es un parámetro indispensable (Bastos *et al.*, 1988).

La ingeniería necesaria para diseñar equipos de separación requiere de información cuantitativa sobre equilibrio de fases que permita calcular, estimar y dimensionar tales equipos. Normalmente esta información se genera a partir de parámetros, como el  $\gamma$ , obtenidos experimentalmente, y por simplicidad, en sistemas binarios generalmente. Cuando se trata de sistemas multicomponentes, el problema se complica porque la interacción entre las especies moleculares en este tipo de sistemas puede ya no ser la misma que en sistemas binarios. La demanda considerable en tiempo y dinero de estos procedimientos experimentales imposibilita generar nueva información de manera rápida. Ante esta limitación y el deseo de contar con estimaciones racionales confiables para sistemas de los que no se tiene información, se comenzaron a desarrollar, a partir de 1925, métodos de estimación de parámetros de equilibrio de fases para sistemas no electrolitos. Estos métodos se basaron en el concepto de contribución de grupos y fueron obtenidos principalmente a partir de datos de equilibrio Vapor-Líquido (VLE). Los métodos de contribución de grupos más comunes son el ASOG (**A**nalytical-**S**olution-**O**f-**G**roups) desarrollado por la compañía Shell y el UNIFAC (**U**NIQUAC **F**unctional-group **A**ctivity **C**oefficients) por Fredenslund y col. (Fredenslund *et al.*, 1975) a finales de la década de 1960 y en los años siguientes (Gmehling *et al.*, 1998).

El concepto de contribución de grupos se fundamenta en que una propiedad física de un fluido es la suma de las contribuciones de los grupos químicos funcionales de las moléculas que lo constituyen. De esta manera,

aunque es cierto que el número de compuestos de interés en tecnología química es enorme, estos están constituidos por la combinación de un número reducido de grupos funcionales (Fredenslund *et al.*, 1975). Dado que con este reducido número de grupos funcionales se puede formar casi cualquier molécula, se aprovechó esta ventaja en el concepto de contribución de grupos para poder predecir parámetros de equilibrio de fases en casi cualquier sistema multicomponente utilizando solo los grupos funcionales necesarios.

El método UNIFAC, es similar al ASOG en que calcula coeficientes de actividad basado en el modelo UNIQUAC (**UNI**versal **QUA**si **CHE**mical theory) como la suma de dos términos: 1) La parte Combinatoria que aporta la contribución debida a las diferencias en tamaño molecular de los grupos funcionales y 2) la parte Residual que aporta la contribución por interacciones moleculares pero difieren principalmente en el concepto de "grupo".

Desde su aparición, el método UNIFAC, al contrario que el ASOG, ha sido objeto de una constante actualización y adecuación para usos particulares por diversos grupos de investigación quienes han hecho sus propias aportaciones al método (Voutsas *et al.*, 1997). La modificación hecha por Weidlich y Gmehling en la universidad de Dortmund dio lugar al UNIFAC Dortmund (Do), el cual ha mostrado superioridad en comparación al ASOG y a otras modificaciones en la predicción de VLE (Weidlich *et al.*, 1987). Por esta razón, ésta variante del método es la más popular y la que se ha integrado a la mayoría de los simuladores comerciales de procesos (Gmehling *et al.*, 2002). No obstante que a este método se le hicieron modificaciones respaldadas experimentalmente para mejorar los resultados en el cálculo de  $\gamma^\infty$ , calores de mezclado y en mezclas asimétricas, aún continúa presentando deficiencias para la predicción de  $\gamma^\infty$  en mezclas altamente no ideales (Zhang *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se emplea el método UNIFAC (Do) para explorar los valores predictivos del  $\gamma^\infty$  de moléculas de interés en distintos solventes orgánicos dado que es una de las mejores herramientas para probar la hipótesis del proyecto.

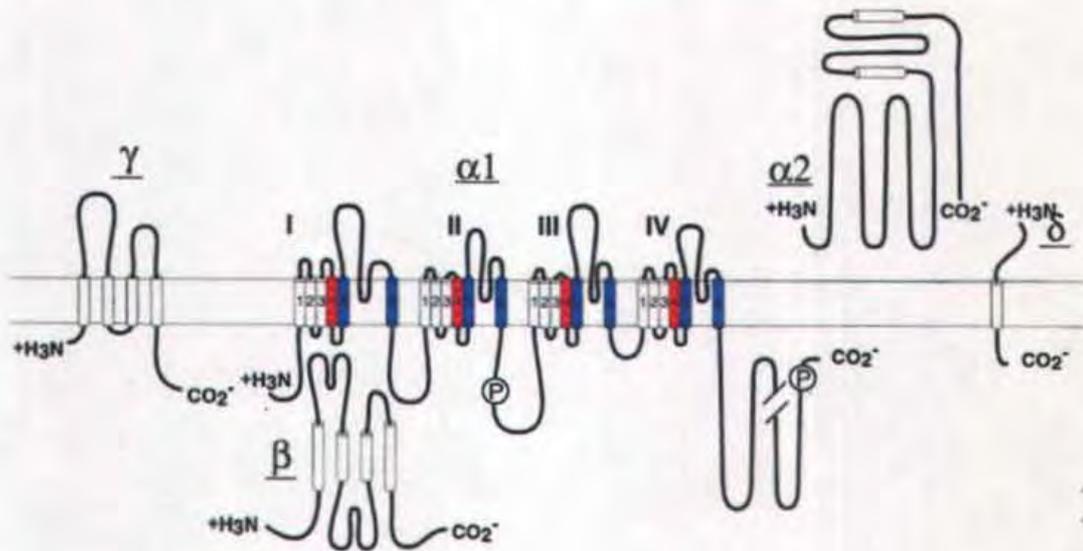
## 5. Canales de $\text{Ca}^{2+}$ dependientes de voltaje (CCDV)

Los canales iónicos de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje (CCDV) son proteínas que se encuentran embebidas en la membrana de la célula en diferentes tejidos de una gran variedad de diversos organismos. Uno de los principales segundos mensajeros que es regulado por canales iónicos dependientes de voltaje es el  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual es esencial en eventos fisiológicos como contracción muscular, secreción de hormonas y neuropéptidos, expresión génica, plasticidad sináptica y excitabilidad celular (Ertel *et al.*, 1997b; Perez-Reyes, 2003). El influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula tiene efectos depolarizantes, es decir, modifica el voltaje de membrana hacia valores más positivos. Aunque existen otros tipos de canales y bombas que regulan el calcio intracelular, los CCDV juegan un papel importante en esta función.

### 5.1 Estructura y función de las subunidades de los CCDV.

Los CCDV están formados por una subunidad transmembranal principal  $\alpha_1$  de 190 kDa, un complejo extracelular  $\alpha_2$ - $\delta$  de 170 kDa, una subunidad intracelular  $\beta$  de 55 kDa y una subunidad transmembranal  $\gamma$  de 33 kDa. La subunidad  $\alpha_1$  es una proteína de 2,000 aminoácidos organizada en cuatro dominios repetidos (I a IV), cada uno formado por 6 segmentos transmembranales (S1 a S6) y una asa asociada al S5 y S6 que constituye el lumen del poro (Catterall, 2000). Esta subunidad contiene motivos estructurales muy conservados, le confiere al canal la conducción de iones, la sensibilidad al voltaje y de la unión específica a distintos fármacos y toxinas. La subunidad  $\alpha_1$  puede, por si misma, formar un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  funcional en cuanto a permeabilidad, activación, inactivación y farmacología (Doering *et al.*, 2003). La subunidad  $\beta$  no posee segmentos transmembranales y está involucrada en el tráfico de la subunidad  $\alpha_1$  hacia la membrana plásmática y en su modulación (Bichet *et al.*, 2000; Restituito *et al.*, 2000). La subunidad  $\gamma$  es una glicoproteína con cuatro segmentos

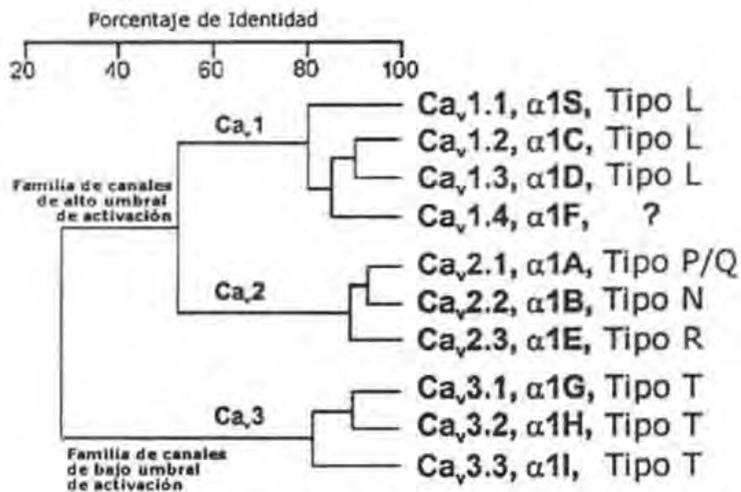
transmembranales, mientras que el complejo  $\alpha_2\text{-}\delta$  posee muchos sitios de glicosilación y varias secuencias hidrofóbicas. Se sabe poco acerca de las implicaciones funcionales de la subunidad  $\gamma$  y del complejo  $\alpha_2\text{-}\delta$  (Catterall, 2000). En la figura 15 se esquematizan las subunidades componentes de los CCDV.



**Figura 15. Esquema de un canal de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de voltaje.** La subunidad  $\alpha_1$  esta formada por cuatro dominios homólogos (I-IV) y cada uno esta constituido por seis segmentos transmembranales (1-6). Los cilindros representan los segmentos transmembranales  $\alpha$ -hélice. Los cilindros rojos representan al segmento S4 que forma parte del sensor de voltaje. Los cilindros azules representan a los segmentos S5 y S6 conectados por el asa P, los cuales forman el lumen del canal. Modificado de Catterall, 2000.

## 5.2 Clasificación funcional de los CCDV.

Se han identificado 10 genes de CCDV que expresan 6 tipos diferentes de canales. Estos se clasifican con base en sus propiedades biofísicas en dos familias que se muestran en la figura 16.



**Figura 16. Dendrograma de CCDV en humano.** Este dendrograma está basado en el alineamiento de las regiones transmembranales y aquellas que conforman el poro. Modificado de Perez-Reyes, E. 2003

### 1) Canales de Ca<sup>2+</sup> de alto umbral de activación.

Son aquellos que requieren depolarizaciones relativamente grandes (30 mV) para activarse (Heady *et al.*, 2001). Generalmente se activan a partir de -30 mV. A esta familia pertenecen 5 tipos de canales codificados por 7 genes: los tipo L, N, P/Q y R (Bean, 1989; Catterall, 2000; De Waard *et al.*, 1996; Ertel *et al.*, 1997b; Hess, 1990).

Los canales tipo L tienen un voltaje de activación alto (~-30 mV), su inactivación es lenta (~300-500 ms), se desactivan relativamente rápido y poseen una conductancia unitaria aproximada de 20 pS. Son sensibles a las dihidropiridinas (DHP) con las que se bloquean en el rango micromolar. Las corrientes tipo L se han identificado en tejidos excitables como músculo esquelético, cardíaco, liso, neuronas y células endócrinas (Catterall, 2000; Doering *et al.*, 2003; Ertel *et al.*, 1997b).

Los canales tipo N tienen un voltaje de activación intermedio entre los canales tipo L (alto: ~-30 mV) y los canales tipo T (bajo: ~-60 mV), se inactivan más rápido (<300 ms) que los tipo L y se desactivan rápidamente.

Las corrientes tipo N se inhiben irreversiblemente con el péptido  $\omega$ -conotoxin GVIA del caracol marino *Conus geographus* en el rango nanomolar (Catterall, 2000; Doering *et al.*, 2003). Este tipo de corriente se expresa principalmente en el sistema nervioso central y periférico (Newcomb *et al.*, 1998).

Los canales tipo P se distinguen por su alta sensibilidad (rango nanomolar) a la toxina  $\omega$ -agatoxina IVA de araña. Los canales Q también son sensibles a esta toxina pero con una menor afinidad (rango micromolar). Los canales tipo P/Q se activan a altos voltajes. La inactivación de los canales P es muy lenta mientras que la de los canales Q es un poco más rápida y la desactivación de ambos es rápida como el resto de los canales de alto umbral de activación (Stotz *et al.*, 2001). Este tipo de corrientes se localiza en el sistema nervioso central particularmente en las dendritas de las terminales nerviosas (Doering *et al.*, 2003; Ertel *et al.*, 1997a).

La característica de los canales tipo R es que son resistentes a las DHP, a la  $\omega$ -conotoxin GVIA, a la  $\omega$ -agatoxina IVA (Doering *et al.*, 2003) aunque son sensibles a la SNX-482 y a la agatoxina IIIA (Newcomb *et al.*, 1998). La SNX-482 se consideró inicialmente un bloqueador selectivo de canales tipo R, sin embargo en estudios posteriores se demostró que también inhibía los canales tipo L aunque de manera incompleta y con menor afinidad (Bourinet *et al.*, 2001). Este tipo de canales tiene algunas propiedades biofísicas similares a las de los canales tipo T como su bajo umbral de activación y su rápida inactivación (Doering *et al.*, 2003; Ertel *et al.*, 1997b). Los canales tipo R se expresan principalmente en el sistema nervioso y cardíaco (Tabares *et al.*, 1996).

## 2) Canales de $\text{Ca}^{2+}$ de bajo umbral de activación.

Son aquellos que se activan a voltajes cercanos al potencial de reposo (-60 mV) con depolarizaciones pequeñas (10 mV) (Heady *et al.*, 2001). Existe un solo tipo de canales en esta "familia": Los canales tipo T (CCTDV) codificados por 3 genes distintos dando lugar a 3 canales diferentes.

### 5.3 Clasificación molecular de los CCDV.

De las dos familias de canales, se sabe que los CCDV de alto umbral de activación están formados por varias subunidades, la subunidad  $\alpha_1$  formadora del poro y subunidades auxiliares ( $\beta, \gamma, \alpha_2\delta$ ). Algunos canales tipo L están formados por la subunidad  $\alpha_1$  y 3 subunidades auxiliares (células de músculo esquelético) mientras otros (en neuronas) solo por las  $\alpha_1, \beta$  y  $\alpha_2\delta$ . Los canales tipo N y P/Q de preparaciones membranales del cerebro también están formados solamente por estas tres subunidades (Catterall, 2000). Respecto a los CCDV de bajo umbral de activación, se sabe a partir de la clonación de las tres subunidades  $\alpha_1$  ( $\text{Ca}_v3.1 - \text{Ca}_v3.3$ ) por Perez-Reyes y col. que estos están formados por una subunidad  $\alpha_1$  (Perez-Reyes *et al.*, 1998) pero se desconoce si las subunidades  $\beta, \alpha_2\delta, \gamma$  y  $\gamma$  se expresen conjuntamente para dar funcionalidad al canal.

### 5.4 Canales de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T dependientes de voltaje (CCTDV).

Los CCTDV se encuentran comúnmente inactivados al potencial de reposo de las células y se activan después de una hiperpolarización de la membrana (Kostyuk, 1999).

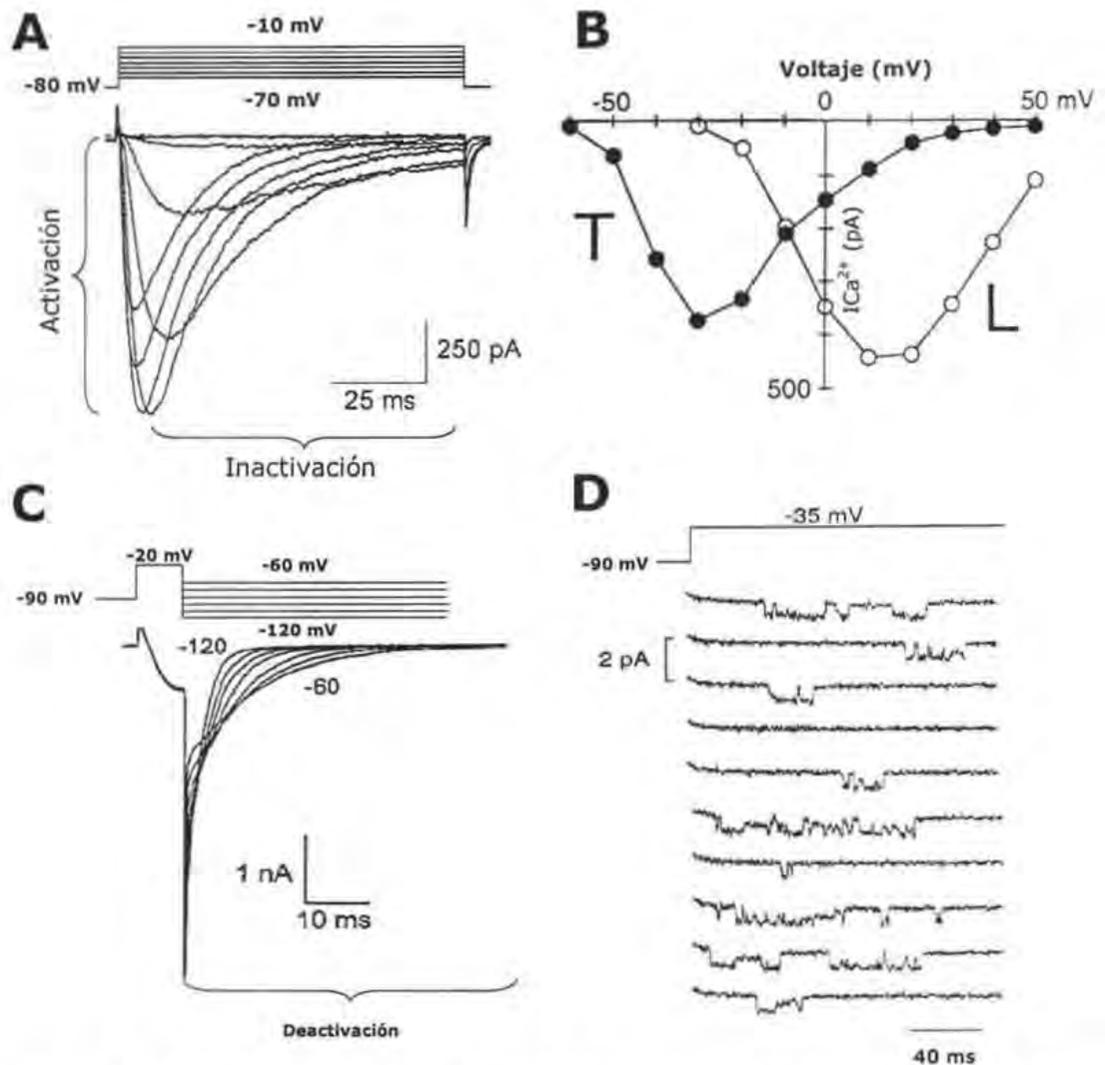
La activación de los canales CCTDV es muy rápida y depende de voltaje; su rango de activación es cercano al potencial de membrana (-60

mV a condiciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Doering *et al.*, 2003; Kostyuk, 1999; Monteil *et al.*, 2000; Perez-Reyes, 2003). Las corrientes tipo T alcanzan el pico máximo de corriente alrededor de -20 mV (Monteil *et al.*, 2000; Perez-Reyes, 2003), mientras que las corrientes de los canales de alto umbral de activación alcanzan el pico alrededor de 0 mV (Perez-Reyes, 2003). Los CCTDV generan corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  transitorias (por lo que se les denomina T) ya que poseen una inactivación que también depende de voltaje (Ertel *et al.*, 1997b; Monteil *et al.*, 2000; Perez-Reyes, 2003; Yunker *et al.*, 2003) y es más rápida ( $\tau \sim 15\text{-}30$  ms) que los canales tipo L, N, P/Q ( $\tau \sim 2,000$  ms) (Catterall, 2000; Perez-Reyes, 2003). Las cinéticas rápidas de activación e inactivación de los CCTDV son las responsables de que en una familia de corrientes macroscópicas, registradas con pulsos depolarizantes, se presente el patrón de entrecruzamiento característico de los canales T (Monteil *et al.*, 2000; Perez-Reyes, 2003). La conductancia unitaria es pequeña (5-9 pS) (Ertel *et al.*, 1997b; Kostyuk, 1999; Yunker *et al.*, 2003) comparada con la de los canales de alto umbral de activación (>10 pS) (Ertel *et al.*, 1997a). Los CCTDV se desactivan mucho más lento (10-100 veces) que los canales de alto umbral de activación. Las constantes de desactivación ( $\tau$ ) para estos canales se encuentran entre 1-10 ms mientras que las de los canales de alto umbral de activación son de 0.5 ms (Ertel *et al.*, 1997b). La figura 17 muestra algunas de las características electrofisiológicas de los CCTDV.

Respecto a sus propiedades farmacológicas, no existe todavía un agente ó péptido altamente selectivo para bloquear los CCTDV (Doering *et al.*, 2003; Heady *et al.*, 2001; Perez-Reyes, 2003). El mibefradil se consideró el primer bloqueador selectivo para CCTDV. Sin embargo, en estudios posteriores se demostraron algunas desventajas de esta molécula tanto para caracterizar corrientes iónicas como su para su uso clínico. El mibefradil en algunas células es entre 10 y 100 veces más potente (0.1 a 4.7  $\mu\text{M}$ ) (Ertel *et al.*, 1997a; Heady *et al.*, 2001) para inhibir las corrientes tipo T que corrientes generadas por canales tipo L. En motoneuronas

espinales la inhibición fue equipotente ( $1.4 \mu\text{M}$ ) para ambos tipos de canal. Además, el mibefradil bloqueó canales de  $\text{Cl}^-$  de células endoteliales de ternero ( $\text{IC}_{50}=5 \mu\text{M}$ ) y en células adrenales de la zona fasciculata bloqueó corrientes de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje con una potencia similar al bloqueo de corrientes tipo T. Actualmente existen otros bloqueadores de corrientes tipo T, entre los más potentes se encuentran la flunarizina ( $\text{IC}_{50}=0.7 \mu\text{M}$  en células de hipotálamo y  $\text{IC}_{50}=0.1 \mu\text{M}$  en miocitos del miocardio); la Zonisamida ( $\text{IC}_{50 \text{ aparente}} \sim 50 \mu\text{M}$  en células NB1); verapamil ( $\text{IC}_{50 \text{ aparente}} \sim 0.7 \mu\text{M}$  en  $\text{Ca}_v3.2$ ); nifedipina ( $\text{IC}_{50} = 0.4 \mu\text{M}$  en espermatozoides); nicardipina ( $\text{IC}_{50} = 2 \mu\text{M}$  en neuronas sensoriales); Isradipina ( $\text{IC}_{50}=0.04 \mu\text{M}$  en espermatozoides); propofol ( $\text{IC}_{50}=13 \mu\text{M}$  en ganglio de la raíz dorsal de rata); penfluridol (45% inhibición con  $1 \mu\text{M}$  en célula de pituitaria de rata); pimozide ( $\text{IC}_{50}=0.5 \mu\text{M}$  en espermatozoides de ratón) (Heady *et al.*, 2001) y kurtoquina (95% de inhibición a  $-40 \text{ mV}$  a partir de un potencial de reposo de  $-90 \text{ mV}$ ) (Chuang *et al.*, 1998).

Dado que varias de las características de los CCTDV también pueden observarse en otro tipo de canales, los criterios para clasificar a un canal iónico como CCTDV son controversiales. Aunque no se ha encontrado un criterio completamente certero para clasificar a un canal como CCTDV, los más útiles y confiables son la desactivación lenta, la baja conductividad al  $\text{Ba}^{2+}$  e igual conductividad al  $\text{Ca}^{2+}$  respecto al resto de CCDV y el patrón de entrecruzamiento de sus corrientes a diferentes voltajes. (Ertel *et al.*, 1997b; Perez-Reyes, 2003).



**Figura 17. Características biofísicas de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T.** **A)** Familia de corrientes tipo T en células HEK (293) generadas por un pulso de prueba (de -80 mV a -10 mV) con incrementos de 10 mV entre cada pulso. La aplicación de un pulso depolarizante produce una rápida activación e inactivación que da lugar al patrón de entrecruzamiento característico de las corrientes tipo T. Modificado de (Perez-Reyes, 2003). **B)** Relación corriente-voltaje de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo T (T) y tipo L (L). Se observa que la activación de los CCTDV ocurre a voltajes cercanos al potencial de reposo (-60 mV). Tomado de (Ertel *et al.*, 1997b). **C)** Protocolo con un potencial de mantenimiento de -90 mV, un prepulso de 10 ms a -20 mV y pulsos de prueba desde -120 mV a -60 mV en intervalos de 10 mV. La deactivación ó cierre de los canales ocurre cuando se suspende el estímulo depolarizante antes de que el canal comience a inactivarse. Esta deactivación es muy lenta en los CCTDV ( $\tau = 6$  ms a -80 mV). Tomado de (Cribbs *et al.*, 1998). **D)** Registros de canal unitario en células adrenales bovinas a -35 mV. La conductancia del canal es 9 pS. Tomado de (Barrett *et al.*, 2000).

