



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**USO DE LIPASAS PARA LA RESOLUCIÓN  
QUIMIOSELECTIVA DE MOLÉCULAS BIFUNCIONALES:  
INGENIERÍA DEL MEDIO DE REACCIÓN**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**I.Q. JOSÉ LUIS CAMPOS NAVARRO**

**ASESOR: EDMUNDO CASTILLO ROSALES**



Cuernavaca, Morelos.

2011



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.



Con mucho cariño, respeto y orgullo a mis papás  
Esperanza Navarro Mora y Rogelio Campos Cacho,  
así como a todos mis hermanos y hermanas.

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

Durante los estudios de maestría se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con número de registro 234779.

**Agradezco:**

Al Dr. Agustín López-Munguía por recibirme en su grupo de trabajo, por ser un ejemplo de de líder y una figura a seguir a la que siempre admiraré. Así mismo, gracias por su confianza, por sus consejos y por apoyarme en lo académico, en mi trabajo y en todo lo demás.

Al Dr. Edmundo Castillo Rosales por dirigir este trabajo y por su colaboración en mi formación científica.

Al comité tutorial y sinodal por sus opiniones, consejos y sugerencias a esta tesis:

Dra. Marcela Ayala Aceves

Dr. Jaime Escalante García

Dr. Enrique Rudiño Piñera

Dr. Alfredo Martínez Jiménez

Dra. Dolores Reyes Duarte

Dr. Alejandro Torres Gavilán

Dr. Sergio Andrés Águila Puente

Al T.L. Fernando González Muñoz por todo el apoyo técnico brindado durante la realización de este proyecto y aún más por su gran amistad y confianza en todo momento.

A la T.L. María Elena Rodríguez Alegría por su orientación, por su apoyo experimental, por sus consejos y por hacer del laboratorio un lugar más alegre.

Al Dr. Alejandro Torres Gavilán por su insustituible y atento apoyo a lo largo de esta maestría, tanto en lo experimental como en lo personal, sin el cual este proyecto no sería lo que es.

A la Dra. Clarita Olvera Carranza por sus amables comentarios.

Al Dr. Sergio Andrés Águila Puente por su amistad y por sus buenas sugerencias.

Al Dr. Enrique Rudiño Piñera por sus excelentes clases y todo su apoyo en docencia.

A todos los compañeros y compañeras de trabajo en el laboratorio del IBT:

En especial y con mucho cariño a mi vecina de mesa, Arlette, por su ayuda y amistad, sin ella mi estancia no habría sido la misma.

A Ángela y Anabel, que aunque la convivencia fue poca me dieron muy buenos consejos. A los cartuchos, Anuar, Jaime y César aunque se nos fue, a Alfonso, por su compañerismo y agradable compañía. A Paulina por ayudarme a ser más paciente. A Angelita (china) por simpática y por hacer más alegre el laboratorio. A Doña Aure y Judith por su ayuda y por hacer más joviales los días.

A Libertad, por todos los momentos buenos y malos, por apoyarme incondicionalmente en todo momento y ayudarme a superar una meta y un reto más en mi vida.

A Melisa, Arlene, Marel y Pol, por brindarme su amistad y comprensión en esta etapa.

A mis amigos y amigas:

Saraí, Carmen, Brenda, Vita, Héctor, Miguel Banderas, Compadre Arturo, Soria, Toño, mis amigos, mis hermanos, de antaño, de hoy y de siempre por su apoyo e incondicional amistad.

Salvador, Priscilla, Daria, Sánchez, Beatriz, Gaby, Roxana, Elisa, Janice, Elia, Beto, Rosy, Ruby, Mercedes, Sandrina, por hacer de Guadalajara mi segundo hogar, por apoyarme moralmente en mi partida a la maestría y por ser mis más queridos compañeros.

A mis profesores:

Ing. Farfán, José Luis Nuño, Pepe Sahagún, Miguel Beltrán, Chelito, Ing. Nacho, Villalobos, por su guía, sabiduría y por su amistad, porque sin ustedes no sería lo que soy académica y profesionalmente.

A mi familia:

No hay palabras suficientes para agradecer a mis padres Esperanza y Rogelio, a mis hermanas Enedina, Tita, Angélica, Ana y Mary; a mis hermanos Juan, David y Rogelio, y a todos mis queridos y adorados sobrinos. Gracias por ser mi ejemplo, mi apoyo y principal sustento, por su cariño y amor, por ayudar a forjar al hombre que soy ahora y por siempre estar a mi lado.

Y sobre todo.... A Dios, por brindarme su amor, por darme todo lo que me ha dado hasta hoy, por dejarme vivir esta aventura y por estar siempre a mi lado.

## ÍNDICE

Resumen .....	1
1. Introducción .....	2
2. Antecedentes.....	4
2.1 Quimioselectividad .....	4
2.2 Biocatálisis .....	5
2.2.1 Enzimas .....	5
2.2.2 Enzimas en procesos quimioselectivos .....	6
2.3 Lipasas .....	8
2.3.1 Importancia comercial de las lipasas.....	9
2.3.2 Características estructurales de las lipasas .....	11
2.3.3 Características catalíticas de las lipasas .....	13
2.3.4 Lipasa B de Candida antarctica.....	15
2.3.5 Resolución enzimática quimioselectiva con lipasas .....	17
2.4 Estrategias generales para establecer quimioselectividad en biocatálisis .....	19
2.4.1 Control cinético .....	19
2.4.2 Control termodinámico .....	20
2.4.3 Ingeniería del Medio de Reacción .....	21
2.4.4 Modelo de predicción COSMO-RS.....	26
3. Hipótesis y objetivos.....	29
3.1 Hipótesis .....	29
3.2 Objetivos.....	29
3.2.1 General .....	29
3.2.2 Objetivos particulares.....	29
4. Estrategia experimental .....	30
5. Materiales y métodos.....	31
5.1 Materiales.....	31
5.2 Reacciones enzimáticas .....	31
5.3 Identificación, purificación y caracterización .....	31



5.4	Cuantificación .....	32
5.5	Cálculos de coeficientes de actividad COSMO-RS .....	33
5.6	Síntesis química del O-oleoilaminohexanol .....	33
5.6.1	Protección del 6-amino-1-hexanol (6A1H).....	33
5.6.2	Esterificación y desprotección química del Cbz-6-amino-1-hexanol .....	34
6.	Resultados y discusión.....	35
6.3.1	Recuperación y purificación de los compuestos .....	44
6.3.2	Resonancia magnética nuclear (RMN) .....	45
6.3.3	Espectroscopía Infrarroja (IR).....	47
6.3.4	Espectrometría de Masas .....	47
6.3.5	Síntesis química producto éster ( <b>P1</b> ).....	48
6.4.1	Análisis cualitativo de los medios de reacción .....	50
6.4.2	Análisis cuantitativo de los medios de reacción.....	51
6.5.1	Acumulación de N-oleoilaminohexanol .....	56
6.5.2	Hidrólisis del N,O-dioleoilaminohexanol: diacilado P3 .....	56
6.5.3	Acilación enzimática del N-oleoilaminohexanol y O-oleoilaminohexanol.....	59
6.5.4	Reacción general en presencia inicial de N-oleoilaminohexanol.....	61
7.	Conclusiones.....	64
8.	Bibliografía.....	66
9.	ANEXOS.....	I

## Resumen

La ingeniería del Medio de Reacción (IMR) fue utilizada para la acilación enzimática quimioselectiva de moléculas bifuncionales del tipo amino-alcohol. Se utilizó como modelo de estudio la acilación enzimática del 6-amino-1-hexanol con ácido oleico como donador de acilo en medios orgánicos y usando a la lipasa B de *Candida antarctica* como catalizador. Primeramente el sistema se evaluó de manera teórica realizando el cálculo de los coeficientes de actividad termodinámica de los posibles productos de reacción con el fin de elucidar los disolventes más propicios para la acumulación selectiva del producto deseado. Estos cálculos, demostraron que los productos hidrofóbicos como el O-oleoilaminohexanol (éster) y el N,O-dioleoilaminohexanol (diacilado), tienen una afinidad mayor por disolventes de su misma naturaleza y una menor afinidad por medios de naturaleza polar como el dimetilsulfóxido (DMSO) y la piridina. Contrariamente, un producto polar como el N-oleoilaminohexanol (amida) mostró una afinidad superior por disolventes polares y poca afinidad por medios hidrofóbicos. Considerando las observaciones teóricas, se eligieron los disolventes y se evaluó experimentalmente la reacción modelo utilizando al *n*-hexano como sistema hidrofóbico y al 2-metil-2-butanol (2M2B) como medio de reacción polar. Los resultados observados en estas reacciones correlacionaron con el comportamiento teórico, exhibiendo al sistema *n*-hexano como medio propicio para la acumulación preferencial los productos hidrofóbicos (éster y diacilado) con rendimientos superiores al 90%. De la misma forma, se acumuló de manera quimioselectiva el producto polar amida con un rendimiento del 84.5% en el sistema 2M2B, corroborando los cálculos teóricos. No obstante que para el sistema *n*-hexano la acumulación de productos hidrofóbicos fue superior al 90%, la concentración final del producto éster fue menor al 25%. Considerando esta limitante, se aprovechó la mayor velocidad de síntesis de este compuesto con respecto a las velocidades observadas para la síntesis de los demás productos (control cinético) y de esta manera fue posible obtener al producto éster con rendimientos del 80% en *n*-hexano. Contrario a lo reportado en la literatura, la elucidación estructural de los productos de reacción y el análisis de los perfiles cinéticos, permitieron demostrar que es posible sintetizar amida en este tipo de sistemas. En efecto, los resultados de este trabajo permitieron demostrar que su acumulación puede ser posible por acilación directa del grupo amino libre del 6-amino-1-hexanol y/o por hidrólisis del enlace éster del producto diacilado.

## 1. Introducción

La industria química es un sector en continuo crecimiento y desarrollo, donde existe un interés permanente en la creación y mejoramiento de métodos más eficientes de síntesis, orientados a mejorar o simplificar los procesos actuales. En este sentido, la búsqueda de rutas novedosas de transformación generalmente se enfoca al desarrollo de procesos altamente selectivos (regio-, quimio- y estereoselectivos), teniendo como principal objetivo la disminución de subproductos o impurezas (**Mark D. et al., 2007**).

Una de las complicaciones más importantes en procesos de transformación se origina cuando diferentes grupos funcionales exhiben reactividad similar y coexisten en un mismo sustrato. Estas situaciones recurrentes en procesos de síntesis de fármacos, en donde es común encontrar moléculas polifuncionales. Bajo estas circunstancias, la quimioselectividad, que tiene por objetivo mejorar el reconocimiento de un sólo grupo reactivo para la formación selectiva del producto de interés, se vuelve una estrategia por demás relevante en procesos de síntesis. Así, un proceso quimioselectivo tendrá como finalidad aumentar el reconocimiento de un grupo funcional específico, evitando la formación de subproductos indeseados y disminuyendo con ello el número de etapas del proceso (**Nahmany M. y Melman A., 2004**). Es importante subrayar que las políticas actuales referentes al desarrollo de nuevos procesos de síntesis están encaminadas al establecimiento de procesos sustentables, es decir, que no comprometan los recursos para satisfacer necesidades futuras. En este sentido, es deseable que el desarrollo de métodos alternativos de síntesis quimioselectiva, contemplen el uso de tecnologías más limpias y amigables con el medio ambiente.

Una parte importante de la industria de la síntesis orgánica dirigida a la producción de fármacos integra dentro de sus procesos diversos grupos funcionales. Entre los más frecuentes, se pueden encontrar a las aminas, los alcoholes y sus respectivos derivados acilados amidas y ésteres. De hecho, un estudio reveló la alta frecuencia de las reacciones de acilación en síntesis orgánica, en donde los enlaces amida representaban el 50% de los fármacos sintéticos reportados hasta ese momento, mientras que los enlaces éster constituían cerca del 25%. Asimismo, en fármacos naturales la presencia de estos enlaces era de 10% y 35% respectivamente (**Henkel T. et al., 1999**).

Dada la reactividad similar entre las aminas y los alcoholes en reacciones de acilación, los procesos que involucran moléculas bifuncionales de tipo amino-alcohol generalmente dan como resultado una mezcla de amidas, ésteres y/o moléculas diaciladas. De hecho, debido a que el grupo amino suele ser mejor nucleófilo que el grupo hidroxilo, las reacciones de acilación se ven frecuentemente favorecidas hacia la síntesis de amidas. Así, los métodos clásicos de síntesis selectiva de ésteres en moléculas de este tipo requieren de la protección de los otros grupos amino presentes en la molécula (con la consecuente desprotección de los mismos al final del proceso). Esta estrategia, aunque útil y eficaz, incrementa el número de etapas del proceso y la complejidad del sistema, en consecuencia, los costos de producción.