Los canales CCTDV inicialmente se identificaron en neuronas sensoriales del sistema nervioso central y periférico como las del ganglio de la raíz dorsal (DRG) (Carbone *et al.*, 1984; Nowycky *et al.*, 1985). A los CCTDV se les ha atribuido diversas funciones neuronales como la mediación del disparo recurrente neuronal (neuronal rebound burst firing), actividad marcapaso neuronal y oscilaciones del potencial de membrana neuronal (Yunker *et al.*, 2003), los ritmos alfa de la actividad cerebral (Andersen *et al.*, 1964; Llinás *et al.*, 1982), ondas "huso" (spindle waves) (Steriade *et al.*, 1984), el control de la frecuencia de disparo de potenciales de acción en las neuronas Purkinje (Raman *et al.*, 1999) e incrementar las señales de células dendríticas (Ertel *et al.*, 1997b).

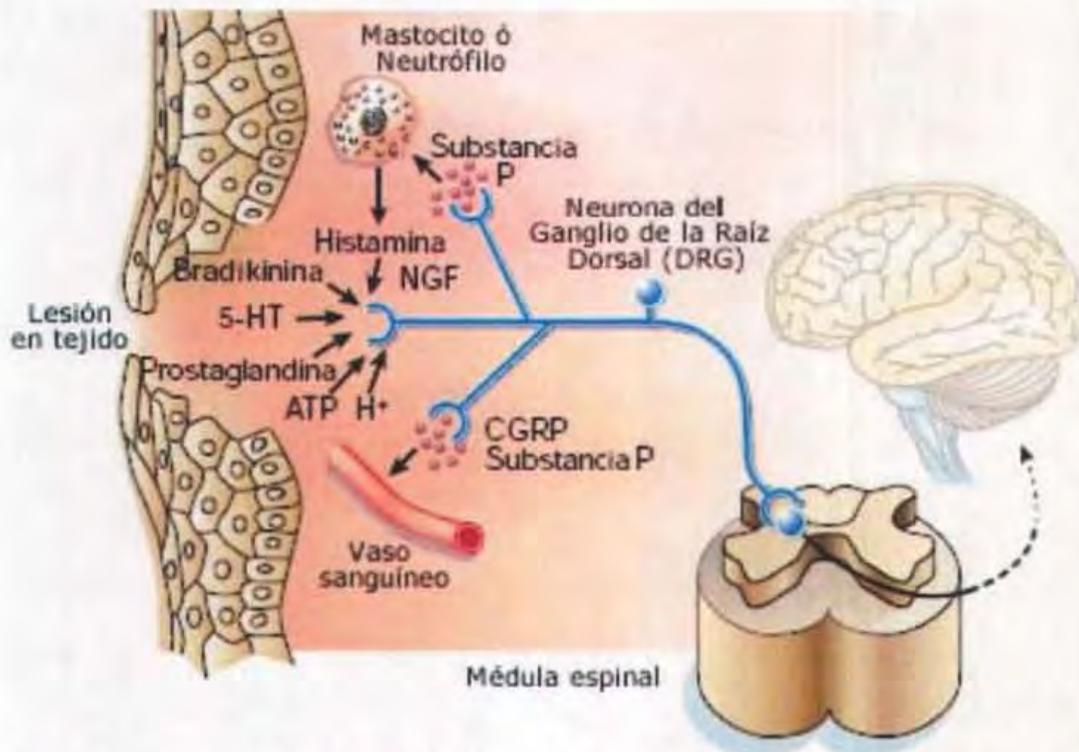
Posteriormente, los CCTDV también se identificaron en otras células no neuronales como en las células cardíacas donde se ha reportado su probable participación en actividades marcapaso en la diástole tardía y en la contracción de músculo liso ya que se han identificado corrientes tipo T en músculos vasculares, bronquiales, gastrointestinales y uterinos (Akaike *et al.*, 1989; Friedman *et al.*, 1987; Janssen, 1997; Xiong *et al.*, 1993; Young *et al.*, 1993). También se han observado corrientes eléctricas con propiedades tipo T en células secretoras de varios mamíferos (Ertel *et al.*, 1997b). Asimismo, los CCTDV pueden permitir la entrada constante de  $Ca^{2+}$  cerca del potencial de reposo en fibroblastos (Yunker *et al.*, 2003) y mediar la iniciación de la reacción acrosomal del espermatozoide (López-González *et al.*, 2003).

En años recientes, se han dedicado esfuerzos para conocer la participación de los CCTDV en la vía del dolor. Por ejemplo, se evidenció la participación de los CCTDV en los procesos de señalización del dolor al probarse que el bloqueo selectivo de CCTDV revierte la hipersensibilidad térmica y mecánica en modelos de dolor neuropático (Dogrul *et al.*, 2003). En otros estudios, se reportó que el tratamiento local con agentes reductores y oxidantes selectivos para CCTDV en neuronas sensoriales

primarias provoca un incremento y disminución de hiperalgesia respectivamente (Todorovic *et al.*, 2004; Todorovic *et al.*, 2001). Por su parte, Bourinet y col. demostraron que el CCTDV  $Ca_v3.2$  juega un papel importante pro-nociceptivo dado que la inhibición de la expresión del canal y de gran parte de la corriente tipo T  $Ca_v3.2$  por técnicas de antisentido generó efectos antinociceptivos, antihiperalgésicos y antialodínicos (Bourinet *et al.*, 2005). Recientemente, se demostró mediante el uso de neuroesteroides, que se emplean como bloqueadores selectivos de CCTDV y potenciadores de canales dependientes de GABA, la participación de los CCTDV en la vía del dolor (Pathirathna *et al.*, 2005). Este trabajo reporta efectos antinociceptivos en todos los neurosteroides probados excepto en un análogo con actividad potenciadora de canales dependientes de GABA pero carente de la capacidad de bloquear a los CCTDV.

Los estímulos externos e internos son percibidos mediante neuronas sensoriales primarias que tienen el soma en los ganglios trigeminal y de la raíz del ganglio dorsal, extendiéndose mediante fibras que innervan el cerebro y el resto del cuerpo respectivamente. Las neuronas sensoriales primarias que detectan estímulos inocuos tienen fibras de tipo  $A\beta$  (grandes y con fibras mielinadas altamente conductoras) y las que se especializan en detectar estímulos nocivos, ya sea térmicos, mecánicos, eléctricos ó químicos se llaman nociceptores y tienen fibras de tipo C (de tamaño mediano y pequeño sin mielina y de lenta conducción) y  $A\delta$  (de tamaño mediano y pequeño, con fibras ligeramente mielinadas y mejor conductoras que las tipo C). Las señales se transmiten desde el lugar donde se detecta el dolor hasta la médula espinal y de allí son direccionadas a estructuras superiores del sistema nervioso central como el tálamo para su procesamiento (Altier *et al.*, 2004; Julius *et al.*, 2001). En la figura 18 se esquematiza de manera general uno de los procesos por los que se percibe dolor.

La lesión periférica de neuronas sensoriales primarias puede resultar en la pérdida de la habilidad para percibir dolor, en dolor espontáneo ó una mayor sensibilidad al dolor. Cuando las neuronas quedan en un estado acentuado de sensibilidad pueden responder a estímulos inocuos de manera dolorosa (alodinia) ó a estímulos dolorosos de manera exagerada (hiperalgesia), estado referido como "dolor neuropático" (Todorovic *et al.*, 2004) que son el reflejo de la densidad y modo de operación de diferentes canales iónicos (Dogrul *et al.*, 2003). La hiperalgesia es un fenómeno causado, en parte, por la disminución en la magnitud necesaria de un estímulo para excitar a los nociceptores y transmitir una señal de dolor.



**Figura 18. Esquema simplificado del fenómeno del dolor.** Una lesión es una de varias vías por las que se inicia el proceso de dolor. Este se reconoce por la inflamación que se genera al liberarse un "coctel" de agentes inflamatorios de naturaleza peptídica (bradikinina), lipídica (prostaglandinas), neurotransmisores (serotonina y ATP) y neurotropinas (Factor de Crecimiento Neural, NGF). Cada uno de estos agentes sensibilizan ó excitan las terminales de los nociceptores al interactuar con receptores expresados en la membrana plasmática de estas neuronas. La activación del nociceptor no solo transmite el mensaje a la médula espinal y de allí al cerebro, sino que la retroalimentación del cerebro hace que el nociceptor inicie otro tipo de inflamación llamado "neurogénica". Esta es una función del nociceptor en la que mediante la liberación de neurotransmisores,

principalmente Substancia P y el péptido relacionado al gene de calcitonina (CGRP), de las terminales induce vasodilatación y vasopermeación (fuga de proteínas y fluidos de los vasos sanguíneos) así como la activación de células no neuronales como ciertos tipos de glóbulos blancos (mastocitos) y neutrófilos. Estas células, a su vez contribuyen con agentes inflamatorios adicionales. Modificado de (Julius *et al.*, 2001)

Es en este punto donde se cree que los CCTDV intervienen en los procesos de dolor. Dado que la activación de los CCTDV ocurre a potenciales de membrana cercanos al potencial de reposo, estos canales permiten la entrada de calcio cuando las células están en reposo ó como respuesta a estímulos sinápticos de bajo umbral causando depolarizaciones del potencial de membrana. Esto causa oscilaciones de baja amplitud en el potencial de membrana. Por lo tanto, estos canales incrementan la excitabilidad neuronal mediante la disminución del umbral para disparar potenciales de acción (Matthews *et al.*, 2001). Este estado fisiológico favorece el desarrollo de un dolor neuropático (Dogrul *et al.*, 2003; Matthews *et al.*, 2001). Por lo tanto, el bloqueo de estos canales resultaría en una disminución de la excitabilidad neuronal que se reflejaría en menor percepción de dolor.

Toda esta evidencia coloca a los CCTDV como blancos terapéuticos interesantes para el descubrimiento, diseño o desarrollo de antagonistas selectivos para este tipo de canales con fines analgésicos. Dado que se reportó que la capsaicina es capaz de inhibir las corrientes de  $Ca^{2+}$  de canales de alto umbral de activación de una manera dependiente de dosis (Balla Z *et al.*, 2001; Bielefeldt, 2000; Bleakman *et al.*, 1990; Docherty *et al.*, 1991; Lo *et al.*, 1995), se inició una colaboración con el Grupo del Dr. Alberto Darszon, para evaluar el efecto de la capsaicina, capsiato y vainillilamina (VAM), sintetizados en el Grupo de Biocatálisis del IBt, sobre los CCTDV. El presente trabajo forma parte de esta colaboración y busca explorar los efectos de compuestos análogos de capsaicina en estos canales. Tomando como referencia a la capsaicina y asignándole una pungencia del 100%, se ensayaron algunos análogos de capsaicina para conocer su efecto sobre estos canales.

## **6. Uso de células espermatogénicas de ratón para registros de corrientes tipo T.**

Los CCTDV se expresan en una variedad de órganos (cerebro, riñón, corazón) y tejidos (músculo liso y esquelético, tejido nervioso y endócrino) de mamíferos y en espermatozoides. La función de los CCTDV en los espermatozoides es crítica para la fecundación ya que estos canales participan en la reacción acrosomal, evento inmediato previo a la fusión de los gametos que permite al espermatozoide entrar en la zona pelúcida del óvulo. (Darszon *et al.*, 2001; Felix, 2005; Stamboulian *et al.*, 2004). Dado el tamaño pequeño del espermatozoide y su naturaleza motil, ha sido difícil caracterizar canales iónicos utilizando métodos electrofisiológicos convencionales en esta célula. Aún cuando las técnicas en biología molecular son poderosas herramientas de estudio, el hecho de que el espermatozoide carezca de la capacidad de sintetizar proteínas dificulta el empleo de estas técnicas para el estudio de canales iónicos en espermatozoides.

Como consecuencia de estos inconvenientes en la caracterización de CCDV en el espermatozoide, se ha buscado caracterizarlos en las células espermatogénicas, de las cuales se origina el espermatozoide. Estas células son más adecuadas para el uso de técnicas de biología molecular y electrofisiológicas ya que conservan su capacidad de sintetizar proteínas y su morfología permite obtener registros electrofisiológicos con mayor facilidad que en el espermatozoide. (Arnoult *et al.*, 1996; Felix, 2005; Hagiwara *et al.*, 1984; Lievano *et al.*, 1996; Santi *et al.*, 1996).

En un estudio realizado por Santi y col. se reportó que en las células espermatogénicas de ratón se expresan CCDV funcionales de solo un tipo, el T (Santi *et al.*, 1996; Treviño *et al.*, 2004). Posteriormente, se demostró que la subunidad  $Ca_v3.2$  se expresa en una proporción mayoritaria en las células espermatogénicas y que aparentemente las subunidades  $Ca_v3.1$  y  $Ca_v3.3$  no

contribuyen de manera significativa en las corrientes tipo T de estas células (Stamboulian *et al.*, 2004; Treviño *et al.*, 2004). En virtud de que la expresión de CCDV funcionales en células espermatogénicas es exclusiva para canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T y la facilidad de obtener registros electrofisiológicos en ellas, se decidió emplear este tipo de células para evaluar los efectos de los análogos de capsaicina mediante la técnica de fijación de voltaje en microáreas de membrana (Patch-Clamp) en configuración de célula completa.

## 7. JUSTIFICACION

Los puntos mencionados en la parte de antecedentes permiten establecer la justificación del proyecto y se resumen a continuación:

- a) La importancia de la resolución de mezclas de especies químicas en la industria de química fina.
- b) La esterificación como estrategia común de resolución de mezclas de especies químicas.
- c) La conveniencia de los procesos biocatalíticos en aspectos energéticos, ecológicos, de seguridad física y de facilidad operacional.
- d) La ventaja de las lipasas sobre otras hidrolasas para aceptar una gran diversidad estructural de sustratos, y por su estabilidad en solventes orgánicos.
- e) La ventaja del uso de moléculas de origen natural como la base para descubrir nuevos agentes biológicamente activos.
- f) La propiedad de la capsaicina de producir analgesia y de inhibir a los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral de activación.

Dados estos elementos, en este trabajo se pretende llevar a cabo la resolución enzimática de una mezcla de sustratos amina-alcohol. Se empleó la ingeniería de solventes como método para inducir una acilación selectiva que permita resolver la mezcla. Las reacciones enzimáticas se planearon con el fin de obtener análogos no naturales estructuralmente similares a la capsaicina y de comparar sus efectos con los de la capsaicina en los CCTDV. Se decidió trabajar con CCTDV porque existen relativamente menos estudios que con CCDV de alto umbral de activación y porque se ha reportado que los CCTDV participan en fenómenos de analgesia. El uso de células espermatogénicas permite obtener adecuadamente registros electrofisiológicos de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T ya que los únicos CCDV funcionales que se expresan en estas células son los CCTDV además que la morfología de estas células es apta para realizar esta técnica.

## 8. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

### 8.1 Hipótesis.

El uso del 2metil-2-butanol como solvente hidrofílico inducirá la producción enzimática de vainillilamidas y el uso del n-hexano como solvente hidrofóbico inducirá la formación de vainillilésteres. En ambos casos esto es debido a un mayor número de interacciones moleculares entre producto y solvente reflejadas en un bajo coeficiente de actividad. Bajo esta suposición es posible encontrar un método enzimático quimioselectivo para resolver mezclas alcohol-amina mediante la formación selectiva de los ésteres y amidas correspondientes.

El efecto analgésico de productos que contienen capsaicina puede deberse en parte a la acción inhibitoria de esta molécula sobre canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje tipo T.

### 8.2 Objetivo general.

Resolver enzimática y quimioselectivamente una mezcla de sustratos amina-alcohol y la acilación enzimática quimioselectiva de un aminoalcohol mediante ingeniería de solventes. Determinar la efectividad del coeficiente de actividad calculado con el método UNIFAC como herramienta termodinámica para predecir cualitativamente el punto de equilibrio de las reacciones enzimáticas planeadas.

Explorar la posibilidad de encontrar un inhibidor selectivo para corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo T dentro del grupo de compuestos capsaicinoides.

### 8.3 Objetivos particulares

- Seleccionar las moléculas modelo para estudiar la selectividad de la lipasa con base en la polaridad de los productos a obtener y

en sus propiedades potenciales para inhibir las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T.

- Seleccionar dos solventes orgánicos de diferente polaridad adecuados para emplearlos como medio de reacción.
- Estudiar el efecto de la polaridad de los solventes en la selectividad de la enzima en reacciones con un solo nucleófilo.
- Llevar a cabo la resolución de una mezcla de nucleófilos amina-alcohol.
- Acilar enzimática y quimioselectivamente un aminoalcohol.
- Evaluar el efecto de los compuestos sintetizados en los CCTDV.
- En caso de encontrar un inhibidor, identificar:
  - 1) si la inhibición es por obstrucción del poro ó por modificación del mecanismo de apertura y cierre del canal
  - 2) las partes estructurales de la molécula indispensables para la inhibición.

## 9. MATERIALES y METODOS

### 9.1 Síntesis enzimática

#### 9.1.1 Materiales.

El clorhidrato vainillilamina (VAM) (vainillilamina•HCL), el alcohol vainillílico (VAOH) y el tamiz molecular (5Å, perlas, malla 8-12) se obtuvieron de Aldrich (WI, USA). El ácido caprílico (AcC8), la N-N-diisopropiletilamina (DIPEA), el ácido trifluoroacético (TFA), la bencilamina (BAM), el ácido oléico (AcOle), la capsaicina (CAP) y el alcohol bencílico (BOH) se adquirieron de Sigma Chemical Co. (MO, USA). El (±)3-Amino-1,2-propanodiol (3APDOH) se adquirió de Fluka (Suiza). El n-hexano (HEX), el acetonitrilo (ACN) grado HPLC se adquirieron de Burdick & Jackson. El 2-metil-2-butanol (2M2B) y el acetato de etilo (EtAc) se adquirieron de J.T. Baker (México). La enzima utilizada fue la lipasa B de *Candida antarctica*, inmovilizada en el soporte Lewatit E (Novozym 435<sup>®</sup>), adquirida de Novozymes A/S (México). La arena de cuarzo para cromatografía flash, la sílica gel 60 (0.04-0.063 mm) y las placas de sílica gel 60 ALUGRAM<sup>®</sup> SIL G/UV<sub>254</sub> se adquirieron de Macherey-Nagel (Alemania). La sílica gel 60 (0.06-0.2 mm) se adquirió de Merck (Alemania). El olvanil se produjo enzimáticamente de acuerdo con los procedimientos de Reyes D. y col. (Reyes-Duarte *et al.*, 2002), se purificó y se comprobó la identidad y la pureza mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

#### 9.1.2 Metodología de las reacciones de síntesis.

La síntesis se realiza por unión de la cadena hidrocarbonada (acilo) del donador de acilo a la molécula receptora (sustrato nucleófilo). Las amidas y ésteres son el producto del uso de sustratos nucleofílicos diferentes: las aminas (vainillílica ó bencílica) y los alcoholes (vainillílico ó bencílico) respectivamente.

Las reacciones enzimáticas para síntesis de capsaicínoides se llevaron a cabo utilizando viales de 7 mL con agitación magnética a 45°C hasta llegar al equilibrio ( $\geq 72$ hr) con las concentraciones mostradas en la Tabla 1. La reacción enzimática con los dos nucleófilos en el mismo reactor se muestra en la tabla 2. Los solventes usados, 2M2B y HEX, fueron deshidratados previamente con tamiz molecular. Como sustratos nucleófilos se empleó la VAM, VAOH, BAM, BOH y 3APDOH, y como donadores de acilo el AcC10, AcC8 y AcOle. Se usaron 20 mg/mL de tamiz molecular para minimizar la actividad de agua en la reacción. Las muestras de 0.35 mL de las reacciones de síntesis se centrifugaron 5 min a 14,000 rpm para separar los residuos de tamiz molecular y de biocatalizador. Del sobrenadante se tomó una muestra que se inyectó directamente al equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). En la reacción con 3APDOH en HEX se empleó sílica gel 60 para adsorber el 3APDOH y evitar que se adsorbiera en la enzima y obstruyera la entrada de sustratos.

**Tabla 1.** Concentración de sustratos y enzima en la síntesis enzimática de amidas y ésteres en solventes orgánicos.

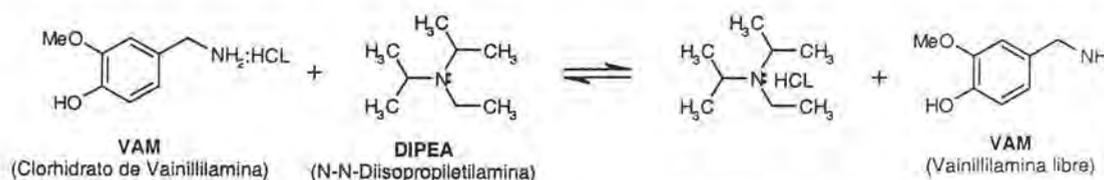
Componente	Amidas		Esteres
	Vainillílicas	Bencílicas	
Nucleófilo	20 mM	20 mM	20 mM
Donador de acilo	20 mM	20 mM	20 mM
Amina terciaria (DIPEA)	360 mM	---	---
Enzima (Novozym 435)	20 mg/mL	20 mg/mL	20 mg/mL
Tamiz molecular	20 mg/mL	20 mg/mL	20 mg/mL
Solvente	5 mL	5 mL	5 mL

**Tabla 2.** Concentraciones usadas en la reacción realizada con mezcla de 2 nucleófilos, VAM y VAOH.

Componente	Concentración
VAM	20 mM
VAOH	20 mM
AcC10 (Acido cáprico)	40 mM
Amina terciaria (DIPEA)	360 mM
Enzima (Novozym 435)	20 mg/mL
Tamiz molecular	20 mg/mL
Solvente	5 mL

### 9.1.2.1 Liberación de la vainillilamina (VAM)

En la síntesis de la vainillilamida (VAmC10), la VAM se encuentra en forma de sal (clorhidrato de vainillilamina), así que requirió incubarse previamente a la reacción, al menos 30 min con DIPEA en proporciones DIPEA/VAM 18:1, de acuerdo con los procedimientos de Reyes D. y col. (Reyes-Duarte *et al.*, 2002) con el fin de liberarla del clorhidrato. Esta reacción de liberación de VAM se muestra en la figura 19.



**Figura 19.** Reacción de la liberación de la vainillilamina del clorhidrato mediante N-N-diisopropiletilamina (DIPEA).

### 9.1.2.2 Síntesis y purificación de estándares

Dado que los productos de síntesis no son comerciales fue necesario sintetizar una cantidad mayor a la obtenida en las reacciones de base para emplearlos como estándares. Las reacciones para obtención de estándares se realizaron a 55°C en volúmenes de 100 mL, concentraciones de sustratos de 20 mM, 5 mg/mL de enzima y tamiz molecular y llevadas al equilibrio

( $\geq 72$  hrs). Una vez conocido el mejor solvente para cada tipo de producto las reacciones para obtención de estándares se realizaron en dicho solvente.

La purificación de amidas se realizó separando la enzima y el tamiz por centrifugación y después al sobrenadante se le evaporó el solvente por ebullición obteniéndose la amida respectiva y sustratos que no reaccionaron. Los sustratos hidrofóbicos (ácidos) se removieron mediante al menos 3 extracciones líquido-líquido con HEX. En este paso, la amida sintetizada se precipita debido a que su carácter polar la hace insoluble en HEX. Posteriormente, los sustratos hidrofílicos (nucleófilos) se removieron también por extracción líquido-líquido con agua en al menos 3 ciclos. La pureza de los productos se comprobó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), inyectando una muestra del polvo obtenido disuelto en acetonitrilo.

La purificación de ésteres se realizó separando la enzima y el tamiz por centrifugación y después al sobrenadante se le evaporó el solvente por ebullición obteniéndose el éster respectivo y sustratos que no reaccionaron. La mezcla obtenida se purificó mediante al menos 3 ciclos sucesivos de cromatografía flash.

### 9.1.2.3 Síntesis, purificación y ensayo de hidrólisis de capsiato.

El capsiato se sintetizó enzimáticamente en HEX como medio de reacción. La reacción se llevó a cabo en un tubo de hibridación de DNA de 130 mL a 45°C con rotación constante por 5 días en un equipo Hybridizer HB-1000 marca UVP, California, USA. Los sustratos empleados fueron capsaicina y VAOH, ambos a una concentración de 15 mM, empleando 2.5 mg de Novozym 435 (lipasa B de *Candida antarctica*) como biocatalizador y 2.5 mg/mL de tamiz molecular. La reacción es una transacilación entre capsaicina y VAOH produciendo capsiato y VAM.

En la purificación, el capsiato se separó concentrando el medio de reacción hasta 1/5 de su volumen inicial mediante evaporación del solvente, después enfriando a -20°C y centrifugando para obtener en la fase orgánica el capsiato y la capsaicina precipitada. El alcohol y la amina presentes aún en la fase orgánica se separaron del capsiato mediante la técnica de cromatografía flash.

En la prueba de hidrólisis se empleó la Técnica de HPLC para observar la posible desaparición del capsiato a través del tiempo y consistió en preparar una solución de capsiato 50 µM en la solución externa empleada en los ensayos electrofisiológicos. Se inyectó una serie de muestras de solución al HPLC después de una primera inyección de muestra recién preparada. El capsiato se detectó como los compuestos vainillílicos, a una longitud de onda de 280 nm con un tiempo de retención de 6.9 min. El cálculo del porcentaje de hidrólisis se realizó comparando las áreas bajo la curva de los picos de capsiato en las diferentes inyecciones.