En años recientes, gracias a la alta selectividad de las enzimas, el uso de biocatalizadores ha representado una alternativa efectiva para aumentar la eficiencia de los procesos de síntesis. De hecho, actualmente existen más de 150 procesos a gran escala para la elaboración de químicos finos en los cuales las enzimas tienen una participación importante dentro del proceso (**Boy Cornils, 2008**). Uno de los factores que han contribuido de manera crucial en la integración de las enzimas en dichos procesos de síntesis es que muchas de ellas presentan una alta compatibilidad con medios de reacción no acuosos, medios usados con mayor frecuencia en síntesis orgánica. En este sentido, enzimas tales como las lipasas, además de la amplia variedad de reacciones de acilación que pueden catalizar, han demostrado su utilidad en síntesis orgánica debido a su alta estabilidad y actividad en solventes orgánicos (**Schmid R.D y Verger R., 1998**).

En términos del control de la selectividad en procesos enzimáticos, las estrategias más utilizadas se pueden agrupar en dos categorías principales. La primera de ellas consiste en ejercer un control cinético en el sistema, en donde, por efecto de la naturaleza de la enzima y del disolvente, se favorezca la transformación de uno de los grupos reactivos por su mayor velocidad de reacción. De esta manera la selectividad estará definida por la velocidad específica de transformación de cada uno de los grupos. Un segundo enfoque consiste en la manipulación del medio de reacción mediante el control de las propiedades termodinámicas del sistema (**Carrea G. y Riva S., 2000**). Basándose en la estimación de las interacciones generadas entre el medio de reacción con los sustratos y productos, esta estrategia, conocida como Ingeniería del Medio de Reacción (IMR), permite diseñar medios de reacción a la medida, mejorando de forma sensible el control de la selectividad de los procesos. Actualmente, se cuenta con herramientas computacionales que permiten un diseño racional del medio de reacción, basándose en cálculos cuántico-termodinámicos de las interacciones de las especies reactivas en un medio de reacción en particular. De esta manera, se han estudiado cambios en la polaridad del medio de reacción con el fin de alterar las interacciones entre los componentes de la reacción y así favorecer la acumulación del producto de interés al equilibrio (**Castillo E. et al., 2003**).

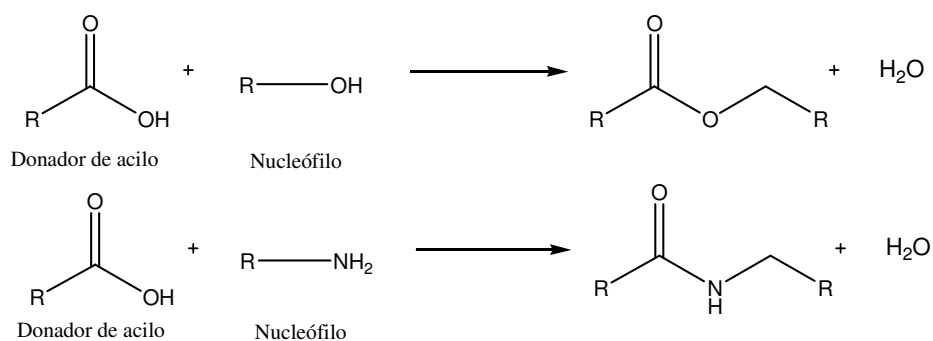
Considerando lo anterior, el presente proyecto plantea el uso de la IMR para el control de la quimioselectividad en sistemas de reacción enzimáticos. Para ello el proyecto se apoyó en el uso del modelo COSMO-RS (**CO**nductor-like **S**creening **MO**del for **R**ealistic **S**olvents), como herramienta para el diseño del medio de reacción. Este modelo se basa en considerar al medio de reacción como un solvente virtual continuo, el cual es descrito mediante una combinación de cálculos químico-cuánticos para solutos y solventes y en procedimientos de termodinámica estadística (**Klamt A. et al., 1998**). Particularmente, se estudiaron las reacciones de acilación sobre la molécula bifuncional 6-amino-1-hexanol, utilizando como biocatalizador la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada. Dado que el carácter bifuncional de los amino-alcoholes induce dos vías de transformación posibles (contiene un grupo amino e hidroxilo), el estudio del control de la quimioselectividad del proceso constituyó el tema central de este trabajo.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Quimioselectividad

En el contexto de los procesos de transformación química, uno de los mayores obstáculos se origina cuando dos o más grupos funcionales exhiben reactividad similar y coexisten en un mismo sustrato. Estas circunstancias provocan reacciones laterales que dan lugar a productos no deseados, ocasionando pasos complejos de purificación y en consecuencia elevan el costo de los procesos. Dentro de la química convencional, una de las estrategias más recurrentes para contender con el problema, es la protección y desprotección de grupos funcionales específicos. Esta opción, aunque efectiva, implica varias etapas que complican la síntesis y afectan los rendimientos (**Bellot J.C., 2001**). Bajo esta problemática, la quimioselectividad, que consiste en el reconocimiento preferencial de un grupo reactivo sobre otros presentes en la misma molécula, se vuelve un objetivo crucial. Así, un proceso quimioselectivo tendrá como objetivo disminuir el número de etapas del proceso, facilitar la síntesis del producto de interés, evitar la formación de subproductos indeseados y facilitar la purificación (**McNaught A.D., 1997**).

Una de las reacciones más ampliamente utilizadas en el área de síntesis química es la reacción de acilación (figura 1). De hecho, de entre la gran variedad de productos químicos acilados producidos a gran escala, son de especial relevancia los ésteres y las amidas (**Sivasamy A. et al., 2001**).



**Figura 1.** Reacciones de acilación entre donadores de acilo y nucleófilos, a) esterificación, b) amidación.

En el caso particular del sector farmacéutico, se estima que el 45% del total de moléculas con actividad farmacológica presentan funciones alcohol (-OH) y/o amino (-NH<sub>2</sub>, -NH-, -N=), así como la presencia de los derivados correspondientes ésteres y/o amidas. Una gran parte de estas moléculas de interés farmacológico contienen incluso más de uno de estos grupos funcionales en su estructura, correspondiendo generalmente

a compuestos bifuncionales de tipo amida/éster y amino/alcohol (**Henkel T. et al., 1999**). Debido al requerimiento de un control estricto de la pureza y calidad química de los compuestos polifuncionales en la industria farmacéutica, el desarrollo de procesos quimioselectivos eficientes presenta una complejidad particular. En este sentido, ya se ha mencionado la necesidad de protección y desprotección de los grupos funcionales para la obtención de procesos quimioselectivos eficientes para la acilación de amino-alcoholes. De hecho la necesidad de las etapas de protección se requieren por la mayor nucleofilicidad del grupo amino, lo cual orienta de manera preferencial la reacción hacia la síntesis de ésteres. Cabe señalar que si bien se han reportado un número importante de estrategias para la protección de grupos amino, existe una disponibilidad limitada de métodos eficientes para la protección de grupos hidroxilo.