#### 9.1.2.4 Técnica de Cromatografía Flash

Para esta cromatografía se utilizaron los eluyentes descritos en la Técnica de Cromatografía de Capa Fina a razón de 2 mL/min y sílica gel 60 como fase estacionaria. La columna, de 1 cm. de diámetro, se empacó en húmedo a una altura de 27 cm sobre una pequeña cama de 0.5 gr arena de cuarzo. Las fracciones del primer ciclo, recolectadas en tubos de 5 mL, se analizaron por cromatografía de capa fina (TLC), se identificaron las que contenían los ésteres, se les evaporó la mezcla de solventes y se hicieron pasar nuevamente por la columna hasta obtener una pureza visualmente aceptable en TLC. Finalmente la pureza de los ésteres se comprobó por HPLC, inyectando una muestra disuelta en acetonitrilo.

#### 9.1.2.5 Técnica de Cromatografía de Capa Fina (TLC)

En esta técnica se emplearon tres eluyentes para la detección de sustratos y productos. La elusión fue ascendente y unidimensional. Como fase estacionaria se utilizaron placas de ALUGRAM SIL G/UV254 con sílica gel 60 de 0.25 mm de espesor Macherey-Nagel. Los eluyentes 1 y 2 se emplearon para purificar ésteres vainilloides y bencílicos respectivamente. El eluyente 3 se empleó para purificar capsiato.

Eluyente 1: n-Hexano:Acetato de Etilo con 0.1% de TFA (70:30)

Eluyente 2: n-Hexano:Acetato de Etilo con 0.1% de TFA (90:10)

Eluyente 3: n-Hexano:Acetato de Etilo con 0.1% de TFA (50:50)

Para el revelado de los ésteres se asperjó sobre la placa una solución de ácido sulfúrico al 5% en metanol y se expuso a 150°C en un horno por 1-2 minutos hasta visualizar los compuestos.

#### 9.1.2.6 Técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

Se utilizó un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución Waters con detector en UV de arreglo de diodos (PDA, Photo Diode Array) Waters y se trabajó en un rango de longitudes de onda desde 195 a 300 nm con una resolución de 1.2 nm. Los compuestos vainillílicos se detectaron a 280 nm y los bencílicos a 206 nm. La columna cromatográfica empleada fue Spherisorb 80-5 ODS-2 (4.6 x 250 mm) con una precolumna.

La fase móvil empleada fue una mezcla de Acetonitrilo:Ácido trifluoroacético acuoso al 0.1% (70:30) a razón de 1 mL/min.

### 9.1.2.7 Método UNIFAC

Se empleó un programa adquirido por nuestro laboratorio y desarrollado en Visual Basic que corre en Microsoft Excel para calcular los coeficientes de actividad ( $\gamma$ ). El programa contiene una base de datos de los parámetros de los grupos funcionales y las ecuaciones del Método UNIFAC original. El Método fue actualizado mediante la adición de nuevos grupos químicos necesarios para descomponer apropiadamente las moléculas de interés (productos de síntesis) y otras modificaciones. Estas modificaciones corresponden al parámetro de interacciones de grupo ( $\Psi$ ) de acuerdo a Gmehling y Weidlich (Weidlich *et al.*, 1987) para la expansión en el rango de temperatura y la corrección de coeficientes en el término combinatorial de acuerdo a Bastos y col. (Bastos *et al.*, 1988; Voutsas *et al.*, 1997) para predicciones de  $\gamma$  a dilución infinita. La ecuación del Método UNIFAC original y la modificación se muestran en la figura 20. En un sentido estricto, la actualización y modificación corresponden a resultados del proyecto, sin embargo se presentan en esta sección pues se trata de resultados metodológicos.

#### UNIFAC Original

$$\ln \gamma_i = \ln \gamma_i^C + \ln \gamma_i^R$$

Término Combinatorial

$$\ln \gamma_i^C = 1 - \varphi_i + \ln \varphi_i - \frac{z}{2} q_i \left( 1 - \frac{\varphi_i}{F_i} + \ln \left( \frac{\varphi_i}{F_i} \right) \right)$$

$$\varphi_i = \frac{r_i}{\sum_j r_j x_j} \quad F_i = \frac{q_i}{\sum_j r_j x_j}$$

$$r_i = \sum v_k^{(i)} R_k \quad q_i = \sum v_k^{(i)} Q_k$$

Término Residual

$$\ln \gamma_i^R = \sum_k v_k^{(i)} (\ln \Gamma_k - \ln \Gamma_k^{(i)})$$

$$\ln \Gamma_k = Q_k \left( 1 - \ln \left( \sum_m \theta_m \Psi_{mk} \right) - \sum_m \frac{\theta_m \Psi_{km}}{\sum_n \theta_n \Psi_{nm}} \right)$$

$$\theta_m = \frac{Q_m X_m}{\sum_n Q_n X_n} \quad X_m = \frac{\sum_j v_m^{(j)} x_j}{\sum_j \sum_n v_n^{(j)} x_j} \quad \Psi_{nm} = \exp \left( -\frac{a_{nm}}{T} \right)$$

### Modificación UNIFAC (Dortmund)

$$\ln \gamma_i = \ln \gamma_i^C + \ln \gamma_i^R$$

Término Combinatorial

$$\ln \gamma_i^C = 1 - \phi_i' + \ln \phi_i' - 5q_i \left( 1 - \frac{\phi_i'}{F_i} + \ln \left( \frac{\phi_i'}{F_i} \right) \right)$$

$$\phi_i' = \frac{r_i^{3/4}}{\sum_j r_j^{3/4} x_j} \quad \Psi_{nm} = \exp \left( -\frac{a_{nm} + b_{nm}T + c_{nm}T^2}{T} \right)$$

**Figura 20. Método UNIFAC.** Ecuaciones que describen los efectos de tamaño (Término Combinatorial) y de interacciones (Término Residual). La modificación que da lugar al UNIFAC Dortmund ajusta coeficientes y exponentes del término combinatorial y expande el factor  $\Psi$  a un polinomio cuadrático para abarcar un mayor rango de temperaturas.

La actualización del método implicó:

- 1) Sustituir los antiguos parámetros de volúmen y superficie,  $R_k$  y  $Q_k$  por los nuevos, para cada tipo de grupo en el término combinatorial. (Gmehling J, 1993, 1998).

Table III.  $R_k$ - and  $Q_k$ -Parameters and Group Assignment for the Modified UNIFAC (Dortmund) Method

main group	subgroup	no.	$R_k$	$Q_k$	sample group assignment	
1 *CH <sub>2</sub> *	CH <sub>3</sub>	1	0.6325	1.0908	hexane	2 CH <sub>3</sub> , 4 CH <sub>2</sub>
	CH <sub>2</sub>	2	0.6325	0.7081	octane	2 CH <sub>3</sub> , 8 CH <sub>2</sub>
	CH	3	0.6325	0.3554	2-methylpropane	3 CH <sub>3</sub> , 1 CH
	C	4	0.6325	0.0000	neopentane	4 CH <sub>3</sub> , 1 C
2 *C=C*	CH <sub>2</sub> =CH	5	1.2832	1.6016	1-hexene	1 CH <sub>3</sub> , 3 CH <sub>2</sub> , 1 CH <sub>2</sub> =CH
	CH=CH	6	1.2832	1.2489	2-hexene	2 CH <sub>3</sub> , 2 CH <sub>2</sub> , 1 CH=CH
	CH <sub>2</sub> =C	7	1.2832	1.2489	2-methyl-1-butene	2 CH <sub>3</sub> , 1 CH <sub>2</sub> , 1 CH <sub>2</sub> =C
	CH=C	8	1.2832	0.8982	2-methyl-2-butene	2 CH <sub>3</sub> , 1 CH=C
	C=C	70	1.2832	0.4582	2,3-dimethyl-2-butene	4 CH <sub>3</sub> , 1 C=C
3 *ACH*	ACH	9	0.3763	0.4321	naphthalene	8 ACH, 2 AC

- 2) Sustituir los antiguos parámetros  $a_{nm}$  y  $a_{mn}$  por los nuevos e introducir los parámetros  $b_{nm}$ ,  $c_{nm}$ ,  $b_{mn}$  y  $c_{mn}$  para cada tipo de grupo en el término residual. (Gmehling J, 1993, 1998). Estos parámetros son parámetros de interacción intermolecular.

Table 2. New or Revised Modified UNIFAC (Dortmund) Group Interaction Parameters, Where the Main Groups 1–46 Have Been Defined Previously (Gmehling et al., 1993)

$n$	$m$	$a_{nm}/K$	$b_{nm}$	$c_{nm}/K^{-1}$	$a_{mn}/K$	$b_{mn}$	$c_{mn}/K^{-1}$
1	18	1802.3	-17.171	0.03600	-436.15	3.4225	-0.00870
1	42	-117.10	0.5481	-0.00098	170.90	-0.8062	0.00129
1	46	677.32	-2.0066	0.00000	-249.85	1.7054	0.00000
1	47	24.432	0.2915	0.00000	-16.034	-0.5337	0.00000
2	34	642.27	-3.8641	-0.00550	-197.06	1.8723	-0.00270
2	42	2.4060	-0.1882	0.00000	80.200	0.1565	0.00000
2	46	491.23	-1.8285	0.00000	-794.87	3.3483	0.00600
2	47	-86.231	0.0000	0.00000	-39.373	0.0000	0.00000
3	18	-1553.9	0.1615	0.00820	1810.8	-5.7594	0.00230
3	42	134.60	-1.2310	0.00149	-2.6190	1.0940	-0.00156
3	46	313.79	-1.1552	0.00000	-258.12	1.4084	0.00000
3	47	1412.0	-3.9917	0.00000	-660.25	1.4602	0.00000
4	18	135.30	-2.3690	0.00380	1698.1	-9.8887	0.01530
4	42	-107.10	0.2564	0.00000	191.50	-0.5561	0.00000

- 3) Introducir los nuevos grupos y sus parámetros dados a conocer por el consorcio UNIFAC. (Gmehling et al., 1998; Gmehling et al., 2002; Lohmann et al., 2001; Wittig et al., 2003)

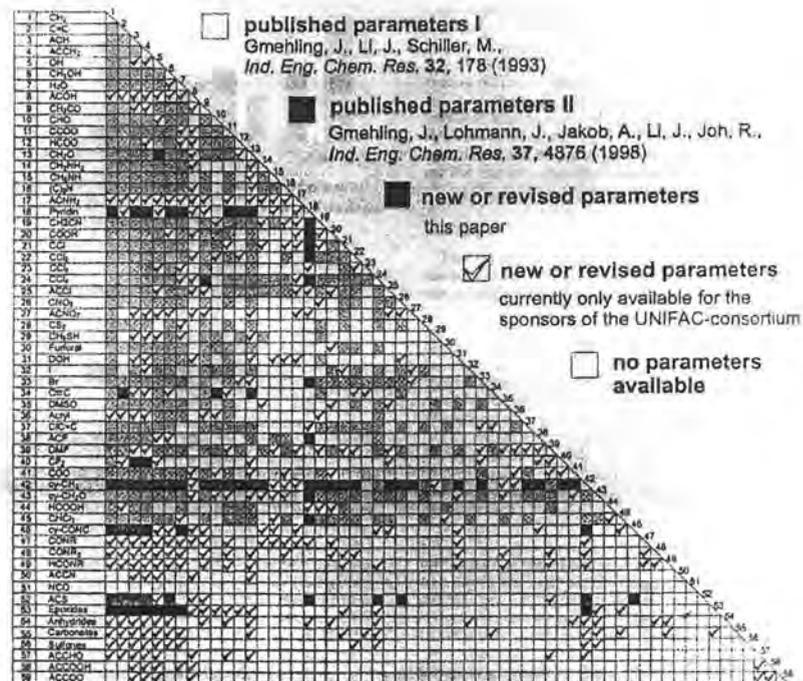


Figure 8. Current parameter matrix of modified UNIFAC (Dortmund) (April 2000).

Los coeficientes de actividad se calcularon a 45°C y dilución infinita entre dos especies para cada caso: el solvente y el capsaicinoide sintetizado.

## 9.2 Electrofisiología

### 9.2.1 Material biológico

#### 9.2.1.1 Obtención de las células espermatoogénicas de ratón.

Las células espermatoogénicas se obtuvieron a partir de los testículos de ratón CD-1 adulto, de 3 y medio meses de edad. Para la preparación de las células espermatoogénicas se utilizó el protocolo previamente reportado con algunas modificaciones (Santi *et al.*, 1996). Este método consiste de manera general en sacrificar ratones adultos por dislocación cervical y posteriormente la remoción de los testículos. Los testículos se colocaron en una solución salina con la siguiente composición (mM): NaCl, 130; KCl, 3; MgCl<sub>2</sub>, 2; NaHCO<sub>3</sub>, 1; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5; Na-HEPES, 5; glucosa, 10; a pH 7.4. Posteriormente en el testículo, se cortó la túnica albugínea que recubre a los túbulos seminíferos, se desmenuzó una porción de los túbulos y se agitó durante al menos 5 min con una pipeta Pasteur para extraer las células espermatoogénicas del interior de los túbulos a la solución salina. Esta preparación se mantuvo en hielo durante la realización de cada ensayo. Se uso una nueva preparación para cada día.

#### 9.2.1.2 Registros electrofisiológicos de la evaluación de los compuestos.

La técnica de Patch-Clamp permite mantener constante el potencial de membrana, al mismo tiempo que se registra la corriente generada por el flujo de iones a través de los canales iónicos. Para este trabajo, todos los registros electrofisiológicos se hicieron en la configuración de célula completa (Whole Cell Patch-Clamp). Esta configuración consiste en colocar la punta de la pipeta sobre la membrana celular y ejercer una ligera succión para fijar la célula y establecer un sello de alta resistencia ( $\geq 1G\Omega$ ). Posteriormente se aplica una succión mayor con el fin de romper la

membrana y establecer una continuidad eléctrica entre la solución de la pipeta (Solución Interna) y el interior de la célula manteniendo el sello de alta resistencia.

Para los registros electrofisiológicos se utilizó una alícuota de células espermatogénicas la cual se colocó en la cámara de registro situada en la platina de un microscopio invertido equipado con óptica Hoffman (Nikon Diaphot TMD, Nikon Corp.). Se dejó que las células se adhirieran al fondo de la cámara y se perfundió con la solución externa por lo menos 8 volúmenes de la cámara. El registro de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T se hizo a  $18^{\circ}\text{C}$  utilizando un amplificador de patch-clamp Axopatch 1B (Axon Instruments, Foster City, CA). Las micropipetas tenían una resistencia de 7-9  $\text{M}\Omega$ . El potencial de mantenimiento empleado durante los experimentos fue de -90 mV. La familia de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  se registró con un protocolo de pulsos depolarizantes desde -90 mV hasta 40 mV en incrementos de 10 mV y de 200 ms de duración. Los ensayos para la evaluación del efecto de los compuestos sobre los CCTDV se realizaron registrando la corriente con un protocolo que consistió en una serie de pulsos de 200 ms de duración a -25 mV repitiéndose cada 30 segundos durante 12 minutos. El compuesto a evaluar se agregó después de observar estabilidad en la magnitud de la corriente, generalmente al 4º o 5º pulso. Se registraron al menos 8 corrientes en presencia del compuesto hasta ver estabilidad en la magnitud de la corriente. El lavado del compuesto se realizó perfundiendo al menos 12 veces el volumen de la cámara con solución externa.

La corriente de fuga y las corrientes capacitativas residuales se restaron en línea utilizando un protocolo de P/4. Los registros de las corrientes se grabaron en línea y se digitalizaron a una velocidad de muestreo de 5 kHz y se filtraron a 2 kHz. Los protocolos de pulsos, la captura de los datos y el análisis de los registros se hicieron con el programa pCLAMP (Axon Instruments, Foster City, CA).

### 9.2.1.3 Soluciones de registro

Para aislar a la corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T y facilitar el análisis de los resultados, se utilizaron las soluciones de registro mostradas en las Tablas 3 y 4. La solución externa se mantuvo a 4°C durante los ensayos. Una nueva solución se preparaba cada 3 o 4 semanas. La solución interna se dividió en alícuotas de 2 mL que se conservaron a -20°C. Durante los ensayos la alícuota empleada se mantuvo en hielo.

**Tabla 3.** Componentes y concentraciones de la solución externa en la que se suspendieron las células espermatogénicas de ratón.

Solución Externa	Concentración (mM)
$\text{CaCl}_2$	10
$\text{NaCl}$	130
$\text{KCl}$	3
$\text{MgCl}_2$	2
$\text{NaHCO}_3$	1
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	0.5
HEPES	5
Glucosa	10
pH	7.4

**Tabla 4.** Componentes y concentraciones de la solución interna.

Solución Interna	Concentración (mM)
Cs-Metanosulfonato	110
CsF	10
CsCl	15
EGTA	5
ATP-Na	4
Fosfocreatina	10
HEPES	5
pH	7.4

### 9.2.1.4 Soluciones de capsicina y análogos.

Se preparó una solución concentrada a 50 mM en etanol de cada uno de los compuestos a evaluar. De esta solución se preparó una solución diluída con solución externa y de esta dilución se tomaron volúmenes específicos que se agregaron a la cámara de registro durante el ensayo para registrar la corriente en presencia del compuesto. La muestra de solución diluída añadida a la cámara de registro se tomó de manera que la concentración final obtenida en la cámara fuera la deseada (50  $\mu\text{M}$  para los análogos de caspaína y de 0.2, 1, 3, 10, 30, 40, 47, 50, y 100  $\mu\text{M}$  para la curva dosis-respuesta) manteniendo la concentración de etanol al 0.1% o menos. Se prepararon soluciones concentradas cada mes manteniéndose a 4°C. Las soluciones diluídas se preparaban cada semana.

## 10. RESULTADOS Y DISCUSION

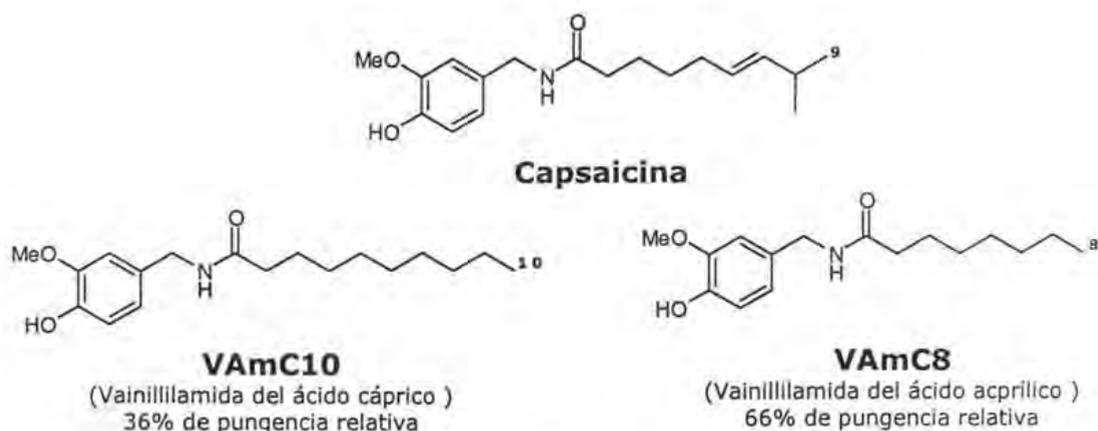
### 10.1 Síntesis de análogos de capsaicina

#### 10.1.1 Selección de sustratos

Teniendo como objetivo encontrar un método enzimático quimioselectivo para resolución de mezclas amina-alcohol se decidió trabajar con la vainillilamina (VAM) puesto que su acilación nos permite generar capsaicinoides de valor agregado con una potencial aplicación en la industria alimentaria ó farmacéutica.

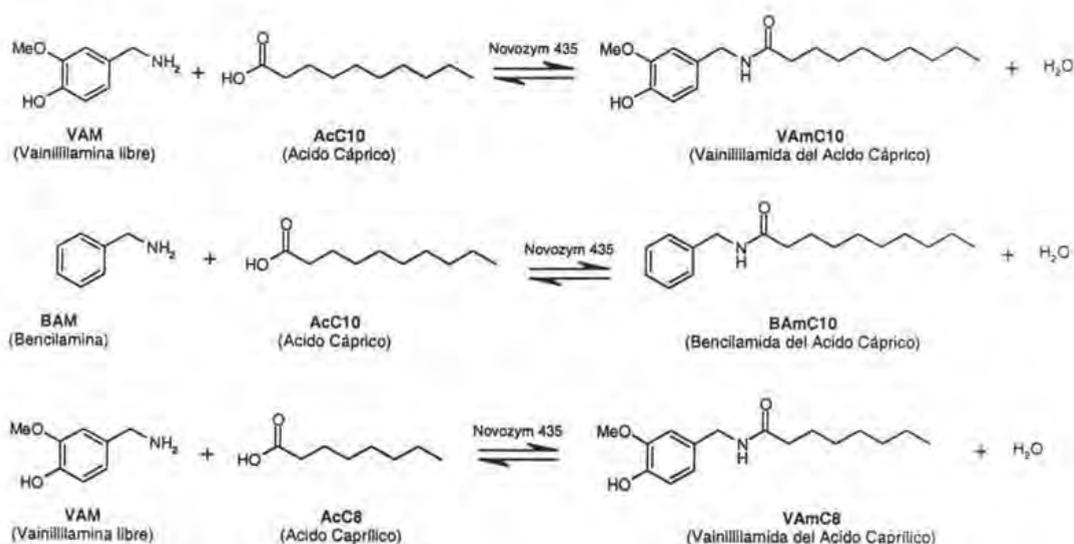
De esta manera, la VAM y su alcohol análogo, el vainillilalcohol, VAOH, constituyen la mezcla modelo para el estudio de la resolución quimioselectiva que se busca. Además se decidió incluir en el estudio otra mezcla de amina-alcohol análogos, la bencilamina (BAM) y el bencilalcohol (BOH), que a pesar de que sus productos de acilación tienen menor importancia farmacológica que los vainilloides, permitirán comprender mejor el fenómeno termodinámico.

El donador de acilo fue seleccionado con el propósito de obtener un análogo de capsaicina estructuralmente similar a esta. Con esto en mente, se seleccionó al ácido cáprico (AcC10), para obtener al reaccionarlo con la VAM, la vainillilamida del ácido cáprico (VAmC10) que posee gran similitud estructural con la capsaicina. En un trabajo paralelo a este, la pungencia de esta amida fue evaluada mediante análisis sensorial y su valor relativo a la pungencia de la capsaicina resultó de 36%. Se encontró también que otra amida estructuralmente similar a la capsaicina, la vainillilamida del ácido caprílico (VAmC8), posee una pungencia relativa del 66%. Esta última amida también se sintetizó con la misma metodología con el objetivo de evaluar su efecto en los CCTDV. En la figura 21 se muestran la capsaicina y los dos análogos pungentes con los que se trabajó en este estudio.

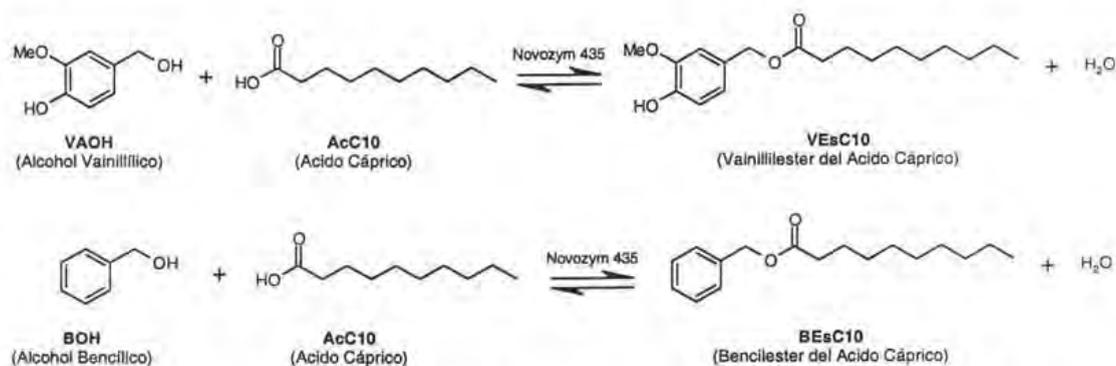


**Figura 21. Estructuras de la capsaicina y de los dos análogos pungentes.** La semejanza estructural de los dos análogos con la capsaicina les confiere propiedades similares, como la pungencia. El número de carbonos de la cadena alifática esta indicado con un pequeño número al final de la misma.

Así, los productos que se obtendrán de las reacciones de síntesis con los sustratos seleccionados son la Vainillilamida del Acido Cáprico (VAmC10), el Vainillilester del Acido Cáprico (VEsC10), la Bencilamida del Acido Cáprico (BAmC10) y el Benciléster del Acido Cáprico (BEsC10), Las reacciones de síntesis de amidas y de ésteres se presentan en las figuras 22 y 23 respectivamente.



**Figura 22. Reacciones de síntesis enzimática de amidas análogas de capsaicina.**



**Figura 23. Reacciones de las síntesis enzimática de ésteres análogos de capsaicina.**

### 10.1.2 Predicciones termodinámicas empleando el Método UNIFAC

Una vez seleccionadas las moléculas modelo, se empleó el Método UNIFAC para calcular su coeficiente de actividad en diferentes solventes con el fin de seleccionar dos solventes que dada su diferente polaridad generaran coeficientes de actividad de la VAmC10 muy distintos uno de otro. Un parámetro que sirvió como referencia previa para definir al solvente como polar ó no polar es el LogP.

El cálculo de los  $\gamma^{\infty}$  con el Método UNIFAC requiere descomponer las especies químicas involucradas en sus grupos moleculares e introducirlas al Método como el conjunto integrado de estos grupos. En la Tabla 5 se muestra la descomposición de los análogos de capsaicina a sintetizar en sus grupos moleculares.

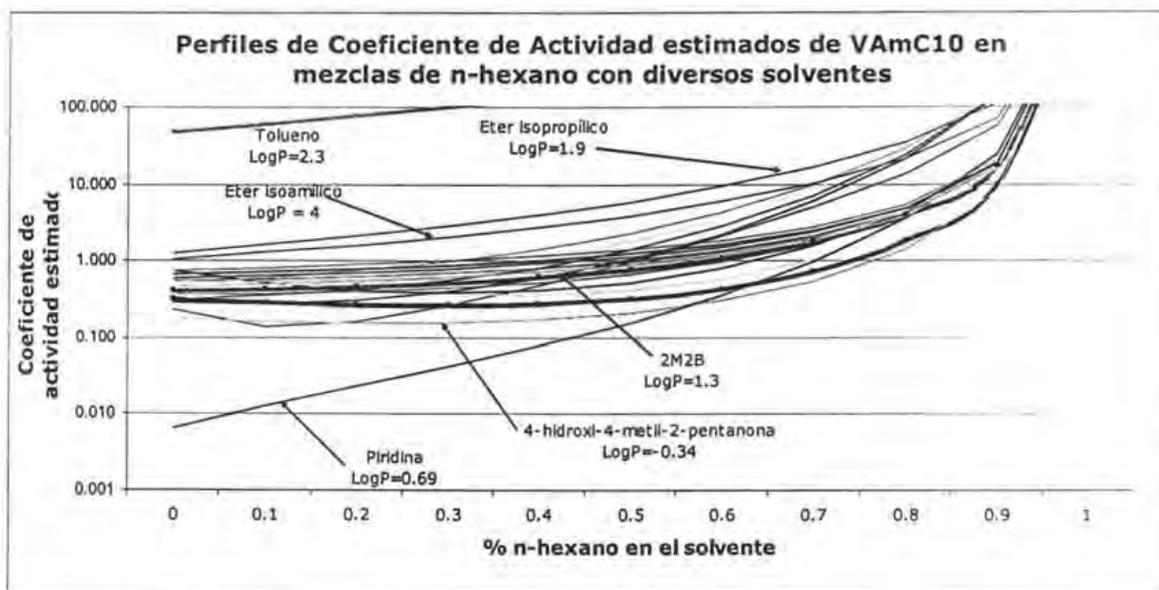
**Tabla 5.** Descomposición de los análogos de capsaicina en sus grupos funcionales. Los valores en cada celda representan el número de grupos químicos en que se descompone la molécula.

	<b>VAmC10</b>	<b>VEsC10</b>	<b>BAmC10</b>	<b>BES10</b>
<b>Subgrupo</b>				
<b>CH<sub>3</sub></b>	1	1	1	1
<b>CH<sub>2</sub></b>	8	8	8	8
<b>CH<sub>3</sub>-O</b>	1	1	0	0
<b>ACH</b>	3	3	5	5
<b>ACOH</b>	1	1	0	0
<b>CH<sub>2</sub>COO</b>	0	1	0	1
<b>AC</b>	2	2	1	1
<b>CONHCH<sub>2</sub></b>	1	0	1	0

Se calcularon los  $\gamma^\infty$  de la VAmC10 en mezclas de HEX con solventes más polares tales como DMSO, DMF, Dioxano, acetona, acetonitrilo 2M2B, butanona, etc. Se empleó al HEX como solvente base debido a que en este solvente se ha demostrado que las enzimas adquieren mayor estabilidad estructural; su fácil evaporación (P.e. 67°C) es conveniente para nuestros fines; finalmente es un solvente altamente hidrofóbico (LogP=3.5) lo que nos permite probar, junto con un solvente hidrofílico, los efectos de dos valores distintos de polaridad en nuestras reacciones. Los cálculos se hicieron de manera que se abarcara un rango relativamente amplio de polaridad en el medio de reacción, desde -1.3 (100% DMSO) hasta 3.5 (100% HEX). Como se observa en la figura 24, todas las mezclas de solventes evaluadas generan un perfil similar: el  $\gamma^\infty$  estimado de la VAmC10 mediante el método UNIFAC crece en forma exponencial desde valores cercanos a cero hasta un poco más de 800, lo cual significa que las interacciones moleculares entre la molécula y la mezcla de solventes comienzan a disminuir drásticamente con el aumento en la concentración de HEX a partir de una relación HEX:Solvente Polar 70:30.

La gráfica demuestra que independientemente de las proporciones de la mezcla, existe un rango de concentraciones que van desde 0 hasta 60% de hexano en el que el  $\gamma^\infty$  no varía significativamente. Esto podría deberse a

que la VAmC10 posee al grupo amida que es altamente polar y una cadena alifática que es hidrofóbica. Estos dos grupos de polaridad opuesta, causan que el Método UNIFAC considere a esta molécula muy soluble tanto en solventes polares como no polares. Sin embargo, parece que las interacciones hidrofílicas son mayores que las hidrofóbicas porque a una composición de 100% de solvente polar, en la que la cadena hidrofóbica debería elevar el  $\gamma^\infty$  por la disminución de interacciones, el  $\gamma^\infty$  no varía de manera importante con respecto al que se obtiene para una composición 60:40 HEX:Solvente polar.



**Figura 24. Coeficientes de actividad de la VAmC10 en diferentes mezclas de solventes con n-hexano.** Los solventes usados en este cálculo son DMSO, Dioxano, DMF, 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona, Acetonitrilo, Acetona, 2-butanona, Piridina, 2-metil-2-propanol, 2-pentanona, 2-metil-2-butanol, 4-metil-2-pentanona, 2-metil-2-pentanol, 3-metil-3-pentanol, 2,4-dimetil-3-pentanol, 3-etil-3-pentanol, 2-metil-2-hexanol, tolueno, Eter butílico, 2-metil-2-heptanol, 2,4,6-trimetil-4-heptanol, 2,6-dimetil-4-heptanol, Eter isoamílico, Isooctano y Dodecano. En la gráfica solo se muestran algunos solventes y su hidrofobicidad como LogP. Se puede ver que el perfil del  $\gamma^\infty$  no varía mucho a pesar de diferencias importantes en la hidrofobicidad como en los casos del Eter isoamílico y 2M2B.

Sin embargo, para 100% HEX, el  $\gamma^\infty$  se dispara indicando que los grupos polares, particularmente la amida VAmC10, no pueden establecer muchas interacciones con el solvente. Ambos comportamientos indican que

el grupo amida, tienen más peso que la cadena hidrofóbica en las interacciones de la molécula, ya sea con un solvente polar ó con uno no polar.

Las diferencias en los valores del  $\gamma^\infty$  en el rango en el que éste se mantiene prácticamente indiferente de la composición de la mezcla no son muy significativas. Esto se deduce del hecho que el  $\gamma$  se puede mover en una escala desde prácticamente cero hasta  $10^6$  o más, por lo que variaciones de 0.5 unidades pueden considerarse insignificativas.

En vista de lo anterior expuesto, y dado que el 2M2B es menos tóxico y no inactiva a las enzimas como la piridina, el DMSO, el dioxano ó la DMF y a su nula reactividad con el biocatalizador, se decidió trabajar experimentalmente con 2M2B como medio de reacción polar (Arcos *et al.*, 1998; Bellot *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2003; Degn *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2002).

En la tabla 6 se presentan los  $\gamma^\infty$  estimados para las cuatro moléculas a sintetizar en 2M2B y en HEX.

**Tabla 6.** Coeficientes de actividad ( $\gamma^\infty$ ) calculados con el Método UNIFAC para los cuatro análogos de capsaicina.

	<b>2M2B</b>	<b>HEX</b>
<b>VAmC10</b>	0.41	894.6
<b>VEsC10</b>	1.89	73.53
<b>BAmC10</b>	1.46	63.88
<b>BEsC10</b>	4.68	2.07

Basándonos en los valores del  $\gamma^\infty$  calculados para la VAmC10 en los dos solventes, 0.41 en 2M2B y 894 en HEX, se puede suponer que existe una afinidad mucho mayor de la molécula VAmC10 por el 2M2B que por el HEX como reflejo de un gran número de interacciones intermoleculares con el primero y muy limitadas con el segundo. Por lo tanto en la síntesis de la VAmC10 se esperaría una mayor conversión en 2M2B dada la mayor

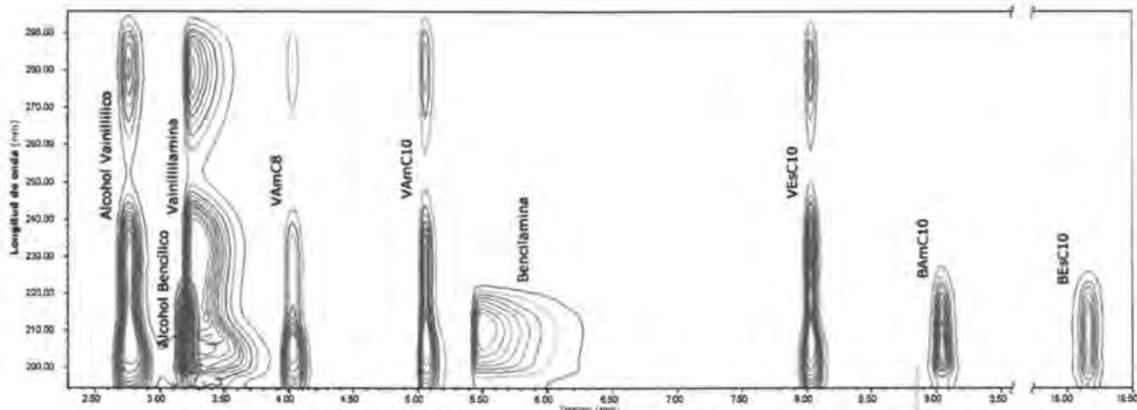
solubilidad de ésta molécula en este solvente con respecto al HEX, lo que desplazaría el equilibrio hacia los productos.

Para el caso del VEsC10, los valores del  $\gamma^\infty$  fueron 73.53 y 1.89 para HEX y 2M2B respectivamente. Bajo la misma óptica, estos cálculos nos sugieren que habría una mayor afinidad de la molécula por el 2M2B que por el HEX a causa de un mayor número de interacciones moleculares y en consecuencia una mayor conversión en 2M2B.

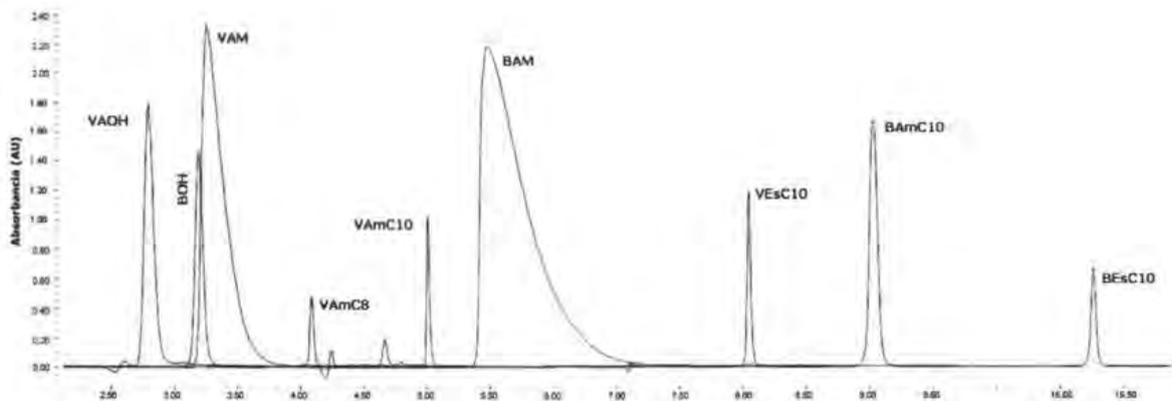
El cálculo de los  $\gamma^\infty$  para los compuestos bencílicos fue: para la BAmC10, 1.46 en 2M2B y 63.88 en HEX; para el BEsC10, 4.68 en 2M2B y 2.07 en HEX. Analizando estos resultados, el Método UNIFAC nos indica que habría una mejor conversión hacia BAmC10 en 2M2B pero para la síntesis de BEsC10, la mejor conversión se observaría en HEX.

### 10.1.3 Cromatografía de sustratos y productos.

El análisis de los sustratos y productos se llevó a cabo en HPLC equipado con un detector de arreglo de diodos (PDA) con la técnica descrita en la sección de Materiales y Métodos. El anillo vainilloide tiene dos máximos de absorbancia a 206 nm y 280 nm, mientras que el anillo bencílico absorbe solo a 206 nm. En la figura 25 se observan los contornos topográficos de los sustratos y productos y la figura 26 muestra los cromatogramas correspondientes. Los donadores de acilo no son detectados pues carecen de dobles enlaces y por lo tanto no tienen absorción en el rango de luz ultravioleta.



**Figura 25. Contornos topográficos de los compuestos bencílicos y vainilloides obtenidos con HPLC y detector de arreglo de diodos.**



**Figura 26. Cromatogramas de los compuestos bencílicos y vainilloides. Los compuestos vainilílicos se detectaron a 280 nm y los bencílicos a 206 nm.**

Los tiempos de retención de los compuestos están relacionados también con su grado de hidrofiliidad/hidrofobicidad. En una cromatografía de fase reversa, como la que empleamos, el soporte está modificado con la unión de cadenas hidrocarbonadas, que en nuestro caso son de 18 carbonos. En consecuencia, la hidrofobicidad del soporte es alta por lo que se usa una fase móvil hidrofílica. Una molécula que tiene un tiempo de retención largo indica que tiene una mayor preferencia por permanecer interactuando en las cadenas hidrofóbicas del soporte que por ser arrastrada por la fase móvil. Ahora, observando la figura 25, los alcoholes y las aminas tienen un tiempo

de retención corto dada su hidrofiliidad mientras que otras moléculas presentan tiempos de retención más largos, siendo el BEsC10 el más hidrofóbico con un tiempo de retención de 16 min aproximadamente. La BAM tiene un tiempo de retención mayor que los otros nucleófilos probablemente por la ausencia de un grupo fuerte donador de puente de hidrógeno como el -OH del BOH con el cual pueda interaccionar con el agua de la fase móvil. Con este análisis cromatográfico también se puede hacer una predicción sobre la conversión de las reacciones, es decir, para este tipo de compuestos, es de esperar una mayor producción de amidas en 2M2B por ser un solvente más hidrofílico que el HEX y una mayor producción de ésteres en HEX. El grado de hidrofiliidad de las moléculas de síntesis, basado en este análisis cromatográfico sería VAmC10>VEsC10>BAmC10>BEsC10. De hecho existen varios métodos para calcular la hidrofobicidad de un compuesto mediante HPLC, entre los que se encuentran el de Fujita-Hansch, de Rekker y de Hansch-Leo que, de manera general, consisten en una suma ponderada de constantes experimentales de hidrofobicidad de grupos moleculares, de manera similar a una contribución de grupos (EPA, 1996; Fujita, 1964; Hansch *et al.*, 1979; Leo, 1971; Rekker *et al.*, 1979). Bajo esta aproximación se podría predecir también cualitativamente el grado de interacción entre especies químicas de interés y solventes, aportando la pauta a seguir para proponer medios de reacción.

#### 10.1.4 Acilación enzimática quimioselectiva de sustratos separados.

La conversión obtenida en la síntesis enzimática de los compuestos analizados se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7.** Coeficientes de actividad y conversiones alcanzadas en las reacciones de síntesis de análogos de capsaicina.

	2M2B		HEX	
	$\gamma$	Conversión (%) Promedio $\pm$ e.e.m (n $\geq$ 3)	$\gamma$	Conversión (%) Promedio $\pm$ e.e.m (n $\geq$ 3)
<b>VAmC10</b>	0.41	93.3 $\pm$ 6.6	894.6	3.33 $\pm$ 1.76
<b>VEsC10</b>	1.89	15.66 $\pm$ 1.2	73.53	94.66 $\pm$ 0.33
<b>BAmC10</b>	1.46	99.66 $\pm$ 0.57	63.88	14.66 $\pm$ 0.66
<b>BEsC10</b>	4.68	9.33 $\pm$ 1.20	2.07	100 $\pm$ 0

Estos resultados muestran que la selectividad de la enzima se invierte marcadamente al cambiar la polaridad del solvente. Vemos que las conversiones en la síntesis de amidas en 2M2B y de ésteres en HEX es alrededor del 96%. En cambio, se observaron bajas conversiones al intentar la síntesis de amidas en HEX y de ésteres en 2M2B, que en ningún caso fueron superiores al 15%.

El equilibrio de las reacciones enzimáticas se desplaza hacia la formación de productos como consecuencia del bajo contenido de agua en el sistema, a la presencia de tamiz molecular en el medio de reacción y a que el solvente es capaz de disolver a la molécula recién sintetizada.

Las bajas conversiones de amidas en HEX y de ésteres en 2M2B se pueden atribuir entre otras causas, a la poca capacidad de las moléculas sintetizadas y de los solventes de interactuar mutuamente. Esto hace que el medio de reacción se sature rápidamente con la molécula sintetizada y se alcance el equilibrio.

Ahora bien, comparando las predicciones basadas en el Método UNIFAC con los resultados experimentales, se puede constatar que las predicciones son acertadas en todos los casos con excepción de la síntesis del VEsC10. De acuerdo a los valores del  $\gamma^\infty$  del VEsC10 calculados con el Método UNIFAC, la reacción de síntesis del VEsC10 debió haber resultado en una mayor conversión en 2M2B que en HEX porque el  $\gamma^\infty$  del compuesto en 2M2B es menor que en HEX. También se puede observar que, para una molécula en particular, la diferencia entre los valores del  $\gamma^\infty$  en los dos solventes es mucho menor que la diferencia entre los valores del  $\gamma^\infty$  de la VAmC10 en los dos solventes. Los  $\gamma^\infty$  de la VAmC10 fueron de 0.41 y 894.6 para 2M2B y HEX respectivamente, es decir 3 órdenes de magnitud de diferencia. En cambio para el resto de las moléculas se reduce a diferencias de entre 1 y 2 órdenes de magnitud. Particularmente para el BEsC10 que es la molécula más hidrofóbica de todas las sintetizadas, se podría esperar un  $\gamma^\infty$  mucho mayor en 2M2B que el obtenido (4.68); sin embargo la diferencia entre los  $\gamma^\infty$  de esta molécula en HEX y 2M2B es de unas cuantas unidades. Esta pequeña diferencia entre los valores de  $\gamma^\infty$  haría suponer que la conversión en la síntesis de estas moléculas debería ser de magnitud semejante, pero vemos que coincidentemente, en la síntesis del BEsC10, cuyos valores de  $\gamma^\infty$  en los dos solventes son iguales en términos prácticos, los resultados en las conversiones son diametralmente opuestos.

Las incongruencias del Método UNIFAC respecto a los resultados experimentales pueden deberse a: **1)** Las imprecisiones inherentes de un método predictivo, **2)** Los parámetros del Método UNIFAC se basan en equilibrios vapor-líquido y nuestro sistema es líquido-líquido, **3)** El Método UNIFAC es impreciso para predecir coeficientes de actividad a dilución infinita en mezclas altamente no ideales (Zhang *et al.*, 2002) . Una mezcla ideal es aquella en la que en el proceso de mezclado no hay un cambio de volumen y entalpía, el cambio de entropía es igual al de una mezcla

gaseosa, el cambio en la energía libre es debido exclusivamente a la entropía y los componentes en la mezcla son completamente miscibles uno en otro en todas las proporciones (Barton, 1991). Aunque no se realizaron los cálculos termodinámicos para verificar si nuestras mezclas son ideales o no, por la simple diferencia de tamaños y forma entre productos y solvente y por la solubilidad parcial de estos productos en los solventes, podemos decir que nuestras mezclas son no ideales.

Es importante mencionar que el Método UNIFAC por sí mismo es una herramienta cualitativa en el sentido que solo estima el grado de interacción entre las especies en cuestión. Obtener una predicción cuantitativa y más certera del equilibrio en una reacción usando éste método, implicaría realizar las reacciones a una concentración de sustratos al menos 30 veces mayor a la empleada, es decir 0.6 M y además contar con mediciones experimentales de algunas propiedades como presiones de vapor de los capsaicinoides. Evidentemente la necesidad de realizar trabajo experimental para desarrollar métodos predictivos es lógica, pero el método pierde utilidad en nuestro caso cuando se requiere para ello trabajo experimental adicional.

A pesar de esto y considerando los resultados de las conversiones obtenidas, se puede concluir que la modificación de la quimioselectividad de la enzima con estos dos solventes funcionó aceptablemente.

#### 10.1.5 Acilación enzimática quimioselectiva en mezcla de sustratos

Se realizó la síntesis enzimática con dos nucleófilos en el mismo reactor, la VAM para formar amidas y el VAOH para formar ésteres. Esta síntesis se llevo a cabo en las mismas condiciones que las anteriores (45°C,

equilibrio >72 hrs. con agitación magnética). Las concentraciones de sustratos y las conversiones obtenidas se muestran en las tablas 8 y 9.

**Tabla 8.** Componentes y concentraciones usadas en la síntesis enzimática con dos nucleófilos.

Componente	Concentración
VAM	20 mM
VAOH	20 mM
AcC10 (Acido cáprico)	40 mM
Amina terciaria (DIPEA)	360 mM
Enzima (Novozym 435)	20 mg/mL
Tamiz molecular	20 mg/mL
Solvente	5 mL

**Tabla 9.** Conversiones obtenidas en la síntesis enzimática con dos nucleófilos.

	2M2B	HEX
	Conversión (%) Promedio ± e.e.m (n≥3)	Conversión (%) Promedio ± e.e.m (n≥3)
<b>VAmC10</b>	87.0 ± 1.52	3.12 ± 0.58
<b>VEsC10</b>	1.33 ± 0.66	5.87 ± 2.15

En este experimento se observó un comportamiento no esperado de la enzima en la síntesis del éster en HEX mientras que en 2M2B la preferencia de la enzima a sintetizar la amida VAmC10 se corroboró. El 87% de conversión de la VAM hacia la VAmC10, aunque es un valor ligeramente menor comparado con la conversión en la síntesis de VAmC10 sin mezcla de nucleófilos, significa una preferencia a producir 65 veces más (87/1.33) la amida que el éster.

Al haber obtenido mayormente ésteres en HEX en los experimentos anteriores sin mezcla de nucleófilos, en este experimento se esperaba una tendencia semejante. Aunque la síntesis del éster en HEX en este experimento fue favorecida ligeramente (1.88 veces) respecto a la de la amida, la conversión del VAOH fue notablemente baja (<6%) con respecto a la obtenida en ausencia de la VAM (94.6%). Con los experimentos realizados

no es posible conocer la razón de este resultado. Sin embargo, una posible explicación es una inhibición de la enzima por la amida inducida por el solvente. La enzima es capaz de sintetizar amida en HEX hasta alcanzar cierta conversión de VAM, que coincidentemente es alrededor del 3% tanto para el caso de síntesis individual (solo la VAM como nucleófilo) como para la síntesis con mezcla de nucleófilos. Este punto puede estar indicando la solubilidad de la amida en HEX, es decir, ya no existe energía suficiente en el solvente para disolver una molécula más. A partir de este momento, la amida recién sintetizada que se encuentra todavía en el sitio activo se queda unida a la enzima, como inhibidor, indefinidamente por dos factores. El primer factor es la solubilidad en el HEX y el segundo factor es la relativa alta polaridad del sitio activo, el cual atrae a la amida que también es polar. Bajo estas premisas, no existe suficiente energía en el sistema para desorber a la amida del sitio activo y en consecuencia la enzima queda inhibida.

A manera de resumen, en la tabla 10 se presentan los  $\gamma^\infty$  y las conversiones obtenidas en las síntesis de los análogos de capsaicina. A la luz de estos resultados, la síntesis en 2M2B se destaca para utilizarse como método de resolución quimioselectiva de mezclas amina-alcohol.

**Tabla 10.** Resumen comparativo de los  $\gamma^\infty$  y las conversiones logradas en las síntesis de análogos de capsaicina.