Un ejemplo de las técnicas usadas para llevar a cabo la O-acilación de manera selectiva sobre un amino-alcohol, es elevar la acidez del medio de reacción de manera que el grupo amino libre se protone por completo y quedé “protegido” mediante la formación de una sal. Alternativamente, se ha reportado frecuentemente en la literatura el uso de cloruros de acilo en reacción con el hidrocloreuro del amino-alcohol correspondiente, en una mezcla de acetonitrilo y benceno como medio de reacción a reflujo (**Nahmany M. y Melman A., 2004**). Es importante mencionar que estas metodologías, además de llevarse a cabo a condiciones extremas de temperatura (cerca de 200 °C), de pH (presencia de ácidos o bases fuertes), generalmente presentan baja quimioselectividad. Así, considerando las exigencias actuales de la química fina y la necesidad de moléculas con estructuras cada vez más específicas, estos procesos de acilación química pueden volverse costosos y complicados. En los últimos años, en afán de procesos más amigables, más limpios, sencillos y menos costosos, herramientas de síntesis como el uso de enzimas como biocatalizadores son una alternativa de interés en el área (**Florian Le Joubioux, et al., 2011**).

## **2.2 Biocatálisis**

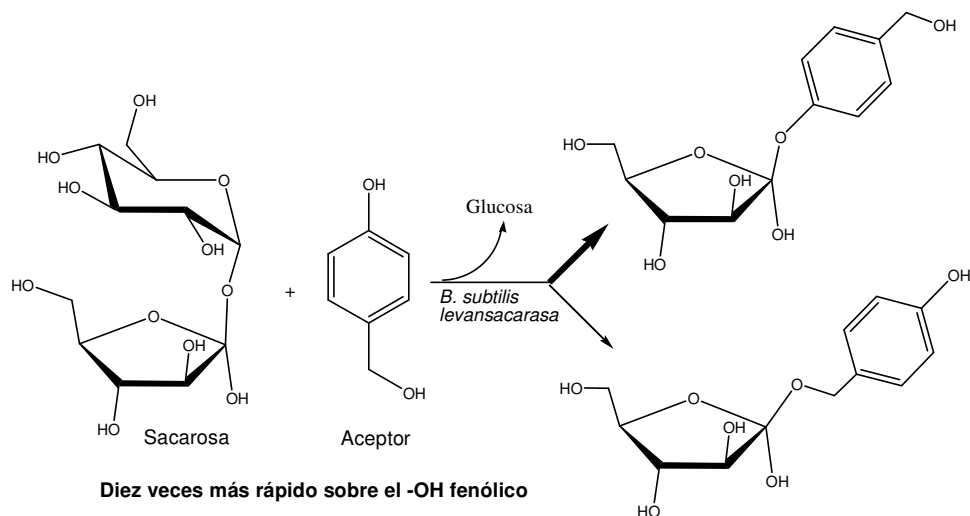
### **2.2.1 Enzimas**

Durante los últimos años, el empleo de biocatalizadores en el área de síntesis orgánica se ha convertido en una alternativa muy atractiva con respecto a los procesos químicos convencionales. Estos biocatalizadores son proteínas catalíticas de alta eficiencia, capaces de catalizar procesos químicos aumentando las velocidades de reacción hasta  $10^{12}$  veces con respecto al proceso en ausencia de un catalizador. Son los hechos de que las enzimas presenten una alta regio-, estéreo- y quimioselectividad en las reacciones que catalizan, y que los procesos se realicen en condiciones de temperatura y

pH relativamente suaves ( $T < 75^{\circ}\text{C}$ ,  $\text{pH} \approx 7$ ) lo que ha generado que estos catalizadores biológicos tengan un impacto creciente en el área de la síntesis orgánica (**Faber K., 2011; Drauz et al., 2002; Patel R.N., 2000**). En resumen, los procesos biocatalíticos son menos agresivos, menos contaminantes, consumen menos energía que las metodologías químicas tradicionales y pueden disminuir los costos de producción. De hecho, el interés por el uso de biocatalizadores en la industria química ha sido posible gracias al número creciente de investigaciones realizadas en el área de la síntesis y se refleja en el aumento constante de reportes en donde se realizan transformaciones químicas con enzimas, microorganismos y anticuerpos catalíticos (**Jones et al., 1997**).

### 2.2.2 Enzimas en procesos quimioselectivos

En años recientes se han reportado diversas posibilidades para el control de la quimioselectividad en procesos catalizados por enzimas. Uno de estos reportes, indica la posibilidad de glicosilar de manera específica moléculas que contienen grupos fenol y alcohol, utilizando enzimas del tipo glicosiltransferasa (figura 2) (**Mena-Arizmendi et al., 2011**). En este tipo de procesos la quimioselectividad resultó ser un efecto de las propiedades catalíticas particulares de las enzimas utilizadas, en donde la glicosilación del hidroxilo fenólico presentó una velocidad y eficiencia casi 10 veces mayor que la glicosilación sobre el alcohol primario. Por otro lado, se ha reportado que bajo ciertas condiciones determinadas por la naturaleza del medio de reacción era posible orientar la naturaleza de la transformación enzimática. Así, en una reacción entre un nucleófilo y un éster alfa-beta insaturado, la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) puede llevar a cabo una reacción de tipo Michael o la amidación del carbonilo correspondiente (**J. Priego et al., 2009**).



**Figura 2.** Glicosilación enzimática específica sobre un hidroxilo fenólico en presencia de un alcohol primario (Mena-Arizmendi et al., 2011).

La acilación enzimática sobre aminas y alcoholes, se ha reportado como un proceso eficiente para la síntesis de amidas y ésteres. En este sentido, el tipo de enzimas utilizadas han sido generalmente hidrolíticas, tales como las proteasas, las amidasas y las lipasas (Vonderhagen et al., 1999). Así por ejemplo, dentro de la industria alimentaria, de perfumes y farmacéutica, el uso de esterasas y proteasas ha sido significativo en la producción de precursores esterificados como azúcares, compuestos aromáticos y fármacos quirales o la resolución enzimática de aminas quirales (Panda et al., 2005; Bradbury A.F. et al., 1991; Van Rantwijk F. et al., 2004; Kallenberg et al., 2005).

Si bien los procesos para la síntesis enzimática de ésteres y amidas se reportan generalmente como procesos altamente eficientes, dichos procesos han sido desarrollados de manera independiente, es decir en procesos con moléculas monofuncionales. En efecto, la acilación directa y selectiva sobre moléculas que presentan funciones amino y alcohol en sí mismas no es una tarea sencilla. De hecho, es común encontrar en reacciones de acilación enzimática de moléculas bifuncionales, mezclas complejas de amidas, ésteres y productos diacilados.