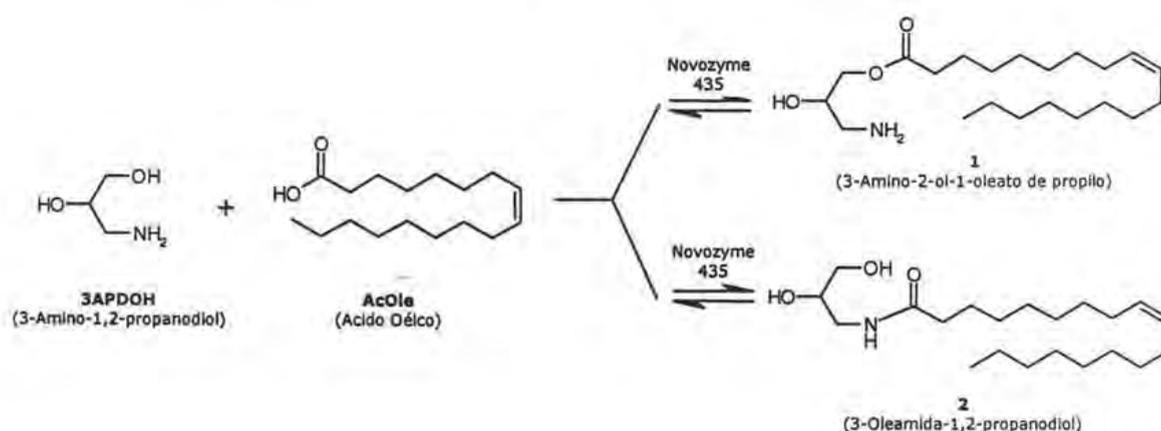
	2M2B		HEX	
	$\gamma$	Conversión (%) Promedio $\pm$ e.e.m (n $\geq$ 3)	$\gamma$	Conversión (%) Promedio $\pm$ e.e.m (n $\geq$ 3)
VAmC10	0.41	93.3 $\pm$ 6.6	894.6	3.33 $\pm$ 1.76
VEsC10	1.89	15.66 $\pm$ 1.2	73.53	94.66 $\pm$ 0.33
BAmC10	1.46	99.66 $\pm$ 0.57	63.88	14.66 $\pm$ 0.66
BEsC10	4.68	9.33 $\pm$ 1.20	2.07	100 $\pm$ 0
Mezcla de nucleófilos	VAmC10	87.0 $\pm$ 1.52	3.12 $\pm$ 0.58	
	VEsC10	1.33 $\pm$ 0.66	5.87 $\pm$ 2.15	

Habiendo comprobado la selectividad de la enzima hacia la producción de este tipo de amidas en 2M2B y de acuerdo a las condiciones de la Tabla 1, se realizó la síntesis del VAmC8 en 2M2B obteniéndose una conversión 99% a 68 hrs. Este compuesto se utilizó al igual que el VAmC10 en los ensayos electrofisiológicos.

### 10.1.6 Acilación enzimática quimioselectiva de una molécula bifuncional.

Finalmente se buscó la acilación quimioselectiva de un aminoalcohol. La predicción a partir de los resultados experimentales obtenidos con dos solventes, hacen suponer que la síntesis de la amida se deberá favorecer en 2M2B y la del éster en HEX.

El nucleófilo utilizado fue el ( $\pm$ )-3-Amino-1,2-propanodiol (3APDOH) en lugar de la VAM con un grupo hidroxilo más en la posición 5 o 6 ya que es muy probable que la enzima no la utilice debido a impedimentos estéricos. El donador de acilo seleccionado fue el ácido oléico (AcOle) dado que se cuenta con estándar de la monooleamida. La reacción se muestra en la figura 27.



**Figura 27. Reacción de esterificación y amidación para la resolución de la molécula bifuncional ( $\pm$ )-3-amino-1,2-propanodiol con ácido oleico.** Se muestran las 2 posibles opciones de reacción. La esterificación en el grupo hidroxilo secundario no se muestra ya que la enzima es selectiva para las posiciones 1 y 3.

Como primer paso se calcularon los  $\gamma^\infty$  de los dos productos posibles, el 3-amino-2-ol-1-oleato de propilo (1) y el 3-oleamida-1,2-propanodiol (2). La descomposición en grupos de estas dos moléculas se muestra en la tabla 11 y los  $\gamma^\infty$  calculados junto con la conversión obtenida experimentalmente se muestran en la tabla 12.

**Tabla 11.** Descomposición en grupos de los productos de síntesis (1) y (2) de la reacción del ( $\pm$ )3-Amino-1,2-propanodiol con ácido oleico. Los valores en cada celda representan el número de grupos químicos en que se descompone la molécula.

	1	2
<b>Súgrupo</b>		
CH <sub>3</sub>	1	1
CH <sub>2</sub>	14	15
CH	1	1
OH(primario)	0	1
OH(secundario)	1	1
CH <sub>2</sub> COO	1	0
CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	1	0
CH=CH	1	1
CONHCH <sub>2</sub>	0	1

**Tabla 12.** Coeficientes de actividad calculados para los productos (1) y (2) y la conversión obtenida para cada uno en su síntesis enzimática.

	2M2B		HEX	
	$\gamma$	Conversión (%)	$\gamma$	Conversión (%)
1	0.34	17	30.42	70
2	0.75	83	3712.9	30

El análisis de los  $\gamma^\infty$  calculados nos indican que tanto el producto 1, un éster, como el 2, una amida, se producirían ambos en mayor cantidad en 2M2B. Las conversiones resultaron, por el contrario, acordes con las expectativas: mayor conversión de la amida en 2M2B y mayor conversión del éster en HEX. Una vez más, la predicción de la dirección de la reacción con los  $\gamma^\infty$  no se ajustó a la realidad experimental para el caso del éster.

Como se puede observar de la tabla 12, se provocó una mayor selectividad usando 2M2B (4.88 veces más amida que éster) que usando HEX (2.33 veces más éster que amida). Esto probablemente es debido a que el HEX tiene capacidad para disolver las cadenas hidrofóbicas ya sea del éster ó de la amida. El 2M2B por el contrario tiene reducida esta capacidad.

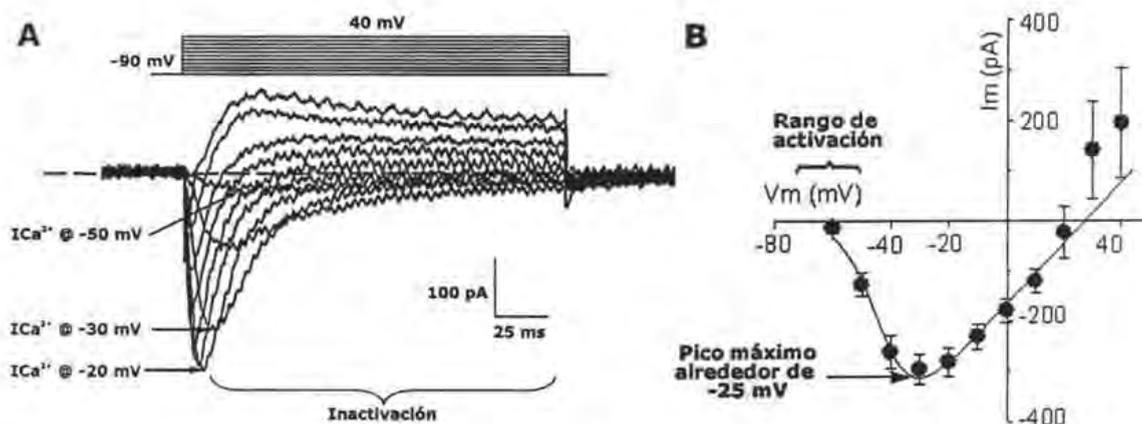
Finalmente, a la luz de estos resultados, es necesario validar los cálculos del Método UNIFAC con mediciones experimentales de solubilidad. Experimentalmente se pudo corroborar la capacidad para modificar la quimioselectividad de la enzima mediante ingeniería de solventes con la cual se pudo resolver mezclas amina-alcohol. Se logró acilar enzimática y quimioselectivamente un aminoalcohol.

## 10.2 Ensayos electrofisiológicos

La importancia de los CCTDV radica entre otros factores por los recientes descubrimiento sobre su participación en fenómenos de analgesia (Bourinet *et al.*, 2005; Dogrul *et al.*, 2003; Pathirathna *et al.*, 2005; Todorovic *et al.*, 2004; Todorovic *et al.*, 2001). Este descubrimiento abrió una nueva aproximación para abordar el fenómeno del dolor, el cual afecta a una gran proporción de la población mundial y tiene un impacto económico importante.

## 10.3 Identificación de corrientes de $\text{Ca}^{2+}$ tipo T.

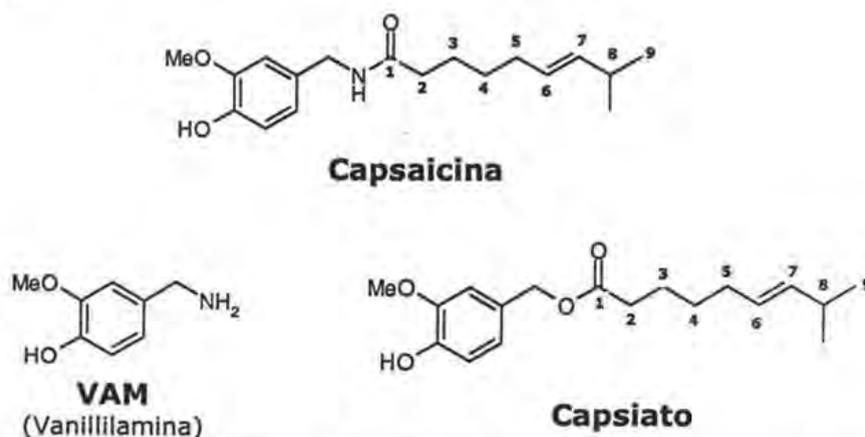
Primeramente se identificaron las corrientes y se verificó que fueran corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T. Los registros control obtenidos de las células espermatoogénicas muestran las características principales de las corrientes T como su activación cercana al potencial de reposo (-60 a -50 mV) y el pico máximo alrededor de -30 mV (Figura 28). También se puede notar la rápida inactivación, la cual es completa aproximadamente en 150 ms y el entrecruzamiento de las corrientes debido a su rápida activación e inactivación (Figura 28A).



**Figura 28. Características biofísicas de las corrientes registradas en células espermatogénicas de ratón.** (A) Familia de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T obtenidas de células espermatogénicas de ratón. Se señalan 3 voltajes a los que se obtiene el registro de la corriente y el lapso de tiempo en que se inactivan casi completamente. Se observa una activación e inactivación dependiente de voltaje, el pico máximo a  $-20$  mV y el entrecruzamiento de las corrientes característico de las corrientes tipo T. (B) Curva I-V que representa los promedios de los picos máximos de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T a diferentes voltajes. Los canales de calcio dependientes de voltaje de bajo umbral de activación se activan a voltajes menores ( $-70$  a  $50$  mV) que los de alto umbral de activación ( $-40$  a  $-10$  mV) y presentan el pico máximo de corriente a voltajes entre  $-40$  mV y  $-10$  mV. Los símbolos representan los valores promedio  $\pm$  E.E.M. ( $n \geq 3$ )

#### 10.4 Efecto de la capsaicina sobre los CCTDV.

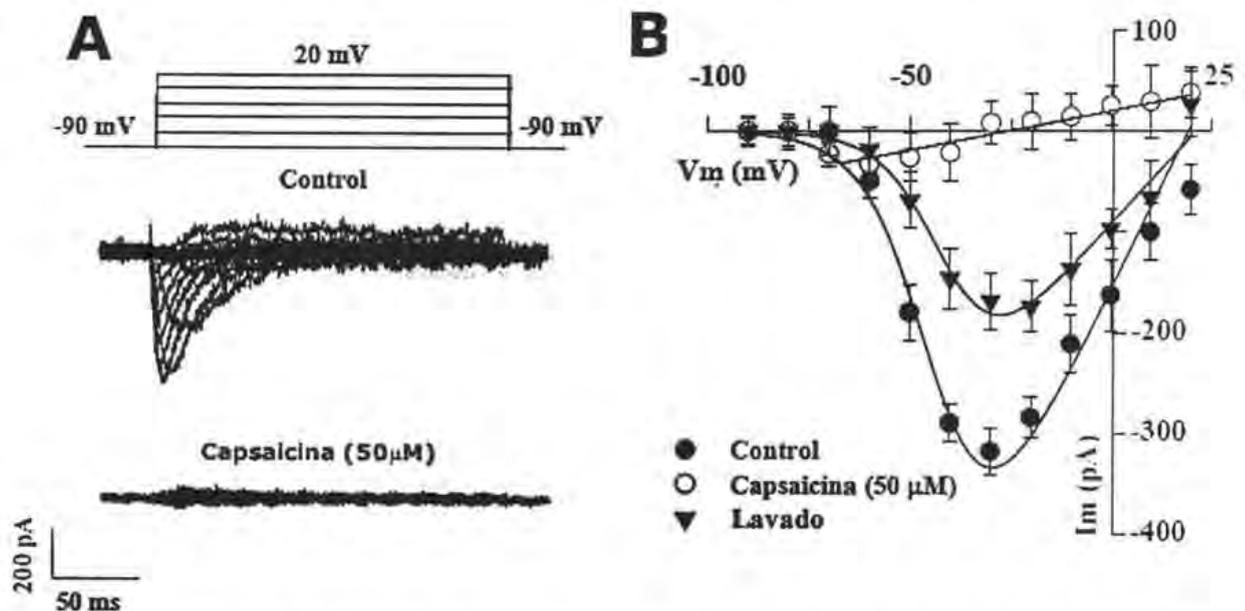
Parte del presente trabajo se realizó anteriormente con el Grupo de trabajo del Dr. Alberto Darszon, en el que se realizaron estudios electrofisiológicos con los que se determinó la actividad de la capsaicina, su análogo no pungente, el capsiato y la vainillilamina (VAM) (Figura 29) sobre los CCTDV.



**Figura 29. Estructuras de la capsaicina, del capsiato y de la VAM.**

En dichos ensayos y de acuerdo con los reportes realizados en canales de alto umbral de activación (Balla Z *et al.*, 2001; Bielefeldt, 2000; Bleakman *et al.*, 1990; Docherty *et al.*, 1991), se probó una concentración de capsaicina, capsato y VAM de 50  $\mu\text{M}$  por ser una concentración saturante para canales de  $\text{Ca}^{2+}$  de alto umbral de activación.

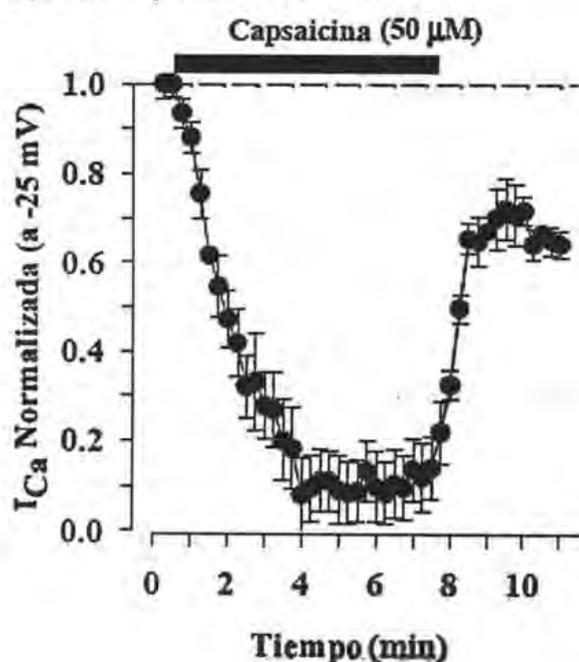
Al igual que en otros canales de calcio dependientes de voltaje, la capsaicina inhibió las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T y en este caso la inhibición fue casi total ( $90.3\% \pm 10.8$ ) a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  (Figura 30A). La máxima inhibición se alcanza después de 3 min de aplicar la capsaicina (Figura 31). Esta inhibición es parcialmente reversible (Figura 30B), recuperándose cerca del 75% de la corriente aproximadamente en 1.0 min después de lavar la capsaicina (Figura 31). Esta rápida recuperación de la corriente al lavar la capsaicina sugiere que la capsaicina está actuando en la parte extracelular del canal. Este dato contrasta con el mecanismo de la inhibición por capsaicina reportada para CCDV de alto umbral de activación,



**Figura 30. Efecto inhibitorio de la capsaicina sobre las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T.** (A) Familia de corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T obtenida a diferentes pulsos de voltaje partiendo de un potencial de mantenimiento de -90 mV hasta 20 mV. La aplicación de la capsaicina a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  inhibió reversiblemente el 90% de la corriente. (B) Curvas de relación corriente-voltaje (I-V) obtenidas en tres condiciones: control, capsaicina 50  $\mu\text{M}$  y lavado. Los símbolos representan los valores promedio  $\pm$  el E.E.M. con  $n \geq 3$ .

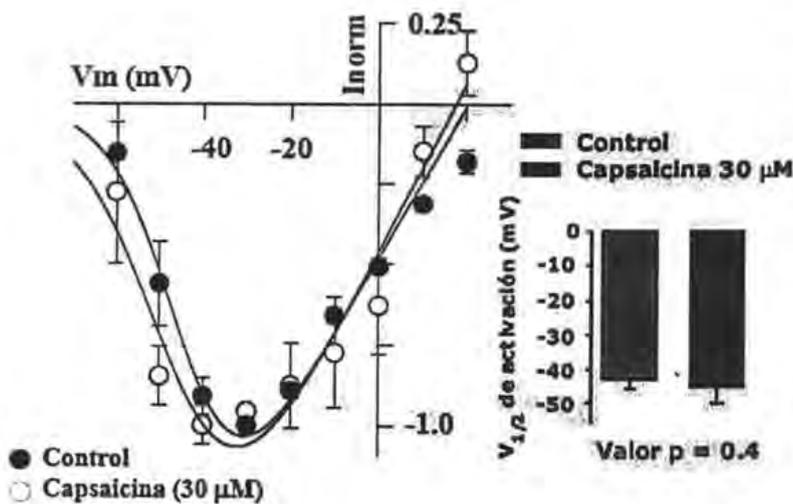
De acuerdo a estos estudios, se sugiere que las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  en estos canales, se inhiben después de una aplicación de capsaicina que provoca la elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular mediada por los receptores de capsaicina expresados en la misma célula (Bleakman *et al.*, 1990; Docherty *et al.*, 1991). Esta puede ser la razón por la que en los CCDV de alto umbral de activación, la recuperación de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  inhibidas por capsaicina, después de su lavado, sea lenta (Kopanitsa *et al.*, 1995).

Un agente inhibidor funciona ya sea obstruyendo el poro ó modificando el mecanismo de apertura y cierre del canal (gating). Con el fin de saber cual de estos dos tipos de inhibición ejerce la capsaicina, se realizaron curvas I-V. Una curva I-V sirve además de conocer el voltaje de activación, el voltaje al pico y el voltaje de inversión de las corrientes, para detectar un cambio en el "gating". Cuando existe una alteración en el mecanismo natural de apertura y cierre, la curva I-V se desplaza hacia la derecha o a la izquierda, lo que generalmente significa una menor o mayor sensibilidad al voltaje respectivamente. Clásicamente, el desplazamiento de la curva I-V ocurre debido a que una molécula se une al canal interfiriendo con el desplazamiento del sensor de voltaje. Una molécula que actúa de esta manera sobre el canal recibe el nombre de modificador del mecanismo de apertura y cierre del canal.



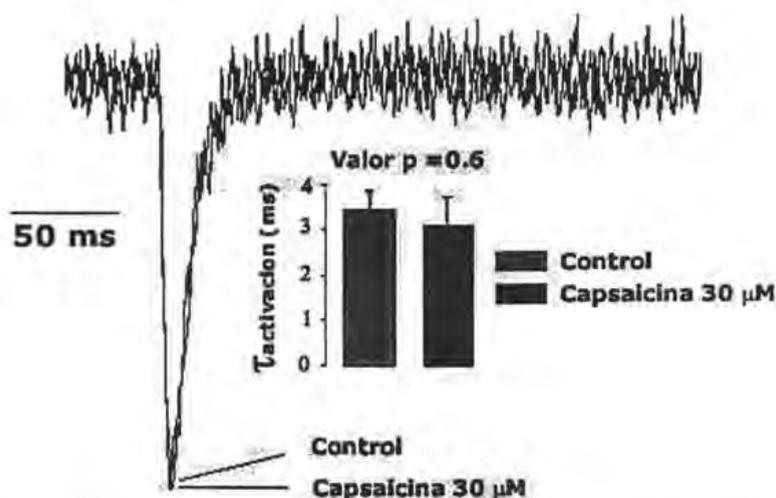
**Figura 31. Curso temporal del ensayo de inhibición de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T.** La máxima inhibición de las corrientes tipo T por capsaicina ocurre después de 3 min . La corriente remanente estable fue de  $9.7\% \pm 10.8$ . La rápida recuperación de la corriente al lavar la capsaicina (1 min) sugiere que está actuando en la parte extracelular del canal. Los símbolos representan los valores promedio  $\pm$  el E.E.M. con  $n \geq 3$ .

Los perfiles de las curvas I-V control y en presencia de capsaicina se superponen bien a voltajes depolarizados pero se superponen con menos exactitud a voltajes cercanos al potencial de reposo (Figura 32). Para determinar si este ligero desfase a voltajes cercanos al potencial de reposo entre la curva I-V control y la curva I-V en presencia de capsaicina es significativo y en consecuencia saber si la capsacina afectaba o no al sensor de voltaje, se calcularon los voltajes medios de activación para ambas curvas obteniéndose  $-43.9 \pm 2.1$  mV y  $-45.98 \pm 4.3$  mV para las corrientes control y las corrientes en presencia de capsaicina respectivamente (Inserto en figura 32). El valor  $P=0.4$  de la prueba t-student obtenido para el voltaje medio de activación con capsaicina permite considerar la curva I-V con capsaicina igual a la curva I-V control. Adicionalmente se escalaron los trazos de una corriente control y otra en presencia de capsaicina para comparar la cinética de activación (Figura 33).



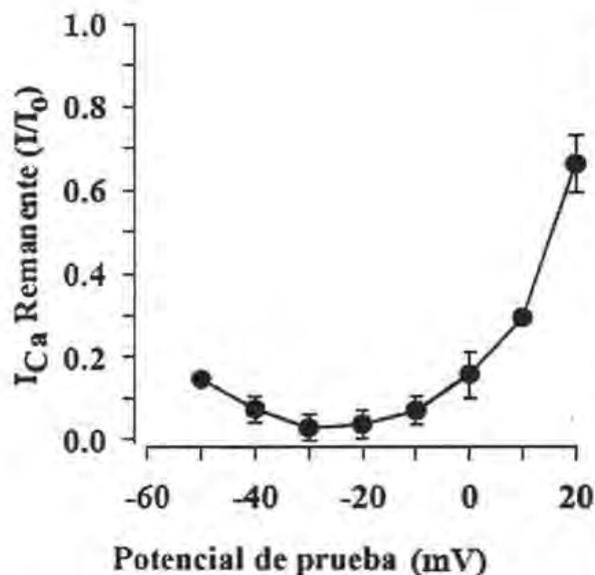
**Figura 32. La capsaicina inhibe las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T sin interactuar con el sensor de voltaje.** Curvas de relación corriente-voltaje (I-V) para la condición control y en presencia de capsaicina  $30 \mu\text{M}$ . La similitud del perfil de la curva en presencia de capsaicina con el perfil de la curva control sugiere que la capsaicina no está actuando como modificador del mecanismo de apertura y cierre del canal. Las corrientes están normalizadas con respecto a la corriente observada a  $-25$  mV (corriente pico). El inserto de gráfica de barras presenta el voltaje medio de activación de las corrientes control ( $-43 \pm 2.1$  mV) y de las corrientes en presencia de capsaicina ( $-45 \pm 4.3$  mV).  $P=0.4$ . Las barras y los círculos representan los valores promedio  $\pm$  el E.E.M. con  $n \geq 3$ .

Se calcularon los valores de  $\tau$  de activación obteniéndose  $\tau_{act}$  (Control) =  $3.5 \pm 0.3$  ms y  $\tau_{act}$  (Capsaicina 30  $\mu$ M) =  $3.1 \pm 0.6$  ms (Inserto en Figura 33). El valor  $P=0.6$  de la  $\tau_{act}$  (Capsaicina 30  $\mu$ M) indica que los valores de las  $\tau$  de activación de las dos curvas I-V se pueden considerar iguales. Estos datos permiten concluir también que ambas curvas I-V son estadísticamente iguales y se puede interpretar como una inhibición en la que la capsaicina no interactúa con el sensor de voltaje.



**Figura 33. Trazos escalados de la corriente control y de la corriente en presencia de capsaicina.** La activación en ambos casos presenta valores medios de  $\tau_{act}$  Control =  $3.5 \pm 0.3$  ms y  $\tau_{act}$  Capsaicina 30 mM =  $3.1 \pm 0.6$  ms. El valor p de la prueba t-student es de 0.6. La cinética de activación es en consecuencia estadísticamente igual. Las barras en los paneles A y B y los círculos en el panel A representan los valores promedio  $\pm$  el E.E.M. con  $n \geq 3$ .

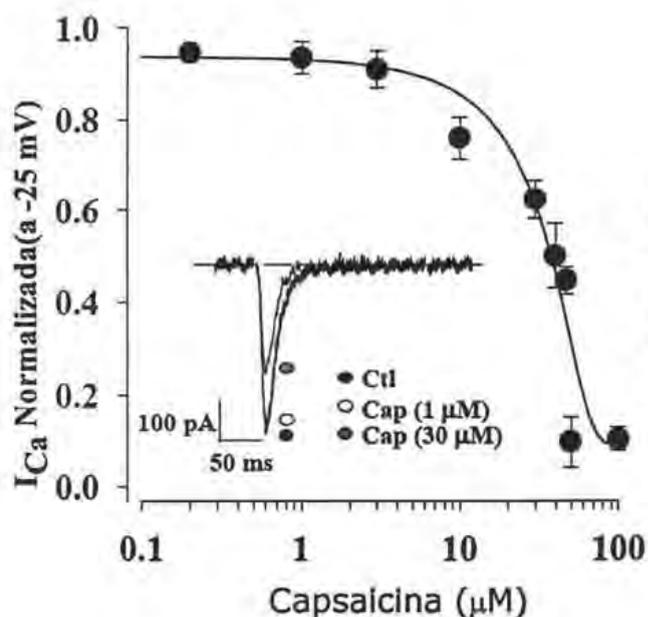
La figura 34 muestra que la inhibición es dependiente de voltaje, teniendo un máximo de inhibición ( $ICa_{remanente}$  de  $2.69 \pm 3.15\%$ ) alrededor de -30 mV. A partir de voltajes superiores a -30 mV, voltaje en el cual se presenta el pico mayor, las corrientes iónicas comienzan a disminuir a causa de la reducción del gradiente electroquímico que reduce el influjo de corrientes catiónicas al interior de la célula cada vez más depolarizado.