Las enzimas más utilizadas para la acilación de sustratos del tipo amino-alcohol son las lipasas. Una de las estrategias usadas con estas enzimas para resolver quimioselectivamente este tipo de moléculas, es aprovechar la mayor velocidad con la que catalizan la reacción de esterificación. De este modo, al detener la reacción de acilación a tiempos cortos, se logra favorecer la O-acilación de manera selectiva (Florian Le Joubioux, et al., 2011). Una metodología alternativa en donde se han utilizado lipasas como biocatalizadores, consiste en bloquear el grupo amino mediante cambios en su

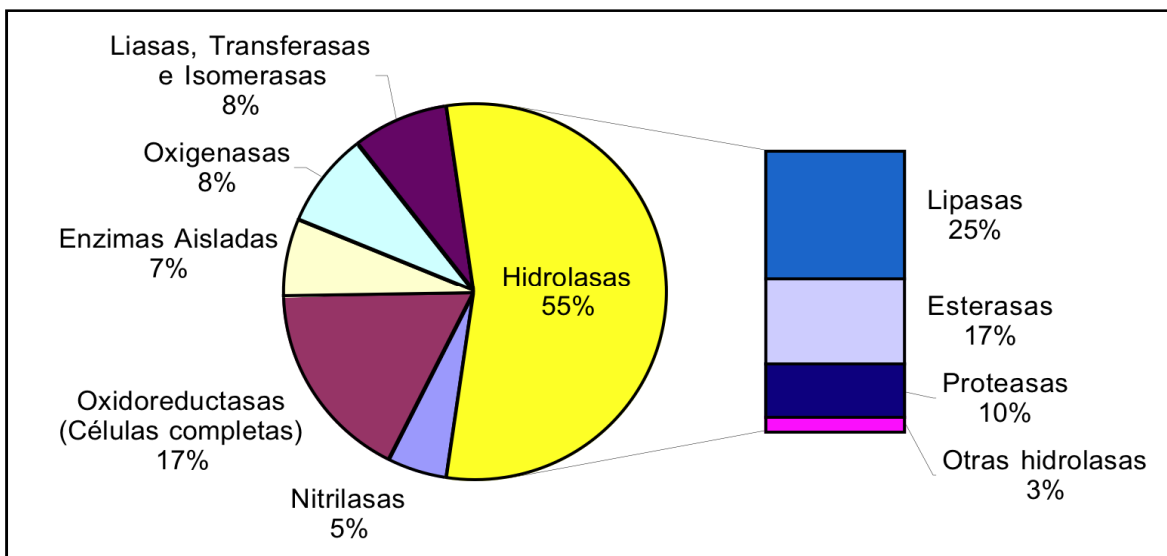


estado de ionización. En este sentido se reporta la acilación selectiva sobre el hidroxilo de un amino-alcohol con rendimientos superiores al 80% (**Husson E. et al., 2009**).

Además de las lipasas, enzimas proteolíticas como la subtilisina (específicas para la hidrólisis de enlaces amida) han sido utilizadas para lograr acilaciones quimioselectivas en amino-alcoholes, pero con rendimientos muy bajos (**Chinsky N., 1988**). Cabe mencionar que en general, la síntesis enzimática de este tipo de compuestos (amidas, ésteres y diacilados) mediante el uso de enzimas hidrolíticas, requiere de condiciones de bajo contenido de agua en el sistema. Esto para favorecer la solubilidad de moléculas hidrofóbicas y para, disminuir al máximo la reacción de hidrólisis. Así, las condiciones que más se han utilizado para cumplir con estas propiedades del medio han sido el empleo de disolventes orgánicos como medios de reacción (**Pedersen N.R. et al., 2002**). Es importante señalar que bajo estas circunstancias, a excepción de las lipasas, enzimas como las proteasas, esterases y prácticamente el resto de las hidrolasas, presentan una disminución significativa en su actividad catalítica por efecto de temperaturas elevadas y por su baja afinidad ante los disolventes (**Klibanov A.M. et al., 1997**). En este contexto, diversos trabajos han postulado a las lipasas como la mejor opción catalítica en la síntesis de compuestos N- y O-acilados (**Klibanov et al., 2000; Gotor V., 1999**). Debido a su mayor estabilidad en disolventes orgánicos, a temperaturas elevadas y a su promiscuidad catalítica para transformar una amplia variedad de sustratos (sección 2.3).

### **2.3 Lipasas**

Las enzimas utilizadas en la industria, así como a nivel laboratorio, se pueden clasificar en 6 grupos, donde las hidrolasas (EC 3.) conforman al grupo mayoritario. A nivel industrial, las hidrolasas son los biocatalizadores más empleados, abarcando el 55% de las enzimas utilizadas en este sector, de las cuales el 25% son lipasas (figura 3).



**Figura 3.** Esquema gráfico que muestra los porcentajes que representan los diferentes grupos de enzimas utilizados a nivel industrial

De acuerdo al sistema de clasificación de las enzimas EC (*Enzyme Commission numbers*), establecido en función del tipo de reacción que catalizan, las lipasas se clasifican como acil hidrolasas o triacilglicerol hidrolasas (E.C. 3.1.1.3) dentro del grupo de las hidrolasas de éster carboxílico (Jaeger K.E. et al., 2002). Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y son obtenidas por diferentes vías, siendo los hongos, las levaduras y las bacterias su principal fuente de producción comercial. Tienen como sustrato natural los triacilgliceroles con ácidos grasos de cadena larga (más de 10 carbonos). Realizan la hidrólisis de los enlaces éster en sistemas acuosos y la reacción inversa en medios con baja actividad de agua. Cabe señalar que la mayoría de las lipasas también pueden hidrolizar ésteres de ácidos grasos de cadena corta (menor a 10 carbonos) (Coca J. et al., 2001).

### 2.3.1 Importancia comercial de las lipasas

Las lipasas, además de su uso en el procesamiento industrial de grasas, son capaces de catalizar un número importante de reacciones alternas; establece en un amplio rango de pHs, temperatura y distintos disolventes orgánico; son resistentes a diferentes detergentes, iones y otros agentes químicos. Estas enzimas en general se han reportado como catalizadores exitosos en diferentes sectores industriales, tales como: la industria textil, farmacéutica, papelera, cosmética, en la industria de detergentes. De hecho, destacan las aplicaciones desarrolladas en la industria (tabla 1) (Pouilloux Y. et al., 1999).