**Figura 34. Dependencia de voltaje de la inhibición de las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo T con capsaicina ( $50 \mu M$ ).** El gradiente electroquímico comienza a influir sobre las corrientes a voltajes depolarizantes a partir de  $-30$  mV dificultando cada vez mas el ingreso de corrientes catiónicas a la célula en el registro control debido a efectos repulsivos de carga eléctrica. La fuerza de las corrientes catiónicas entrantes que ayudan a mantener a la capsaicina en el poro disminuyen a medida que se depolariza la célula y la Inhibición disminuye también. Las corrientes remanentes están normalizadas con respecto al valor máximo de la corriente observada en cada voltaje probado. Los símbolos representan el valor promedio  $\pm$  el E.E.M. con  $n \geq 3$ .

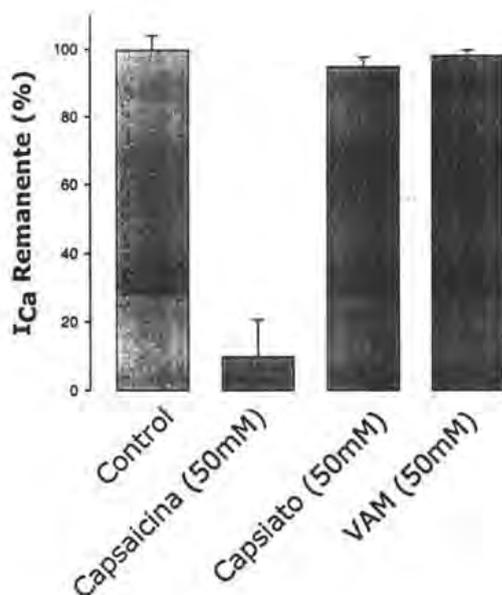
La dependencia de voltaje es consistente con la inhibición de las corrientes por obstrucción del poro. La capsaicina se mantiene unida al poro por su afinidad con el sitio de unión y por la fuerza impulsora de las corrientes catiónicas que intentan entrar por el canal. La reducción del gradiente electroquímico que se da a medida que se depolariza la célula ocasiona que esta fuerza disminuya. Finalmente al alcanzar el voltaje de inversión de las corrientes iónicas, la capsaicina es empujada hacia fuera de la célula por estas corrientes reduciendo el bloqueo significativamente ( $I_{Ca_{remanente}} = 2\%$  a  $-30$  mV;  $I_{Ca_{remanente}} \sim 66\%$  a  $20$  mV en figura 34).

En vista de la potencia inhibitoria de la capsaicina sobre las corrientes tipo T, se realizaron pruebas sobre los canales CCTDV a diferentes concentraciones de capsaicina para obtener la curva dosis-respuesta. Esta curva (ajuste sigmoïdal con la ecuación de Hill) permitió determinar el valor de la  $IC_{50}$  de la capsaicina sobre los CCTDV alrededor de  $40 \mu M$  (Figura 35), la cual es muy alta comparada con la  $IC_{50}$  de la capsaicina sobre su receptor, el canal TRPV1, la cual se reporta en  $99$  nM (Gavva *et al.*, 2004; Iida *et al.*, 2003)



**Figura 35. Curva dosis-respuesta de la capsaicina en los CCTDV.** En el inserto se muestran los trazos de las corrientes obtenidas en condiciones control, con capsaicina a 1  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ . Los símbolos representan el valor promedio  $\pm$  el E.E.M. con  $n \geq 3$ .

El capsiato y la VAM no tuvieron efecto inhibitorio estadísticamente significativo ( $5.3 \pm 2.8\%$  y  $2.0 \pm 1.6\%$  de inhibición y valores P de 0.18 y 0.30 respectivamente) a la misma concentración (50  $\mu\text{M}$ ) con la que se ensayó la capsaicina (Figura 36). Estos resultados hacen notorio el hecho que ni el anillo vainilloide con sus 2 grupos sustituyentes, ni el grupo amino, son capaces de provocar inhibición de corrientes tipo T. Por otro lado, Sutoh e Ida y col. reportaron posteriormente la inestabilidad del capsiato en una solución externa de registro similar a la usada en este trabajo (Iida *et al.*, 2003; Sutoh *et al.*, 2001). A raíz de estos reportes, se decidió verificar ese dato en nuestro grupo de trabajo. Nuestros resultados en el ensayo de hidrólisis de capsiato en la solución externa de registro muestran que el capsiato se hidroliza 65% en 7 min. Este hecho es con seguridad la explicación de la ausencia del efecto inhibitorio del capsiato en los CCTDV, por lo cual no se puede saber con esta estrategia si el capsiato es un inhibidor de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T.



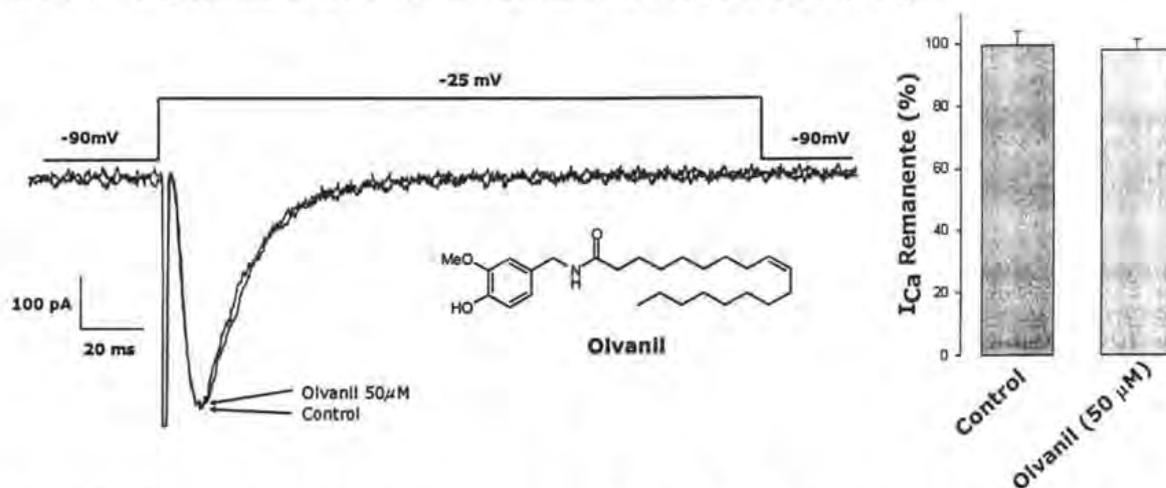
**Figura 36. Corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo T remanentes al aplicar los compuestos.** Las barras representan los valores promedio  $\pm$  E.E.M, con  $n \geq 3$ .

### 10.5 Efecto de algunos análogos de capsaicina sobre los CCTDV.

Dado que la capsaicina posee la capacidad de inhibir las corrientes tipo T, en el presente trabajo buscó ampliar el conocimiento de este fenómeno y de determinar la influencia de algunas variaciones en la estructura de la capsaicina en la inhibición. Por esta razón, se evaluó el efecto que tienen sobre estas corrientes dos análogos estructurales de capsaicina, la VAmC8 y la VAmC10 las cuales conservan la propiedad de pungencia en un 66% y 36% respectivamente. Además de estos compuestos se probó otro análogo de capsaicina, el olvanil, que es la vainilliamida del ácido oléico, ya que es un capsaicinoide que fue empleado como analgésico no pungente en la década de los años 80 (Dray *et al.*, 1996).

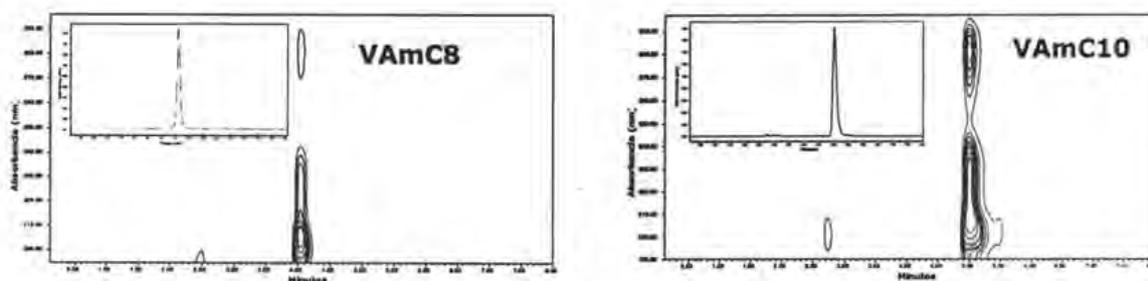
Para efectos comparativos con la capsaicina, los ensayos con los análogos de capsaicina se realizaron a una concentración de 50  $\mu$ M.

El ensayo con olvanil tiene como objetivo saber si la analgesia reportada de este compuesto podría relacionarse con inhibición de corrientes tipo T. El resultado de este ensayo se presenta en la figura 37 y revela que el olvanil no tiene efecto estadísticamente significativo ( $2 \pm 3.2\%$  y  $P=0.41$ ) sobre las corrientes tipo T a la concentración probada ( $50 \mu\text{M}$ ).



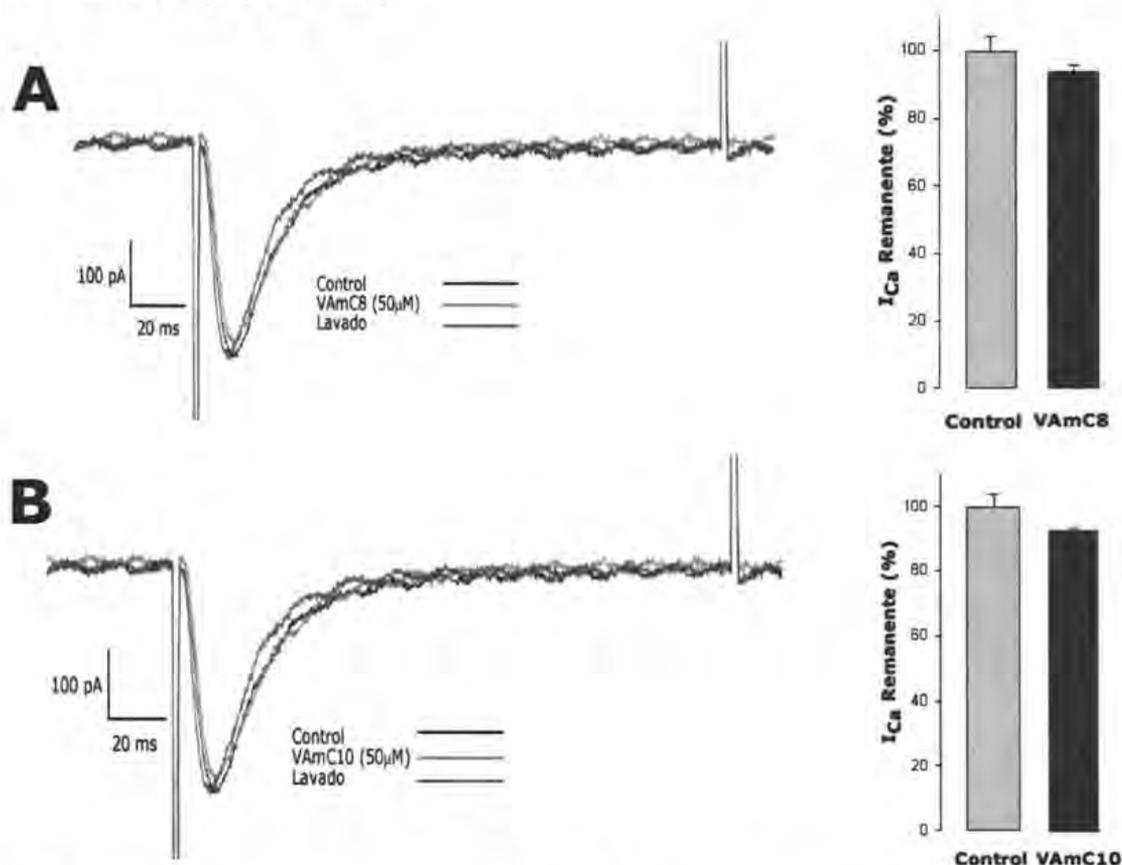
**Figura 37. Registros de las corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T en condiciones control y en presencia de Olvanil  $50 \mu\text{M}$ .** Las barras representan los promedios  $\pm$  el E.E.M. con  $n \geq 3$ .

Para los ensayos con VAmC8 y VAmC10, estos compuestos se purificaron mediante los métodos descritos en la sección de Materiales y Métodos y su pureza fue analizada en HPLC. Los cromatogramas de estos compuestos puros obtenidos en HPLC se muestran en la figura 38.



**Figura 38. Contornos topográficos de la VAmC8 y VAmC10 en HPLC.** El método utilizado es el descrito en la sección de Materiales y Métodos. Los Insertos muestran la absorbancia a 280 nm.

La VAmC8, que es el compuesto más picante de los 2 ensayados tuvo un ligero efecto inhibitorio en las corrientes T del  $6.4 \pm 2.26\%$  con  $P= 0.08$  (Figura 39A). Para el caso de la VAmC10 la inhibición fue de  $7.8 \pm 1.27\%$  con  $P=0.001$  (Figura 39B).



**Figura 39. Registros de las corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T obtenidos en la evaluación de la los capsaicinoides sintetizados.** Registros en los que se probó VAmC8 (A) y VAmC10 (B). Las gráficas de barras de la derecha muestran la corriente control y la remanente normalizada al aplicar el compuesto. Las barras de los compuestos representan los valores promedio  $\pm$  el E.E.M. con  $n \geq 3$ .

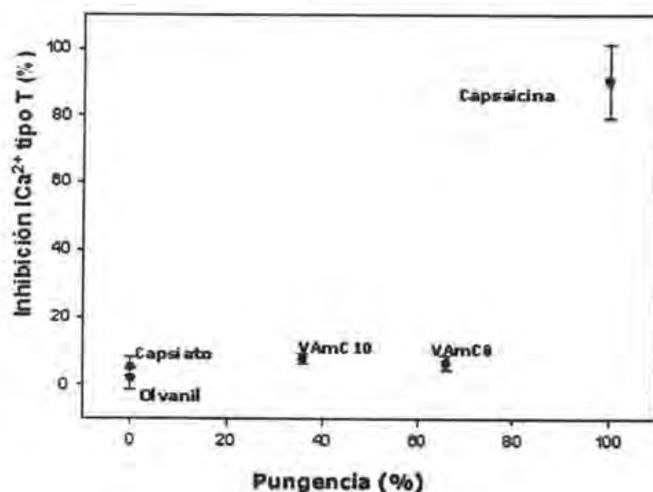
Respecto al olvanil, existen algunas posibles explicaciones de la baja inhibición de las corrientes tipo T: un plegamiento de su cadena hidrofóbica sobre sí misma y una partición preferencial del olvanil hacia la membrana celular. Los enlaces covalentes entre los carbonos, excepto entre los  $\text{C}_9$  y  $\text{C}_{10}$ , que corresponden al doble enlaces cis-, proveen de movilidad rotacional a la cadena. La larga cadena hidrofóbica del olvanil al encontrarse en un medio acuoso adoptará una estructura que minimice su energía

conformacional, y tendrá una tendencia a plegarse sobre si misma o adherirse a la cadena hidrofóbica de otra molécula de olvanil o a cualquier otra superficie hidrofóbica. Al encontrarse plegada la cadena hidrofóbica o adherida a otra molécula de olvanil, la afinidad por el sitio de unión en el canal puede disminuir debido a los impedimentos estéricos causados por el plegamiento o por la agregación de dos o mas moléculas de olvanil.

Es posible también que el olvanil particione preferencialmente hacia la membrana celular que hacia el canal debido a su larga cadena hidrofóbica. Bajo este enfoque se pueden analizar los otros análogos de capsaicina probados, VAmC8 y VAmC10, y determinar si existe una relación entre inhibición y partición. Una manera de medir la hidrofobicidad, como se comentó en anteriormente, es mediante los perfiles de elusión en HPLC (Fujita, 1964; Hansch *et al.*, 1979; Leo, 1971; Rekker *et al.*, 1979). Con la columna de HPLC usada, una molécula hidrofóbica eluye a tiempos mayores que una hidrofílica. La capsaicina tiene un tiempo de elusión entre 4.5 y 5 min mientras que los tiempos de elusión de las amidas VAmC8 y VAmC10 son de 4 y 5 min respectivamente. Estos datos permiten deducir que el escaso efecto inhibitorio de VAmC8 y VAmC10 no es por una partición preferencial hacia la membrana celular sino más bien por la estructura de las moléculas. Es posible que el olvanil, una molécula mucho más hidrofóbica que las dos anteriores, sí presente una partición preferencial hacia la membrana celular. Sin embargo dado que el olvanil es una amida que, al igual que la VAmC8 y VAmC10, posee una estructura vainilloide, no es posible conjeturar que la baja inhibición de las corrientes por el olvanil se deba exclusivamente a un efecto de partición. La VAmC8 y VAmC10 tienen una partición similar que la capsaicina y tienen escaso efecto inhibitorio. Es decir, la baja inhibición de las corrientes causada por el olvanil, así como la de la VAmC8 y VAmC10, puede ser debida a las diferencias en la cadena hidrocarbonada respecto a la capsaicina.

Como la capsaicina actúa en los CCTDV y en los TRPV1 se trató de buscar si existe similitud en los sitios de unión a capsaicina en ambos canales. Una aproximación preliminar para determinar la similitud es una gráfica que correlacione los efectos de la molécula en ambos canales. La gráfica apropiada para decidir si puede haber similitud en los sitios de unión a capsaicina en ambos canales es una gráfica de inhibición de corrientes tipo T vs. activación del canal TRPV1. Como los valores de activación de TRPV1 por VAmC8 y VAmC10 no están disponibles, además que realmente no se tiene información sobre la inhibición de corrientes tipo T por el capsiato, esta gráfica no proporcionaría información útil con tan pocos puntos. En su lugar, se utilizó una gráfica de inhibición de corrientes tipo T vs. pungencia.

La figura 40 presenta la gráfica Pungencia-Inhibición de corrientes tipo T. De acuerdo con esta gráfica no existe una clara correlación entre estas dos propiedades de los capsaicinoides.



**Figura 40. Gráfica Pungencia-Inhibición de corrientes de Ca<sup>2+</sup> tipo T.** Con esta información no es posible establecer una relación entre estas dos propiedades de los capsaicinoides. Las barras significan el valor promedio  $\pm$  el E.E.M con  $n \geq 3$ .

Estas conclusiones preliminares apoyan la idea que el sitio de unión para la inhibición en los canales tipo T y el sitio de unión para la activación por capsaicina en el canal vaniloide (TRPV1) son diferentes y que probablemente no compartan alguna secuencia común. Walpole y col. demostraron que en el canal vainilloide (TRPV1), el anillo aromático

vainilloide sustituido con 3-metoxi y 4-hidroxi (Walpole *et al.*, 1993c), así como la capacidad de la molécula de establecer puentes de hidrógeno en la región B (Figura 2) (Walpole *et al.*, 1993a) y un óptimo en la longitud de cadena entre 8-12 carbonos (Walpole *et al.*, 1993b) es importante para la activación del canal TRPV1 pero la ramificación en el carbono 8 de la cadena hidrocarbonada no (Walpole *et al.*, 1993b). Dos grupos de investigación identificaron una secuencia aminoacídica en el canal TRPV1, y sugieren que esta secuencia forma el sitio de unión a capsaicina (Gavva *et al.*, 2004; Jordt *et al.*, 2002). Consistente con la hipótesis de sitios de unión a capsaicina diferentes en ambos canales, es el hecho de no encontrar esta secuencia en el CCTDV. Con los experimentos de este trabajo y los resultados de Walpole y col. es posible distinguir un punto en común sobre la acción de capsaicinoides en ambos canales. Este punto es la longitud de cadena, la cual aparentemente debe ser de 9 carbonos para considerarse como un compuesto potente. Podría explicarse de la siguiente manera: los compuestos con cadena corta no alcanzan a hacer contacto con algún aminoácido importante mientras que los de cadena mayor a 9 carbonos tienen dificultad en acomodarse en el espacio destinado para 9 carbonos.

Por otra parte, la  $IC_{50}=40 \mu M$  de la capsaicina nos permite comparar esta concentración con la concentración de capsaicina en las cremas comerciales con propiedades analgésicas. Las cremas analgésicas Zostrix® y Axsain® contienen concentraciones de 0.025% y 0.075% de capsaicina como único agente activo analgésico. Asumiendo una densidad de la crema alrededor entre 0.8 y 0.9 gr/mL, la concentración de capsaicina en las cremas sería entre 654 y 736  $\mu M$  en un gramo de crema. Este rango de concentraciones es más de 16 veces la  $IC_{50}$  obtenida para los CCTDV, lo que indica que estas cremas sí pueden bloquear las corrientes tipo T.

Aunque estos experimentos no permiten confirmar la participación directa de los CCTDV en el fenómeno de analgesia provocada por capsaicina tampoco descartan esta posibilidad.

Los valores  $IC_{50} = 99 \text{ nM}$  e  $IC_{50} = 40 \text{ }\mu\text{M}$  de la capsaicina sobre los canales TRPV1 y los CCTDV respectivamente, indican que primeramente se activarán los canales TRPV1 y después los CCTDV. Esto es consistente con la sintomatología inicial característica de la capsaicina en el que se experimenta primero pungencia y después analgesia. Esta sería una posible explicación de este fenómeno. Existen la inactivación de los TRPV1 mediada por  $Ca^{2+}$  y la muerte celular por influjo excesivo de  $Ca^{2+}$  a la célula como otras explicaciones del mismo.

## 11. CONCLUSIONES

### 11.1 Síntesis enzimática

- El método UNIFAC sirvió como referencia cualitativa y presentó ciertas limitaciones para predecir el equilibrio de las reacciones enzimáticas realizadas.
- El desarrollo de métodos experimentales basados en tiempos de retención en HPLC puede aplicarse para estimar cualitativamente las interacciones solvente-producto de una reacción.
- Se logró sintetizar preferencialmente amidas en 2-metil-2-butanol (conversión > 93%) y los ésteres análogos en n-hexano (conversión > 94%).
- Se logró resolver la mezcla de sustratos amina-alcohol en 2-metil-2-butanol con una selectividad de 65 veces más para acilar la amina que el alcohol.
- La acilación enzimática quimioselectiva del ( $\pm$ )-3-Amino-1,2-propanodiol fue moderada en ambos solventes. La selectividad para acilar la amina en 2-metil-2-butanol fue de 4.88 veces y la selectividad para acilar el alcohol en n-hexano fue de 2.3 veces.
- De manera general, la acumulación en la síntesis de una molécula se favorecerá en aquel solvente con el que pueda establecer el mayor número de interacciones moleculares.

## 11.2 Actividad de capsaicinoides en CCTDV.

- La capsaicina inhibió las corrientes tipo T en células espermatogénicas en un 90% de manera parcialmente reversible.
- La  $IC_{50}$  de la capsaicina sobre los CCTDV fue de 40  $\mu$ M.
- En la inhibición de las corrientes T, la capsaicina actúa directamente en la porción extracelular de los canales CCTDV.
- No existe una interacción directa de la capsaicina con el sensor de voltaje. Por consiguiente se sugiere que la inhibición es mediante obstrucción del poro.
- La VAmC8 y VAmC10 a 50  $\mu$ M causaron un efecto inhibitorio de las corrientes en CCTDV del 6.4% y 7.8%.
- El 2% de inhibición de las corrientes de  $Ca^{2+}$  tipo T con olvanil no es estadísticamente significativo.
- El alcance de este trabajo solo permite establecer un punto en común sobre el sitio de unión a capsaicina entre los canales TRPV1 y los CCTDV: una longitud de cadena óptima de 9 carbonos.
- La partición de los capsaicinoides entre el canal y la membrana celular aparentemente no es un efecto que contribuya a su baja inhibición de corrientes tipo T.
- En conjunto, todos estos resultados apoyan la hipótesis de que los CCTDV podrían estar participando como uno de los blancos terapéuticos en el fenómeno de analgesia inducido por capsaicina

## Bibliografía

**Akaike, N., Kanaide, H., Kuga, T., Nakamura, M., Sadoshima, J.-I. and Tomoike, H.** (1989). "Low-voltage-activated calcium current in rat aorta smooth muscle cells in primary culture." *Journal of Physiology* **416**: 141-160.

**Alfonso, I., Astorga, C., Rebolledo, F. and Gotor, V.** (1996). "Sequential biocatalytic resolution of (+/-)-trans-cyclohexane-1,2-diamine. Chemoenzymatic synthesis of an optically active polyamine." *Chemical Communications*(21): 2471-2472.

**Altier, C. and Zamponi, G. W.** (2004). "Targeting Ca<sup>2+</sup> channels to treat pain: T-type versus N-type." *Trends in Pharmacological Sciences* **25**(9): 465-470.