**Tabla 1.** Distintas aplicaciones industriales de las lipasas.

Industria	Funciones	Productos
Lácteos	Hidrólisis de grasa en leche Maduración de quesos Modificaciones de mantequillas	Agentes saborizantes en Queso y Mantequilla
Panificación	Mejoramiento de sabor Prolongación de vida de anaquel	Productos de panificación
Bebidas	Mejoramiento de aromas	Bebidas
Condimentos	Aumento en vida de anaquel	Mayonesas y Especies
Cárnicos	Desarrollo de sabores Remoción de grasas	Embutidos y demás productos cárnicos
Cosméticos	Síntesis	Emulsificantes Agentes humectantes
Farmacéutica	Síntesis estereoselectiva	Intermediarios de medicamentos
Limpieza	Hidrólisis	Surfactantes Removedores de grasas

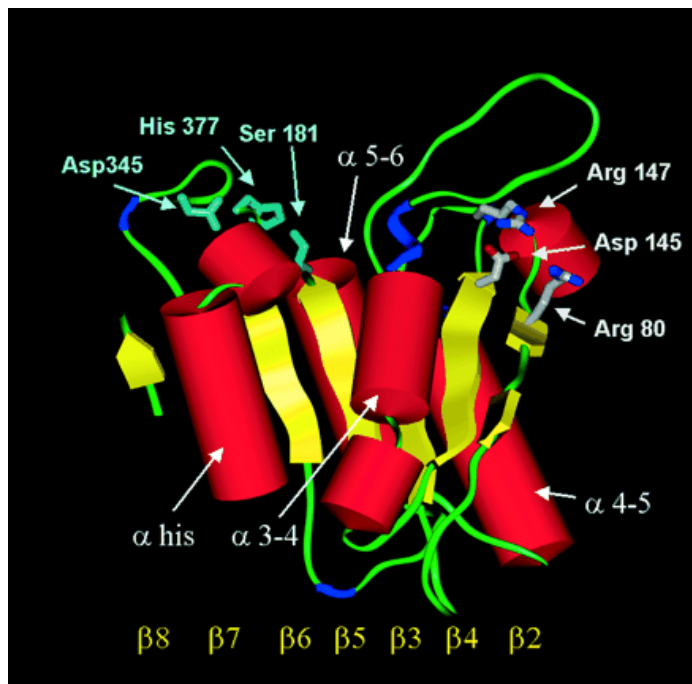
En el ámbito de la industria farmacéutica, las lipasas resultan de gran interés debido a su capacidad de realizar reacciones regioselectivas, así como su alta enantioselectividad (Hernaiz M.J. et al., 2006). De hecho, se han reportado reacciones de alcoholisis y aminólisis en fármacos, resolviendo ésteres y amidas ópticamente activas (tabla 2) (Kazlauskas R., 1994).

**Tabla 2.** Ejemplos de procesos industriales catalizados por lipasas de uso comercial.

Organismo	Aplicación	Compañía
<i>Candida rugosa</i>	Síntesis orgánica	Amano, Biocatalyst, Boehringer mannheim, Sigma
<i>Candida antarctica</i>	Síntesis orgánica	Novozymes (Novo Nordisk), Boehringer mannheim
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Aditivo para detergentes	Boehringer mannheim, Novozymes
<i>Rhizomucor miehei</i>	Procesamiento de alimentos	Amano, Biocatalyst, Novozymes
<i>Burkholderia cepacia</i>	Síntesis orgánica	Boehringer mannheim, Genencor
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Aditivo para detergentes	Genencor
<i>Pseudomonas mendocina</i>	Síntesis orgánica	Genencor

### 2.3.2 Características estructurales de las lipasas

Estructuralmente las lipasas resueltas hasta la fecha por rayos X, varían de entre 270 y 641 aminoácidos y tienen pesos moleculares que oscilan entre 20 y 60 kDa. Constan de un plegamiento que consiste en una estructura central hidrofóbica de láminas  $\beta$  con 8 hojas paralelas excepto la segunda (antiparalela), donde las láminas  $\beta$  de la 3 a la 8 están unidas con  $\alpha$  hélices que rodean la estructura central. Esta conformación es usual en un gran número de hidrolasas ( $\alpha/\beta$ -hidrolasas). Su sitio activo está integrado por 3 aminoácidos denominados triada catalítica, constituida por una serina nucleofílica, una histidina y un ácido aspártico/glutámico (Ser–His–Asp/Glu) (figura 4). Adicionalmente, para estabilizar el sustrato se han identificado 4: una cavidad que forma un oxianión y tres compartimentos para acomodar los ácidos grasos del triacilglicerol que se encuentren en las posiciones sn–1, sn–2 y sn–3 (Uppenberg, 1994).



**Figura 4.** Modelo estructural construido por homología con CalB, utilizado como templado de la Lipasa acil-transferasa humana de lecitina-colesterol (LCAT). Se observan claramente el núcleo de láminas  $\beta$  unidas y rodeadas por  $\alpha$  hélices (rojo oscuro), así como la triada catalítica propia de las lipasas Ser–His–Asp/Glu (para esta enzima Ser181-His377-Asp345). Imagen tomada de **Peelman F., 2001.**

Como característica particular, las lipasas presentan máxima actividad catalítica solamente cuando actúan en una interface agua-aceite, fenómeno al que se denominó “activación interfacial”. Esta propiedad se debe a la presencia de una estructura terciaria

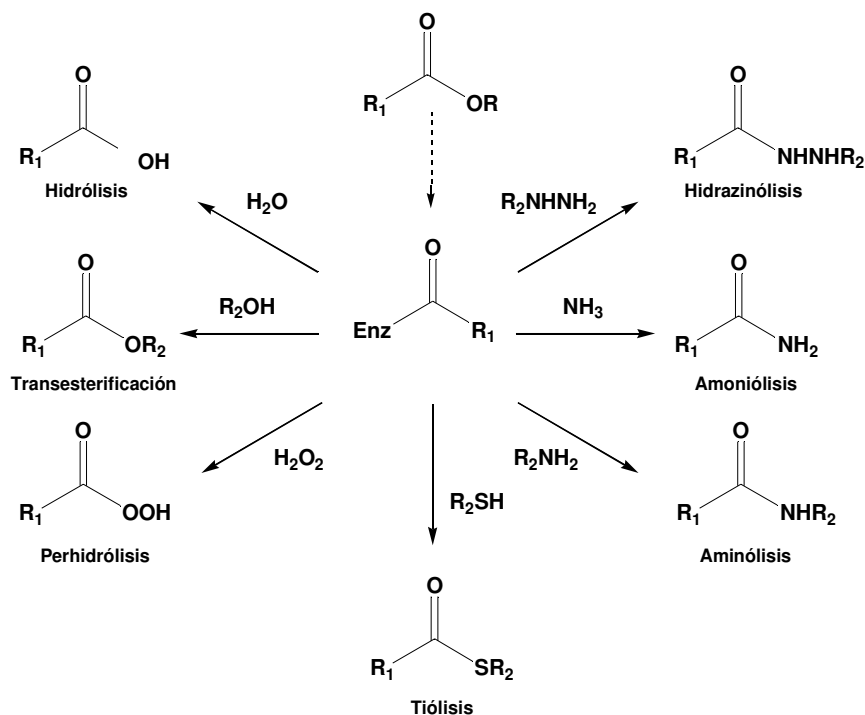
única que forma una especie de “tapa” o “hélice móvil” peptídica anfifílica compuesta por una  $\alpha$  hélice ( $\alpha 5$ , residuos del 139 al 146) que cubre la entrada al sitio catalítico (figura 5). La “tapa” al estar en contacto con la fase oleosa se activa y sufre un cambio conformacional dejando expuesta la entrada al sitio activo para la libre llegada del sustrato. El fenómeno de la activación interfacial también es efectuado en presencia de solventes hidrofóbicos o poco polares, ya que la conformación abierta de la tapa es favorecida termodinámicamente. Sin embargo, existen excepciones y no todas las lipasas presentan dicho fenómeno a pesar de contar con la hélice móvil, exponiendo su sitio activo en todo momento, lo cual aumenta su versatilidad. Algunos ejemplos notorios lo son la lipasa B de *Candida antarctica*, *Pseudomonas glumae* y *Pseudomonas aeruginosa*, que en teoría usan su motivo de “tapa” para anclarse a la interfase orgánica (Torre O. et al; 2006).



**Figura 5.** Vista lateral de la estructura cristalográfica correspondiente a la lipasa B de *Candida antarctica* (PDB 1TCA). En la parte superior en color azul se puede observar la estructura  $\alpha 5$ , hélice móvil responsable del fenómeno de activación interfacial o del anclaje a la interfase orgánica. Dentro de la elipse blanca en tonos azules se encuentran los residuos que integran al sitio catalítico y a la cavidad oxianión.

### 2.3.3 Características catalíticas de las lipasas

En el contexto de la síntesis enzimática en sistemas de reacción no acuosos, cabe señalar la gran estabilidad que muestran las lipasas en presencia de solventes orgánicos, resultando altamente eficientes para procesos de hidrólisis inversa. Otra de las cualidades que hacen a las lipasas uno de los biocatalizadores más usados en química orgánica es su “promiscuidad catalítica” (figura 6). Es decir, la capacidad de transformar diversos sustratos con grupos funcionales diferentes manteniendo su alta regio-, quimio- y enantioselectividad (**García-Urdiales E., 2000**).

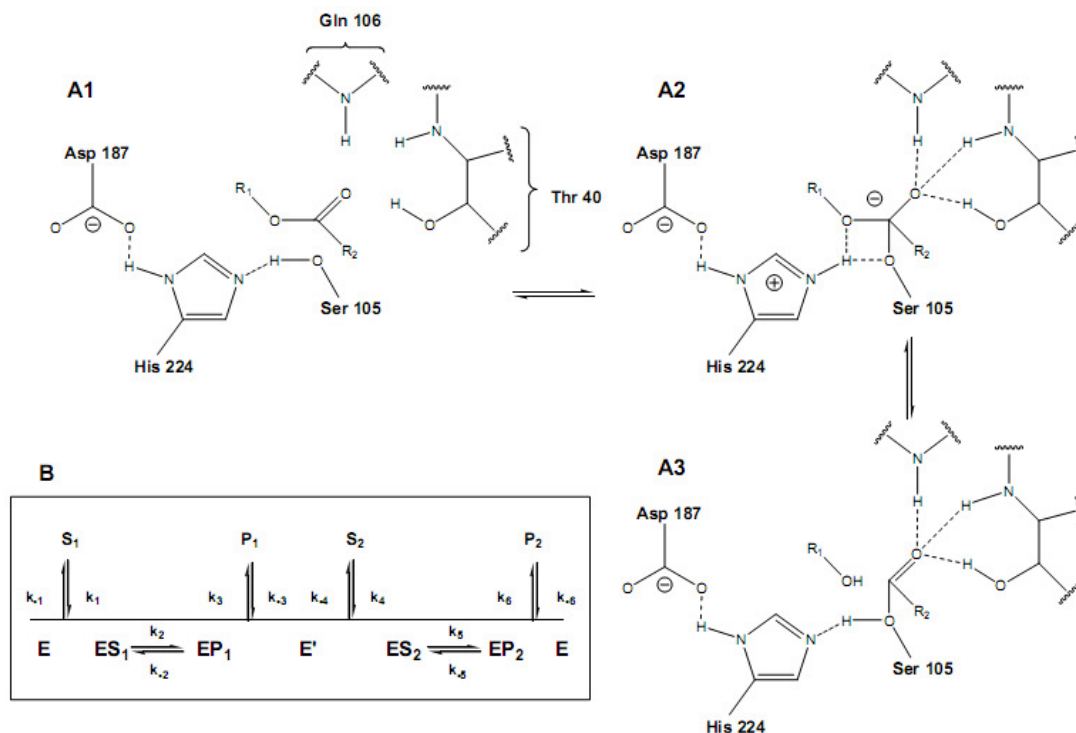


**Figura 6.** Reacciones de acilación más usuales catalizadas por lipasas en medios orgánicos sobre aminas y alcoholes

La versatilidad de las lipasas, se asocia a su mecanismo catalítico, el cual de manera intrínseca forma un complejo acil-enzima entre los aminoácidos catalíticos y el donador de acilo. Este proceso, ocasiona la activación del carbonilo del sustrato donador de acilo, que le confieren una carga parcial positiva propensa para un ataque nucleofílico. Dicho ataque puede ser realizado por alcoholes, tioles, aminas, ésteres, amidas y lactonas (figura 6).

El mecanismo cinético al que se ajustan la mayoría de las lipasas corresponde al modelo de tipo Ping Pong Bi Bi ordenado, el cual es químicamente parecido a una reacción de sustitución nucleofílica  $S_N2$  (figura 7B). Donde de manera general, el modelo consiste en la entrada de un primer sustrato ( $S_1$ ) y la salida consecuente de un primer

producto (**P1**), seguido de la entrada de un segundo sustrato (**S2**) para originar y expulsar el segundo producto (**P2**) (**García T., 1999 y 2000**).