**Andersen, P., Eccles, J. C. and Sears, T. A.** (1964). "The ventro-basal complex of the thalamus: types of cells, their responses and their functional organization." *Journal of Physiology* **174**: 370-399.

**Appendino, G., De Petrocellis, L., Trevisani, M., Minassi, A., Daddario, N., Moriello, A. S., Gazzieri, D., Ligresti, A., Campi, B., Fontana, G., Pinna, C., Geppetti, P. and Di Marzo, V.** (2005). "Development of the first ultra-potent "capsaicinoid" agonist at transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) channels and its therapeutic potential." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **312**(2): 561-570.

**Arcos, J. A., Otero, C. and Bernabé, M.** (1998). "Quantitative enzymatic production of 1,6-diacyl fructofuranoses." *Enzyme and Microbial Technology* **22**(1): 27-35.

**Ardhaoui, M., Falcimainge, A., Ognier, S., Engasser, J. M., Moussou, P., Pauly, G. and Ghou, M.** (2004). "Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids." *Journal of Biotechnology* **110**: 265-271.

**Arnoult, C., Cardullo, R. A., Lemos, J. R. and Florman, H. M.** (1996). "Activation of mouse sperm T-type Ca<sup>2+</sup> channels by adhesion to the egg zona pellucida." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(23): 13004-13009.

**Balla Z, Szoke E, Czeh G and J., S.** (2001). "Effect of capsaicin on voltage-gated currents of trigeminal neurones in cell culture and slice preparations." *Acta Physiol Hung* **88**(3-4): 173-196.

**Barrett, P. Q., Lu, H., Colbran, R., Czernik, A. and Pancrazio, J. J.** (2000). "Stimulation of unitary T-type Ca<sup>2+</sup> channel currents by calmodulin-dependent protein kinase II." *Am J Physiol Cell Physiol* **279**: 1694 - 1703.

- Barton, A.** (1991). CRC Handbook of Solubility of Parameters and other Cohesion Parameters, CRC Pr I Llc.
- Bastos, J. C., Soares, M. E. and Medina, A. G.** (1988). "Infinite dilution activity coefficients predicted by UNIFAC group contribution." *Industrial and Engineering Chemistry Research* **27**(7): 1269-1277.
- Bean, B. P.** (1989). "Classes of calcium channels in vertebrate cells." *Annual Review of Physiology* **51**: 367-384.
- Bellot, J. C., Choisnard, L., Castillo, E. and Marty, A.** (2001). "Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification." *Enzyme and Microbial Technology* **28**(4-5): 362-369.
- Benham, C. D., Davis, J. B. and Randall, A. D.** (2002). "Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels." *Neuropharmacology* **42**(7): 873-888.
- Bentley, T. W., Llewellyn, G. and McAlister, J. A.** (1996). "S<sub>n</sub>-2 mechanism for alcoholysis, aminolysis, and hydrolysis of acetyl chloride." *Journal of Organic Chemistry* **61**(22): 7927-7932.
- Berglund, P.** (2001). "Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis." *Biomolecular Engineering* **18**: 13-22.
- Besson, J. M. and Chaouch, A.** (1987). "Peripheral and Spinal Mechanisms of Nociception." *Physiological Reviews* **67**(1): 67-186.
- Bevinakatti, H. S. and Newadkar, R. V.** (1990). "Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of N,O-Diacetyl-2-Amino-1-Butanol in Diisopropyl Ether." *Tetrahedron-Asymmetry* **1**(9): 583-586.
- Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y. and De Waard, M.** (2000). "The I-II loop of the Ca<sup>2+</sup> channel alpha(1) subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit." *Neuron* **25**(1): 177-190.
- Bielefeldt, K.** (2000). "Differential effects of capsaicin on rat visceral sensory neurons." *Neuroscience* **101**(3): 727-736.
- Björkling, F., Godfredsen, S. E. and Kirk, O.** (1989). "A highly selective enzyme-catalysed esterification of simple glucosides." *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **14**: 934-935.

**Bleakman, D., Brorson, J. R. and Miller, R. J.** (1990). "The effect of capsaicin on voltage-gated calcium currents and calcium signals in cultured dorsal root ganglion cells." *British Journal of Pharmacology* **101**: 423-431.

**Bley, K. R.** (2004). "Recent developments in transient receptor potential vanilloid receptor 1 agonist-based therapies." *Expert Opinion on Investigational Drugs* **13**(11): 1445-1456.

**Bordusa, F.** (2002). "Proteases in organic synthesis." *Chemical Reviews* **102**(12): 4817-4867.

**Bornscheuer, U. T. and Kazlauskas, R. J.** (1999). *Hydrolases in organic synthesis - Regio and Stereoselective Biotransformations*, Weinheim:Wiley-VCH.

**Bornscheuer, U. T.** (2002). "Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis." *Fems Microbiology Reviews* **26**(1): 73-81.

**Bornscheuer, U. T., Bessler, C., Srinivas, R. and Krishna, S. H.** (2002). "Optimizing lipases and related enzymes for efficient application." *Trends in Biotechnology* **20**(10): 433-437.

**Bourinet, E., Stotz, S. C., Spaetgens, R. L., Dayanithi, G., Lemos, J., Nargeot, J. and Zamponi, G. W.** (2001). "Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of  $\alpha$ 1E (CaV2.3) calcium channels." *Biophysical Journal* **81**(1): 79-88.

**Bourinet, E., Monteil, A., Barrère, C., Couette, B., Poirot, O., Pages, A., Nargeot, J., Alloui, A., Eschalièr, A., McRory, J., Snutch, T. P. and Bourinet, E.** (2005). "Silencing of the Ca<sub>v</sub>3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception." *EMBO Journal* **24**(2): 315-324.

**Bousquet, M. P., Willemot, R. M., Monsan, P. and Bours, E.** (1999). "Enzymatic synthesis of unsaturated fatty acid glucoside esters for dermo-cosmetic applications." *Biotechnology and Bioengineering* **63**(6): 730-736.

**Bradbury, A. F. and Smyth, D. G.** (1991). "Peptide amidation." *Trends Biochem. Sci.* **16**: 112-115.

**Bugg, T. D. H.** (2004). "Diverse catalytic activities in the  $\alpha/\beta$ -hydrolase family of enzymes: activation of H<sub>2</sub>O, HCN, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>." *Bioorganic Chemistry* **32**(5): 367-375.

**Butler, M. S.** (2004). "The role of natural product chemistry in drug discovery." *Journal of Natural Products* **67**(12): 2141-2153.

**Carbone, E. and Lux, H. D.** (1984). "A low voltage-activated, fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurons." *Nature* **310**(5977): 501-502.

**Caro, Y., Pina, M., Villeneuve, P. and Reynes, G. J.** (2000). "Lipase activity and fatty acid typoselectivities of plant extracts in hydrolysis and interesterifications." *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **77**(4): 349-354.

**Carrea, G., Ottolina, G. and Riva, S.** (1995). "Role of Solvents in the Control of Enzyme Selectivity in Organic Media." *Trends in Biotechnology* **13**(2): 63-70.

**Carrea, G. and Riva, S.** (2000). ""Medium engineering" of Enzymatic Reactions." *Angewandte Chemie-International Edition* **39**: 2226-2254.

**Castillo, E., Pezzotti, F., López-Mungui?a, A. and Navarro, A.** (2003). "Lipase-catalyzed synthesis of xylitol monoesters: Solvent engineering approach." *Journal of Biotechnology* **102**(3): 251-259.

**Catterall, W. A.** (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**: 521-555.

**Charlton, E., Davies, C., Sidebottom, C. M., Sutton, J. L., Dunn, P. P. J., Slabas, A. R. and Macrae, A. R.** (1991). "Chiral aggregates and asymmetric induction of the reduction of prochiral ketones." *Gesellschaft für Biotechnologische Forschung Monograph* **16**: 335-338.

**Chinsky, N., Margolin, A. L. and Klibanov, A. M.** (1989). "Chemoselective Enzymatic Monoacylation of Bifunctional Compounds." *Journal of the American Chemical Society* **111**(1): 386-388.

**Chuang, R. S.-I., Swartz, K. J., Jaffe, H., Cribbs, L. and Perez-Reyes, E.** (1998). "Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin." *Nature Neuroscience* **1**(8): 668-674.

**Clapes, P., Moran, C. and Infante, M. R.** (1999). "Enzymatic synthesis of arginine-based cationic surfactants." *Biotechnology and Bioengineering* **63**(3): 333-343.

**Clapham, D. E.** (2003). "TRP channels as cellular sensors." *Nature* **426**(6966): 517-524.

**Committee on Biobased Industrial Products, Board on Biology, Commission on Life Sciences and Council, N. R.** (1999). Biobased Industrial Products: Priorities for Research and Commercialization, National Academy Press,.

**Cribbs, L. L., Lee, J. H., Yang, J., Satin, J., Zhang, Y., Daud, A., Barclay, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M. and Perez-Reyes, E.** (1998). "Cloning and characterization of alpha 1H from human heart, a member of the T-type Ca<sup>2+</sup> channel gene family." *Circulation Research* **83**(1): 103-109.

**Cygler, M., Grochuski, P., Kazlauskas, R. J., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Rubin, B., Serreqi, A. N. and Gupta, A. K.** (1994). "A structural basis for the chiral preferences of lipases." *J. Am. Chem. Soc.* **116**: 3180-3186.

**Darszon, A., Beltrán, C., Felix, R., Nishigaki, T. and Treviño, C. L.** (2001). "Ion transport in sperm signaling." *Developmental Biology* **240**(1): 1-14.

**De Waard, M., Gurnett, C. A. and Campbell, K. P.** (1996). "Structural and functional diversity of voltage-activated calcium channels." *Ion channels* **4**: 41-87.

**Degn, P. and Zimmermann, W.** (2001). "Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by a lipase from *Candida antarctica*." *Biotechnology and Bioengineering* **74**(6): 483-491.

**DeWitt, D.** (2005). "The nature of capsaicin." <http://www.fierly-foods.com/dave/capsaicin.asp>.

**Di Marzo, V., Blumberg, P. M. and Szallasi, A.** (2002). "Endovanilloid signaling in pain." *Current Opinion in Neurobiology* **12**(4): 372-379.

**Docherty, R. J., Robertson, B. and Bevan, S.** (1991). "Capsaicin causes prolonged inhibition of voltage-activated calcium currents in adult rat dorsal root ganglion neurons in culture." *Neuroscience* **40**: 513-521.

**Doering, C. J. and Zamponi, G. W.** (2003). "Molecular Pharmacology of High Voltage-Activated Calcium Channels." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **35**(6): 491-505.

**Dogrul, A., Yesilyurt, O., Isimer, A. and Guzeldemir, M. E.** (2001). "L-type and T-type calcium channel blockade potentiate the analgesic effects of morphine and selective mu opioid agonist, but not to selective delta and kappa agonist at the level of the spinal cord in mice." *Pain* **93**(1): 61-68.

**Dogrul, A., Gardell, L. R., Ossipov, M. H., Lai, J., Porreca, F. and Tulunay, F. C.** (2003). "Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers." *Pain* **105**(1-2): 159-168.

**Drauz, K. and Waldmann, H.**, Eds. (2002). Enzyme catalysis in organic synthesis, Weinheim; VCH.

**Dray, A. and Urban, L.** (1996). "New pharmacological strategies for pain relief." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **36**: 253-280.

**EPA, U. S. E. P. A.** (1996). Product Properties Test Guidelines  
OPPTS 830.7570

Partition Coefficient (n-Octanol/Water)

Estimation By Liquid Chromatography. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7101).

**Ertel, S. I. and Ertel, E. A.** (1997a). "Low-voltage-activated T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels." Trends in Pharmacological Sciences **18**(2): 37-42.

**Ertel, S. I., Ertel, E. A. and Clozel, J.-P.** (1997b). "T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels and pharmacological blockade: Potential pathophysiological relevance." Cardiovascular Drugs and Therapy **11**(6): 723-739.

**Faber, K.** (2000). Biotransformations in organic chemistry. Berlin, Springer.

**Felix, R.** (2005). "Molecular physiology and pathology of  $\text{Ca}^{2+}$ -conducting channels in the plasma membrane of mammalian sperm." Reproduction **129**(3): 251-262.

**Ferrer, M., Cruces, M. A., Bernabe, M., Ballesteros, A. and Plou, F. J.** (1999). "Lipase-catalyzed regioselective acylation of sucrose in two-solvent mixtures." Biotechnology and Bioengineering **65**(1): 10-16.

**Fitzpatrick, P. A. and Klibanov, A. M.** (1991). "How can the solvent affect enzyme enantioselectivity?" Journal of the American Chemical Society **113**(8): 3166-3171.

**Flores, M. V., Naraghi, K., Engasser, J.-M. and Halling, P. J.** (2002). "Influence of glucose solubility and dissolution rate on the kinetics of lipase catalyzed synthesis of glucose laurate in 2-methyl 2-butanol." Biotechnology and Bioengineering **78**(7): 814-820.

**Fournand, D. and Arnaud, A.** (2001). "Aliphatic and enantioselective amidases: From hydrolysis to acyl transfer activity." Journal of Applied Microbiology **91**(3): 381-393.

**Francalanci, F., Cesti, P., Cabri, W., Bianchi, D., Martinengo, T. and Foa, M.** (1987). "Lipase-Catalyzed Resolution of Chiral 2-Amino 1-Alcohols." Journal of Organic Chemistry **52**(23): 5079-5085.

- Fredenslund, A., Jones, R. L. and Prausnitz, J. M.** (1975). "Group-contribution estimation of activity coefficients in nonideal liquid mixtures." *AIChE Journal* **21**(6): 1086-1099.
- Friedman, A. and Gutnick, M. J.** (1987). "Low-threshold calcium electrogenesis in neocortical neurons." *Neuroscience Letters* **81**(1-2): 117-122.
- Fujita, T.** (1964). "A New Substituent Constant,  $\rho$ , Derived from Partition Coefficients." *Journal of the American Chemical Society* **86**: 5175-5180.
- García, H. S., Malcata, F. X., Hill-C.G., J. and Amundson, C. H.** (1992). "Use of *Candida rugosa* lipase immobilized in a spiral wound membrane reactor for the hydrolysis of milkfat." *Enzyme and Microbial Technology* **14**(7): 535-545.
- García-Alles, L. F. and Gotor, V.** (1998). "Alcohol inhibition and specificity studies of CALB in organic solvents." *Biotechnology and Bioengineering* **59**(2): 163-170.
- García-Junceda, E., García-García, J. F., Bastida, A. and Fernandez-Mayoralas, A.** (2004). "Enzymes in the synthesis of bioactive compounds: the prodigious decades." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **12**(8): 1817-1834.
- Gavva, N. R., Klionsky, L., Qu, Y. S., Shi, L. C., Tamir, R., Edenson, S., Zhang, T. J., Viswanadhan, V. N., Toth, A., Pearce, L. V., Vanderah, T. W., Porreca, F., Blumberg, P. M., Lile, J., Sun, Y., Wildt, K., Louis, J. C. and Treanor, J. J. S.** (2004). "Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1." *Journal of Biological Chemistry* **279**(19): 20283-20295.
- Ghanem, A. and Aboul-Enein, H. Y.** (2005). "Application of lipases in kinetic resolution of racemates." *Chirality* **17**(1): 1-15.
- Gmehling, J., Lohmann, J., Jakob, A., Li, J. D. and Joh, R.** (1998). "A modified UNIFAC (Dortmund) model. 3. Revision and extension." *Industrial & Engineering Chemistry Research* **37**(12): 4876-4882.
- Gmehling, J., Wittig, R., Lohmann, J. and Joh, R.** (2002). "A modified UNIFAC (Dortmund) model. 4. Revision and extension." *Industrial & Engineering Chemistry Research* **41**(6): 1678-1688.
- Godtfredsen, S. E. and Bjoerkling, F.** (1990). An enzyme-catalyzed process for preparing N-acyl amino acids and N-acyl amino acid amides. World Patent.

**Gotor, V., Brieva, R. and Rebolledo, F.** (1988). "Enantioselective Acylation of Amino-Alcohols by Porcine Pancreatic Lipase." *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*(14): 957-958.

**Gotor, V.** (1999). "Non-conventional hydrolase chemistry: Amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **7**(10): 2189-2197.

**Govindarajan, V. S. and Sathyanarayana, M. N.** (1991). "Capsicum - Production, Technology, Chemistry, and Quality .5. Impact on Physiology, Pharmacology, Nutrition, and Metabolism - Structure, Pungency, Pain, and Desensitization Sequences." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **29**(6): 435-474.

**Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E. and Waelsch, H.** (1950). "The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine." *Journal of Biological Chemistry* **187**: 111-125.

**Gunthorpe, M. J., Benham, C. D., Randall, A. and Davis, J. B.** (2002). "The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels." *Trends in Pharmacological Sciences* **23**(4): 183-191.

**Gunthorpe, M. J., Rami, H. K., Jerman, J. C., Smart, D., Gill, C. H., Soffin, E. M., Hannan, S. L., Lappin, S. C., Egerton, J., Smith, G. D., Worby, A., Howett, L., Owen, D., Nasir, S., Davies, C. H., Thompson, M., Wyman, P. A., Randall, A. D. and Davis, J. B.** (2004). "Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist." *Neuropharmacology* **46**(1): 133-149.

**Hacking, M., Akkus, H., van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A.** (2000). "Lipase and esterase-catalyzed acylation of hetero-substituted nitrogen nucleophiles in water and organic solvents." *Biotechnology and Bioengineering* **68**(1): 84-91.

**Hagiwara, S. and Kawa, K.** (1984). "Calcium and Potassium Currents in Spermatogenic Cells Dissociated from Rat Seminiferous Tubules." *Journal of Physiology-London* **356**(NOV): 135-149.

**Halling, P. J.** (1994). "Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis." *Enzyme and Microbial Technology* **16**(3): 178-206.

**Hansch, C. and Leo, A. J.** (1979). *Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology*. Nueva York, Wiley and Sons.

**Heady, T. N., Gomora, J. C., Macdonald, T. L. and Perez-Reyes, E.** (2001). "Molecular pharmacology of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels." *Japanese Journal of Pharmacology* **85**(4): 339-350.

**Henkel, T., Brunne, R. M., Muller, H. and Reichel, F.** (1999). "Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds."

*Angewandte Chemie-International Edition* **38**(5): 643-647.

**Hess, P.** (1990). "Calcium channels in vertebrate cells." *Annual Review of Neuroscience* **13**: 337-356.

**Holmquist, M.** (2000). "Alpha/Beta-hydrolase Fold Enzymes: Structures, Functions and Mechanisms." *Current Protein and Peptide Science* **1**: 209-235.

**Hua, X. Y., Chen, P., Hwang, J. H. and Yaksh, T. L.** (1997). "Antinociception induced by civamide, an orally active capsaicin analogue." *Pain* **71**(3): 313-322.

**Iida, T., Moriyama, T., Murayama, N., Tominaga, M., Kobata, K., Morita, A., Watanabe, T., Hashizume, S., Fushiki, T. and Yazawa, S.** (2003). "TRPV1 activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate." *Neuropharmacology* **44**(7): 958-967.

**Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W. and Reetz, M. T.** (1999). "Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases." *Annual Review of Microbiology* **53**: 315-51.

**Jancsó, N., Jancsó-Gabor, A. and Szolcsányi, J.** (1967). "Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin." *British journal of pharmacology* **31**(1): 138-151.

**Janssen, L. J.** (1997). "T-type and L-type  $\text{Ca}^{2+}$  currents in canine bronchial smooth muscle: Characterization and physiological roles." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **272**(6 41-6).

**Janusz, J. M., Buckwalter, B. L., Young, P. A., Lahann, T. R., Farmer, R. W., Kasting, G. B., Loomans, M. E., Kerckaert, G. A., Maddin, C. S., Berman, E. F., Bohne, R. L., Cupps, T. L. and Milstein, J. R.** (1993). "Vanilloids .1. Analogs of Capsaicin with Antinociceptive and Antiinflammatory Activity." *Journal of Medicinal Chemistry* **36**(18): 2595-2604.

**Johnson, C. R., Plé, P. A. and Adams, J. P.** (1991). "Enantioselective synthesis of (+)- and (-)-conduiritol C from benzene via microbial oxidation and enzymic asymmetrization." *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*: 1006-1007.

**Jordt, S. E. and Julius, D.** (2002). "Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers." *Cell* **108**(3): 421-430.

**Julius, D. and Basbaum, A. I.** (2001). "Molecular mechanisms of nociception." *Nature* **413**(6852): 203-210.

**Kallenberg, A. I., Van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A.** (2005). "Immobilization of penicillin G acylase: The key to optimum performance." *Advanced Synthesis and Catalysis* **347**(7-8): 905-926.

**Kawamoto, T., So, R. S., Masuda, Y. and Tanaka, A.** (1999). "Efficient enzymatic synthesis of amide with (aminomethyl)trimethylsilane." *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87**(5): 607-610.

**Ke, T., Wescott, C. R. and Klibanov, A. M.** (1996). "Prediction of the solvent dependence of enzymatic prochiral selectivity by means of structure-based thermodynamic calculations." *Journal of the American Chemical Society* **118**(14): 3366-3374.

**Kim, G. J., Choi, G. S., Kim, J. Y., Lee, J. B., Jo, D. H. and Ryu, Y. W.** (2002). "Screening, production and properties of a stereospecific esterase from *Pseudomonas sp* S34 with high selectivity to (S)-ketoprofen ethyl ester." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **17**(1): 29-38.

**Kim, J. E., Han, J. J., Yoon, J. H. and Rhee, J. S.** (1998). "Effect of salt hydrate pair on lipase-catalyzed regioselective monoacylation of sucrose." *Biotechnology and Bioengineering* **57**(1): 121-125.

**Kleiber, M. and Axmann, J. K.** (1998). "Evolutionary algorithms for the optimization of Modified UNIFAC parameters." *Computers and Chemical Engineering* **23**(1): 63-82.

**Klibanov, A. M.** (1990). "Asymmetric Transformations Catalyzed by Enzymes in Organic-Solvents." *Accounts of Chemical Research* **23**(4): 114-120.

**Klibanov, A. M.** (1997). "Why are enzymes less active in organic solvents than in water?" *Trends in Biotechnology* **15**(3): 97-101.

**Klibanov, A. M.** (2001). "Improving enzymes by using them in organic solvents." *Nature* **409**(6817): 241-246.

**Klibanov, A. M.** (2003). "Asymmetric enzymatic oxidoreductions in organic solvents." *Current Opinion in Biotechnology* **14**(4): 427-431.

**Kobata, K., Kawamura, M., Toyoshima, M., Tamura, Y., Ogawa, S. and Watanabe, T.** (1998a). "Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs by amidation of vanillylamine with fatty acid derivatives." *Biotechnology Letters* **20**(5): 451-453.

**Kobata, K., Toyoshima, M., Kawamura, M. and Watanabe, T.** (1998b). "Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs using natural oils as an acyl donor." *Biotechnology Letters* **20**(8): 781-783.

**Kobata, K., Kobayashi, M., Tamura, Y., Miyoshi, S., Ogawa, S. and 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**(6): 547-550.

**Kobata, K., Kawaguchi, M. and Watanabe, T.** (2002). "Enzymatic synthesis of a capsinoid by the acylation of vanillyl alcohol with fatty acid derivatives catalyzed by lipases." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **66**(2): 319-327.

**Kobayashi, M., Goda, M. and Shimizu, M.** (1999). "Hydrazide synthesis: Novel substrate specificity of amidase." *Biochemical and biophysical research communications* **256**: 415-418.

**Koehn, F. E. and Carter, G. T.** (2005). "The evolving role of natural products in drug discovery." *Nature Reviews Drug Discovery* **4**(3): 206-220.

**Koeller, K. M. and Wong, C. H.** (2001). "Enzymes for chemical synthesis." *Nature* **409**(6817): 232-240.

**Kopanitsa, M. V., Panchenko, V. A., Magura, E. I., Lishko, P. V. and Krishtal, O. A.** (1995). "Capsaicin blocks Ca<sup>2+</sup> channels in isolated rat trigeminal and hippocampal neurones." *NeuroReport* **6**(17): 2338-2340.

**Kostyuk, P. G.** (1999). "Low-voltage activated calcium channels: Achievements and problems." *Neuroscience* **92**(4): 1157-1163.

**Krishna, S. H. and Karanth, N. G.** (2002). "Lipases and Lipase-catalyzed esterification reactions in non aqueous media." *Catalysis Reviews* **44**: 499-591.

**Kroutil, W., Hagmann, L., Schuez, T. C., Jungmann, V. and Pachlatko, J. P.** (2005). "Esterification of streptol - a cyclitol derivative - by *Candida rugosa* lipase: influence of the acyl donor on regioselectivity." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **32**(5-6): 247-252.

- Kurian, A. L. and Starks, A. N.** (2002). "HPLC analysis of capsaicinoids extracted from whole orange habanero chili peppers." *Journal of Food Science* **67**(3): 956-962.
- Lang, D. A. and Dijkstra, B. W.** (1998a). "Structural investigations of the regio- and enantioselectivity of lipases." *Chem. Phys. Lipids* **93**: 115-122.
- Lang, D. A., Mannesse, M. L. M., De Haas, G. H., Verheij, H. M. and Dijkstra, B. W.** (1998b). "Structural basis of the chiral selectivity of *Pseudomonas Cepacia* lipase." *European Journal of Biochemistry* **254**: 333-340.
- Lee, J., Kang, M., Shin, M., Kim, J. M., Kang, S. U., Lim, J. O., Choi, H. K., Suh, Y. G., Park, H. G., Oh, U., Kim, H. D., Park, Y. H., Ha, H. J., Kim, Y. H., Toth, A., Wang, Y., Tran, R., Pearce, L. V., Lundberg, D. J. and Blumberg, P. M.** (2003). "N-(3-acyloxy-2-benzylpropyl)-N'-4-(methylsulfonylamino)benzyl thiourea analogues: Novel potent and high affinity antagonists and partial antagonists of the vanilloid receptor." *Journal of Medicinal Chemistry* **46**(14): 3116-3126.
- Lembeck, F.** (1987). "Columbus, Capsicum and capsaicin: past, present and future." *Acta physiologica Hungarica* **69**(3-4): 265-273.
- Leo, A.** (1971). *Chemical Reviews* **71**: 525.
- Lievano, A., Santi, C. M., Serrano, C. J., Trevino, C. L., Bellve, A. R., HernandezCruz, A. and Darszon, A.** (1996). "T-type Ca<sup>2+</sup> channels and alpha(1E) expression in spermatogenic cells, and their possible relevance to the sperm acrosome reaction." *Febs Letters* **388**(2-3): 150-154.
- Litjens, M., Straathof, A., Jongejan, J. and Heijnen, J.** (1999). "Exploration of lipase-catalyzed direct amidation of free carboxylic acids with ammonia in organic solvents." *Tetrahedron* **55**: 12411-12418.
- Llinás, R. and Jahnsen, H.** (1982). "Electrophysiology of mammalian thalamic neurones in vitro." *Nature* **297**(5865): 406-408.
- Lo, Y. C., Wu, S. N., Wu, J. R. and Chen, I. J.** (1995). "Effect of Capsaicin on Membrane Currents in Cultured Vascular Smooth-Muscle Cells of Rat Aorta." *European Journal of Pharmacology-Environmental Toxicology and Pharmacology Section* **292**(3-4): 321-328.
- Lohmann, J., Joh, R. and Gmehling, J.** (2001). "From UNIFAC to modified UNIFAC (Dortmund)." *Industrial & Engineering Chemistry Research* **40**(3): 957-964.

- López-González, I., Olamendi-Portugal, T., De la Vega-Beltrán, J. L., Van der Walt, J., Dyason, K., Possani, L. D., Félix, R. and Darszon, A.** (2003). "Scorpion toxins that block T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels in spermatogenic cells inhibit the sperm acrosome reaction." *Biochemical and biophysical research communications* **300**(2): 408-414.
- Low, P. A., Opfergehrking, T. L., Dyck, P. J., Litchy, W. J. and Obrien, P. C.** (1995). "Double-Blind, Placebo-Controlled Study of the Application of Capsaicin Cream in Chronic Distal Painful Polyneuropathy." *Pain* **62**(2): 163-168.
- Lutz, S.** (2004). "Engineering lipase B from *Candida antarctica*." *Tetrahedron: Asymmetry* **15**: 2743-2748.
- MacManus, D. A. and Vulfson, E. N.** (1997). "Reversal of regioselectivity in the enzymatic acylation of secondary hydroxyl groups mediated by organic solvents." *Enzyme and Microbial Technology* **20**(3): 225-228.
- Magnussen, T., Fredenslund, A. and Rasmussen, P.** (1981). "UNIFAC parameter table for prediction of liquid equilibria." *Industrial & Engineering Chemistry, Process Design and Development* **20**(2): 331-339.
- Margen, S. and Berkeley, E. d. U. o. C. a.** (1992). "The wellness encyclopedia of food and nutrition: How to buy, store, and prepare every variety of fresh food."
- Matthews, E. A. and Dickenson, A. H.** (2001). "Effects of ethosuximide, a T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel blocker, on dorsal horn neuronal responses in rats." *European Journal of Pharmacology* **415**(2-3): 141-149.
- Mattson, A., Orrenius, C., Ohrner, N., Unelius, C. R., Hult, K. and Norin, T.** (1996). "Kinetic resolution of chiral auxiliaries with C-2-symmetry by lipase-catalyzed alcoholysis and aminolysis." *Acta Chemica Scandinavica* **50**(10): 918-921.
- Maugard, T., Remaud-Simeon, M., Monsan, P. and Petre, D.** (1997). "Enzymatic synthesis of glycamide surfactants by amidification reaction." *Tetrahedron* **53**(14): 5185-5194.
- McMurry, J.** (1994). *Química orgánica*. México, Grupo Editorial Iberoamerica.
- Millan, M. J.** (1999). "The induction of pain: An integrative review." *Progress in Neurobiology* **57**(1): 1-164.
- Min Sin, Y., Woong Choo, K. and Ho Lee, T.** (1998). "Synthesis of fructose esters by *Pseudomonas* sp. lipase in anhydrous pyridine." *Biotechnology letters* **20**: 91-94.

**Monteil, A., Chemin, J., Leuranguer, V., Altier, C., Bourinet, E., Lory, P., Nargeot, J. and Mennessier, G.** (2000). "Specific properties of T-type calcium channels generated by the human  $\alpha_1G$  subunit." *Journal of Biological Chemistry* **275**(22): 16530-16535.

**Morrison, R. T. and Boyd, R. N.** (1998a). *Química Orgánica*, Addison -Wesley.

**Morrison, R. T. and Boyd, R. N.** (1998b). *Química Orgánica*, Addison-Wesley.

**Nanda, S. and Scott, A. I.** (2004). "A highly efficient chemoselective synthesis of 3,5-diketoesters by lipase-catalyzed transesterification: Application to the resolution of secondary alcohols." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **30**(1): 1-12.

**(NC-IUBMB), N. C. o. t. I. U. o. B. a. M. B.** (1999). *Enzyme Nomenclature Database*. London, UK, Moss G.P.

**Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Chen, X.-H., Hopkins, W., Cong, R., Miller, J., Urge, L., Tarczy-Hornoch, K., Nadasdi, L., Miljanich, G., Wang, G., Lemos, J., Loo, J. A., Dooley, D. J. and Tsien, R. W.** (1998). "Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*." *Biochemistry* **37**(44): 15353-15362.

**Nicotra, F., Riva, S., Secundo, F. and Zucchelli, L.** (1989). "An Interesting Example of Complementary Regioselective Acylation of Secondary Hydroxyl-Groups by Different Lipases." *Tetrahedron Letters* **30**(13): 1703-1704.

**Nishizawa, K., Ohgami, Y., Matsuo, N., Kisida, H. and Hirohara, H.** (1997). "Studies on hydrolysis of chiral, achiral and racemic alcohol esters with *Pseudomonas cepacia* lipase: mechanism of stereospecificity of the enzyme." *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*: 1293-1298.

**Nolano, M., Simone, D. A., Wendelschafer-Crabb, G., Johnson, T., Hazen, E. and Kennedy, W. R.** (1999). "Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation." *Pain* **81**(1-2): 135-145.

**Nowycky, M. C., Fox, A. P. and Tsien, R. W.** (1985). "Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity." *Nature* **316**(6027): 440-443.

**Ohrner, N., Orrenius, C., Mattson, A., Norin, T. and Hult, K.** (1996). "Kinetic resolution of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by the *Candida antarctica* lipase B." *Enzyme Microbial Technology* **19**: 328-331.

**Opsahl, R.** (1992). *Fatty acid amides*. Kirk-Othmer

Encyclopedia of Chemical Technology; Koschwitz, J. I. and Howegrant, M. New York, Wiley and Sons. **2**: 346-356.

**Ortholand, J. Y. and Ganesan, A.** (2004). "Natural products and combinatorial chemistry: back to the future." *Current Opinion in Chemical Biology* **8**(3): 271-280.

**Panda, T. and Gowrishankar, B. S.** (2005). "Production and applications of esterases." *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**: 160-169.

**Patel, M. T., Nagarajan, R. and Kilara, A.** (1996). "Lipase-catalysed biochemical reactions in novel media: A review." *Chem. Eng. Comm.* **153**: 365-404.

**Patel, R. N.,** Ed. (2000). Stereoselective biocatalysis. New York, Marcel Dekker.

**Pathirathna, S., Brimelow, B. C., Jagodic, M. M., Todorovic, S. M., Jevtovic-Todorovic, V., Krishnan, K., Jiang, X., Covey, D. F., Zorumski, C. F. and Mennerick, S.** (2005). "New evidence that both T-type calcium channels and GABA<sub>A</sub> channels are responsible for the potent peripheral analgesic effects of 5 $\alpha$ -reduced neuroactive steroids." *Pain* **114**(3): 429-443.

**Pedersen, N. R., Wimmer, R., Emmersen, J., Degn, P. and Pedersen, L. H.** (2002). "Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-catalyzed esterification of disaccharides." *Carbohydrate Research* **337**: 1179-1184.

**Perez-Reyes, E., Cribbs, L. L., Daud, A., Lacerda, A. E., Barclays, J., Williamson, M. P., Fox, M., Rees, M. and Lee, J.-H.** (1998). "Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel." *Nature* **391**(6670): 896-900.

**Perez-Reyes, E.** (2003). "Molecular physiology of low-voltage-activated T-type calcium channels." *Physiological Reviews* **83**(1): 117-161.

**Piera, E., Infante, M. R. and Clapes, P.** (2000). "Chemo-enzymatic synthesis of arginine-based gemini surfactants." *Biotechnology and Bioengineering* **70**(3): 323-331.

**Pleiss, J., Fischer, M. and Schmid, R. D.** (1998). "Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site." *Chemistry and Physics of Lipids* **93**(1-2): 67-80.

**Presenz, P.** (1996). "Lipoamino acids and lipopeptides as amphiphilic compounds." *Pharmazie* **51**(10): 755-758.

- Rahman, R. N. Z. R. A., Geok, L. P., Salleh, A. B. and Basri, M.** (2005). "An organic solvent-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Nutritional factors affecting protease production." *Enzyme and Microbial Technology* **36**(5-6): 749-757.
- Raman, I. M., Bean, B. P. and Raman, I. M.** (1999). "Ionic currents underlying spontaneous action potentials in isolated cerebellar purkinje neurons." *Journal of Neuroscience* **19**(5): 1663-1674.
- Rantwijk, F. v., Hacking, M. A. P. J. and Sheldon, R. A.** (2000). "Lipase-catalyzed synthesis of carboxylic amides: nitrogen nucleophiles as acyl acceptor." *Monatshefte für Chemie Chemical Monthly* **131**: 549-569.
- Rapoport, A. M., Bigal, M. E., Tepper, S. J. and Sheftell, F. D.** (2004). "Intranasal medications for the treatment of migraine and cluster headache." *Cns Drugs* **18**(10): 671-685.
- Raza, S., Fransson, L. and Hult, K.** (2001). "Enantioselectivity in *Candida antarctica* lipase B: A molecular dynamics study." *Protein Science* **10**: 329-338.
- Reetz, M. T. and Dreisbach, C.** (1994). "Highly Efficient Lipase-Catalyzed Kinetic Resolution of Chiral Amines." *Chimia* **48**(12): 570-570.
- Rekker, R. F. and de Kort, H. M.** (1979). "The hydrophobic fragmental constant; An extension to a 1000 data point set." *Euro. J. Med. Chem.* **14**: 479-488.
- Restituto, S., Cens, T., Barrere, C., Geib, S., Galas, S., De Waard, M. and Charnet, P.** (2000). "The beta(2a) subunit is a molecular groom for the Ca<sup>2+</sup> channel inactivation gate." *Journal of Neuroscience* **20**(24): 9046-9052.
- Reyes-Duarte, D.** (2002). *Caracterización y aplicación de lipasas en la síntesis e hidrólisis de amidas.* Cuernavaca, Mor., UNAM.
- Reyes-Duarte, D., Castillo, E., Martinez, R. and Lopez-Munguia, A.** (2002). "Lipase-catalysed synthesis of olvanil in organic solvents." *Biotechnology Letters* **24**(24): 2057-2061.
- Rich, J. O., Bedell, B. A. and Dordick, J. S.** (1995). "Controlling Enzyme-Catalyzed Regioselectivity in Sugar Ester Synthesis." *Biotechnology and Bioengineering* **45**(5): 426-434.

- Roberts, S. M.** (1998). "Preparative biotransformations: the employment of enzymes and whole-cells in synthetic organic chemistry." *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1*(1): 157-169.
- Rotticci, D., Orrenius, C., Hult, K. and Norin, T.** (1997). "Enantiomerically enriched bifunctional sec-alcohols prepared by *Candida antarctica* lipase B catalysis. Evidence of non-steric interactions." *Tetrahedron: Asymmetry* **8**: 359-362.
- Rubio, E., Fernandez-Mayorales, A. and Klibanov, A. M.** (1991). "Effect of the solvent on enzyme regioselectivity." *Journal of the American Chemical Society* **113**(2): 695-696.
- Salazar, L., Bermudez, J. L., Ramirez, C., Llama, E. F. and Sinisterra, J. V.** (1999). "Resolution of 3- $\alpha$  naphthoxy-1,2-propanediol using *Candida antarctica* lipase." *Tetrahedron: Asymmetry* **10**: 3507-3514.
- Santaniello, E., Ferraboschi, P., Grisenti, P. and Manzocchi, A.** (1992). "The Biocatalytic Approach to the Preparation of Enantiomerically Pure Chiral Building-Blocks." *Chemical Reviews* **92**(5): 1071-1140.
- Santaniello, E., Ferraboschi, P. and Grisenti, P.** (1993). "Lipase-Catalyzed Transesterification in Organic-Solvents - Applications to the Preparation of Enantiomerically Pure Compounds." *Enzyme and Microbial Technology* **15**(5): 367-382.
- Santi, C. M., Darszon, A. and HernandezCruz, A.** (1996). "Dihydropyridine-sensitive T-type  $Ca^{2+}$  current is the main  $Ca^{2+}$  current carrier in mouse primary spermatocytes." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **40**(5): C1583-C1593.
- Schmid, R. D. and Verger, R.** (1998). "Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications." *Angewandte Chemie-International Edition* **37**(12): 1609-1633.
- Schnitzer, T. J.** (1993). "Osteoarthritis treatment update: Minimizing pain while limiting patient risk." *Postgraduate Medicine* **93**(1): 89-92+95.
- Scilimati, A., Ngooi, T. K. and Sih, C. J.** (1988). "Biocatalytic resolution of ( $\pm$ )-hydroxyalkanoic esters. A strategy for enhancing the enantiomeric specificity of lipase-catalyzed ester hydrolysis." *Tetrahedron Letters* **29**: 4927-4930.
- Segel, I. H.** (1975). *Enzyme kinetics. Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*, John Wiley and Sons, Inc.
- Sellek, G. A. and Chaudhuri, J. B.** (1999). "Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles." *Enzyme and Microbial Technology* **25**(6): 471-482.

**Sheldon, R. A.** (2000). "Atom utilisation, E factors and the catalytic solution." *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Ii Fascicule C-Chimie* **3**(7): 541-551.

**Sheldon, R. A. and van Rantwijk, F.** (2004). "Biocatalysis for sustainable organic synthesis." *Australian Journal of Chemistry* **57**(4): 281-289.

**Shen, D., Xu, J. H., Wu, H. Y. and Liu, Y. Y.** (2002). "Significantly improved esterase activity of *Trichosporon brassicae* cells for ketoprofen resolution by 2-propanol treatment." *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **18**(4-6): 219-224.

**Shimizu, M., Kawanami, H. and Fujisawa, T.** (1992). "A lipase-mediated asymmetric hydrolysis of 3-acyloxy-1-octynes and 3-(E)-acyloxy-1-octenes." *Chem. Lett.*: 107-110.

**Silva, M. M. C., Riva, S. and Melo, M.** (2005). "Regioselective enzymatic acylation of vicinal diols of steroids." *Tetrahedron* **61**(12): 3065-3073.

**Sivasamy, A., Krishnaveni, M. and Rao, P. G.** (2001). "Preparation, characterization, and surface and biological properties of N-stearoyl amino acids." *Journal of the American Oil Chemists Society* **78**(9): 897-902.

**Stamboulian, S., Kim, D., Shin, H. S., Ronat, M., De Waard, M. and Arnoult, C.** (2004). "Biophysical and pharmacological characterization of spermatogenic T-type calcium current in mice lacking the Ca(v)3.1 (alpha(1G)) calcium channel: Ca(v)3.2 (alpha(1H)) is the main functional calcium channel in wild-type spermatogenic cells." *Journal of Cellular Physiology* **200**(1): 116-124.

**Steriade, M. and Deschenes, M.** (1984). "The thalamus as a neuronal oscillator." *Brain Research Reviews* **8**(1): 1-63.

**Stotz, S. C. and Zamponi, G. W.** (2001). "Structural determinants of fast inactivation of high voltage-activated Ca<sup>2+</sup> channels." *Trends in Neurosciences* **24**(3): 176-182.

**Strauss, U. T. and Faber, K.** (1999a). "Deracemization of (+/-)-mandelic acid using a lipase-mandelate racemase two-enzyme system." *Tetrahedron-Asymmetry* **10**(21): 4079-4081.

**Sutoh, K., Kobata, K. and Watanabe, T.** (2001). "Stability of capsinoid in various solvents." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**(8): 4026-4030.

**Szallasi, A. and Blumberg, P. M.** (1993). "Mechanisms and therapeutic potential of vanilloids (capsaicin-like molecules)." *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)* **24**: 123-155.

**Szallasi, A. and Blumberg, P. M.** (1996). "Vanilloid receptors: New insights enhance potential as a therapeutic target." *Pain* **68**(2-3): 195-208.

**Szallasi, A. and Blumberg, P. M.** (1999). "Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms." *Pharmacological Reviews* **51**(2): 159-211.

**Szallasi, A. and Di Marzo, V.** (2000). "New perspectives on enigmatic vanilloid receptors." *Trends in Neurosciences* **23**(10): 491-497.

**Szallasi, A. and Appendino, G.** (2004). "Vanilloid receptor TRPV1 antagonists as the next generation of painkillers. Are we putting the cart before the horse?" *Journal of Medicinal Chemistry* **47**(11): 2717-2723.

**Tabares, L. and Lopez-Barneo, J.** (1996). *Biofísica y biología celular*. Sevilla.

**Thiéry, A., Maestracci, M., Arnaud, A. and Galzy, P.** (1986). "Acyltransferase activity of the wide spectrum amidase of *Brevibacterium sp R312*." *Journal of General Microbiology* **132**: 2205-2208.

**Todorovic, S. M., Jevtovic-Todorovic, V., Meyenburg, A., Mennerick, S., Perez-Reyes, E., Romano, C., Olney, J. W. and Zorumski, C. F.** (2001). "Redox modulation of T-Type calcium channels in rat peripheral nociceptors." *Neuron* **31**(1): 75-85.

**Todorovic, S. M., Jevtovic-Todorovic, V. and Meyenburg, A.** (2004). "Redox modulation of peripheral T-type Ca<sup>2+</sup> channels in vivo: Alteration of nerve injury-induced thermal hyperalgesia." *Pain* **109**(3): 328-339.

**Torres, A.** (2004). *Síntesis e hidrólisis de amidas por medio de lipasas*, UNAM.

**Toth, A., Blumberg, P. M., Chen, Z. L. and Kozikowski, A. P.** (2004). "Design of a high-affinity competitive antagonist of the vanilloid receptor selective for the calcium entry-linked receptor population." *Molecular Pharmacology* **65**(2): 282-291.

**Treviño, C. L., Castellano, L. E., Gutiérrez, C., Rodríguez, D., López-González, I., Darszon, A., Felix, R., Pacheco, J., Tsutsumi, V., Gomora, J. C., Hernández-Cruz, A., Fiordelisis, T. and Scaling, A. L.** (2004). "Expression and differential cell distribution of low-threshold Ca<sup>2+</sup> channels in mammalian male germ cells and sperm." *FEBS Letters* **563**(1-3): 87-92.

**Trius, A. and Brackmann, B.** (2000). *Surfing through the year 2000*. Proceedings of the 5th World Surfactants Congress CESIO, Federchimica Assobase-P-I-T.I.O., Milano, Italy.

**Uppenberg, J., Ohrner, N., Norin, M., Hult, K., Kleywegt, G. J., Patkar, S., Waagen, V., Anthonsen, T. and Jones, T. A.** (1995). "Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols." *Biochemistry* **34**(51): 16838-16851.

**Urban, L., Campbell, E. A., Panesar, M., Patel, S., Chaudhry, N., Kane, S., Buchheit, K. H., Sandells, B. and James, I. F.** (2000). "In vivo pharmacology of SDZ 249-665, a novel, non-pungent capsaicin analogue." *Pain* **89**(1): 65-74.

**Van Rantwijk, F. and Sheldon, R. A.** (2004). "Enantioselective acylation of chiral amines catalysed by serine hydrolases." *Tetrahedron* **60**(3): 501-519.

**Vaysse, L., Ly, A., Moulin, G. and Dubreucq, E.** (2002). "Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium." *Enzyme and Microbial Technology* **31**: 648-655.

**Vergier, R.** (1997). "'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts." *Trends in Biotechnology* **15**: 32-38.

**Vonderhagen, A., Raths, H.-C. and Eilers, E.** (1999). Enzymatic catalyzed N-acylation of amino acids, protein hydrolysates and/or their derivatives. Alemania, Henkel K.-G.a.A.

**Voutsas, E. C. and Tassios, D. P.** (1997). "Prediction of infinite-dilution activity coefficients in binary mixtures with UNIFAC. A critical evaluation (vol 35, pg 1439, 1996)." *Industrial & Engineering Chemistry Research* **36**(3): 936-936.

**Vuorela, P., Leinonen, M., Saikku, P., Tammela, P., Rauha, J. P., Wennberg, T. and Vuorela, H.** (2004). "Natural products in the process of finding new drug candidates." *Current Medicinal Chemistry* **11**(11): 1375-1389.

**Wahí, P., Foged, C., Tullin, S. and Thomsen, C.** (2001). "Iodo-resiniferatoxin, a new potent vanilloid receptor antagonist." *Molecular Pharmacology* **59**(1): 9-15.

**Walpole, C. S. J., Wrigglesworth, R., Bevan, S., Campbell, E. A., Dray, A., James, I. F., Masdin, K. J., Perkins, M. N. and Winter, J.** (1993a). "Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure-activity studies. 2. The amide bond 'B-region'." *Journal of Medicinal Chemistry* **36**(16): 2373-2380.

**Walpole, C. S. J., Wrigglesworth, R., Bevan, S., Campbell, E. A., Dray, A., James, I. F., Perkins, M., Masdin, K. J. and Winter, J.** (1993b). "Analogues of capsaicin with analgesic activity as novel analgesic agents; Structure-activity studies. 3. "The aromatic "C" region"." *Journal of Medicinal Chemistry* **36**: 2381-2389.

**Walpole, C. S. J., Wriglesworth, R., Bevan, S., Campbell, E. A., Dray, A., James, I. F., Perkins, M., Ried, D. and Winter, J.** (1993c). "Analogues of capsaicin with analgesic activity as novel analgesic agents; Structure-activity studies. 1. "The aromatic "A" region".  
*Journal of Medicinal Chemistry* **36**: 2362-2372.

**Wang, H. B. and Woolf, C. J.** (2005). "Pain TRPs." *Neuron* **46**(1): 9-12.

**Weidlich, U. and Gmehling, J.** (1987). "Modified UNIFAC Model. 1. Prediction of VLE,  $h^E$ , and  $\gamma^R$ ." *Industrial and Engineering Chemistry Research* **26**(7): 1372-1381.

**Wescott, C. R. and Klibanov, A. M.** (1994). "The solvent dependence of enzyme specificity." *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1206**(1): 1-9.

**Wescott, C. R. and Klibanov, A. M.** (1997). "Thermodynamic analysis of solvent effect on substrate specificity of lyophilized enzymes suspended in organic media." *Biotechnology and Bioengineering* **56**(3): 340-344.

**West, J. B., Hennen, W. J., Lalonde, J. L., Bibbs, J. A., Zhong, Z., Meyer, E. F. J. and Wong, C. H.** (1990). "Enzymes as synthetic Catalysts: mechanistic and active site considerations of natural and modified cytomotrypsin." *Journal of the American Chemical Society* **112**: 5313 - 5320.

**Wittig, R., Lohmann, J. and Gmehling, J.** (2003). "Vapor-liquid equilibria by UNIFAC group contribution. 6. Revision and extension." *Industrial & Engineering Chemistry Research* **42**(1): 183-188.

**Xiong, Z., Sperelakis, N., Noffsinger, A. and Fenoglio-Preiser, C.** (1993). "Changes in calcium channel current densities in rat colonic smooth muscle cells during development and aging." *The American journal of physiology* **265**(3 Pt 1).

**Young, R. C., Smith, L. H. and McLaren, M. D.** (1993). "T-type and L-type calcium currents in freshly dispersed human uterine smooth muscle cells." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **169**(4): 785-792.

**Yunker, A. M. R. and McEnery, M. W.** (2003). "Low-Voltage-Activated ("T-Type") Calcium Channels in Review." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **35**(6): 533-575.

**Zacks, A. and Klibanov, A. M.** (1985). "Enzyme-Catalyzed Processes In Organic Solvents." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**: 3192-3196.

**Zhang, S., Hiaki, T. and Kojima, K.** (2002). "Prediction of infinite dilution activity coefficients for systems including water based on the group contribution model with mixture-type groups: II. Extension and application." *Fluid Phase Equilibria* **198**(1): 15-27.