**Figura 7.** Mecanismo catalítico de las lipasas basado en la triada catalítica compuesta por una serina nucleofílica (Ser105), una histidina (His224) y un ácido aspártico (Asp187). La numeración de los amino ácidos corresponde a la estructura de la lipasa B de *Candida antarctica* (CalB) (A1). Intermediario tetraédrico (A2) Agujero oxianión integrado por una treonina (Thr40) y una glutamina (Gln106). Complejo acil-enzima (A3). B) Esquema del modelo de Ping-Pong Bi Bi.

De una manera más detallada, el proceso de catálisis efectuado por la triada catalítica Ser–His–Asp/Glu, inicia cuando el átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la serina catalítica es activado como nucleófilo por los residuos His–Asp/Glu del sitio activo mediante una transferencia de protones (figura 7A1). Una vez activada la serina, ésta realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico del sustrato formando un *intermediario tetraédrico* y dejando una carga negativa en el átomo de oxígeno del grupo carbonilo. Este intermediario es estabilizado por la hélice “ $\alpha 3$ ” (ó “ $\alpha C$ ”) de la enzima y por los puentes de hidrógeno generados entre los dos grupos amino y el grupo hidroxilo ubicados en el subsitio conocido como “cavidad oxianión” (figura 7A2). El aumento en el carácter nucleofílico del residuo hidroxilo de la serina, esta dado por la transferencia de su protón al residuo imidazol de la histidina catalítica y a su vez ayudado por una

estabilización de carga con el residuo Asp/Glu. Este mismo protón es el que pasa al oxígeno del alcohol liberado en la ruptura del enlace éster que se separa del *intermediario tetraédrico*, obteniéndose así el primer producto. El acilo del sustrato termina por esterificarse con la serina, creando el complejo acil-enzima (figura 7A3). La disociación de la enzima de este complejo inicia cuando el segundo sustrato (nucleófilo) entra al sitio activo y realiza un nuevo ataque nucleofílico sobre el carbonilo ahora esterificado con la serina catalítica. De nuevo, un intermediario tetraédrico se forma y se estabiliza por las interacciones en la cavidad de oxianión (figura 7A2). La histidina entonces dona el protón al átomo de oxígeno de la serina catalítica, haciendo que se libere el componente acilado como segundo producto, regenerando la enzima a su estado (figura 7A1).

Cabe señalar que pese a su homología estructural y mecanística, la especificidad de las lipasas hacia diferentes sustratos está en función de las variaciones en los residuos próximos al sitio activo de cada enzima (Schmid R. D. y Verger R., 1998; Jaeger K.E., 1999).

#### 2.3.4 Lipasa B de *Candida antarctica*

El basidiomiceto *Candida antarctica* presenta la expresión de dos isoenzimas con actividad triacil glicerol hidrolasa, llamadas lipasa A y lipasa B. De manera más usual son conocidas por la abreviación de CalA y CalB, respectivamente. Estas dos enzimas presentan características inusuales y a pesar de que son aisladas del mismo origen exhiben propiedades diferentes (tabla 3) (Kirk O., 2002).

**Tabla 3.** Características generales de las lipasas A y B de *Candida antarctica*.

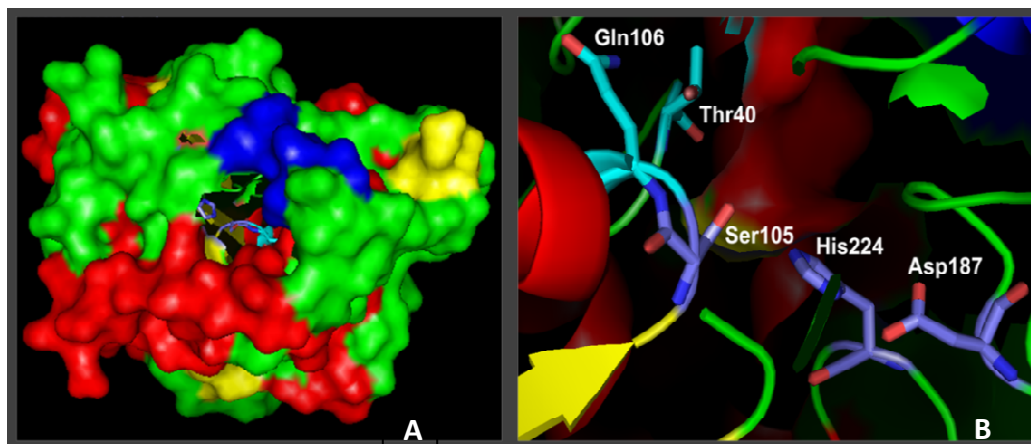
Características	CalA	CalB
Peso molecular (kD)	45	33
Punto isoeléctrico (pI)	7.5	6
pH Optimo	7	7
Actividad específica(LU/mg)	420	435
Estabilidad (pH)	6 - 9	7 - 10
Activación interfacial	Baja	Nula
Especificidad a triglicéridos	Sn-2	Sn-3

Su conformación estructural es similar a la reportada para las  $\alpha/\beta$ -hidrolasas. La resolución de la estructura cristalográfica de CalB elucidó un plegamiento de barril  $\alpha/\beta$



con núcleo central de 7 láminas  $\beta$  rodeadas por 10  $\alpha$ -hélices, con una dimensión de 30 x 40 x 50 Å (ver figura 4). La entrada a la cavidad del centro activo se sitúa en el centro de una gran superficie plana de 450 (Å)<sup>2</sup>, con forma triangular y ligeramente cóncava (figura 8A) (Uppenberg et al., 1994).

Este arreglo estructural, presenta muy poca homología con la gran mayoría de las lipasas y no requiere de la “activación interfacial”. Sin embargo, conserva la triada de aminoácidos propios del centro activo de las lipasas compuesto por la serina 105, el aspártico 187 y la histidina 224 (figura 8B). La serina se encuentra rodeada por 3 residuos capaces de formar puentes de hidrógeno: la treonina 40, la glutamina 157 y el ácido aspártico 134. Estos aminoácidos se encuentran expuestos al disolvente y pueden tener importancia en la especificidad hacia el sustrato. Con el fin de definir los residuos críticos en el acoplamiento del sustrato, así como para revelar el estado de transición, esta enzima ha sido co-cristalizada con sustratos análogos (tiacilgliceroles y ácidos carboxílicos de diferente longitud). En este sentido se observó que los residuos de glutamina 106 y treonina 40 conforman un arreglo llamado el agujero oxianión (también común en la mayoría de las lipasas) responsable de la estabilización del residuo carbonilo del sustrato acilante.

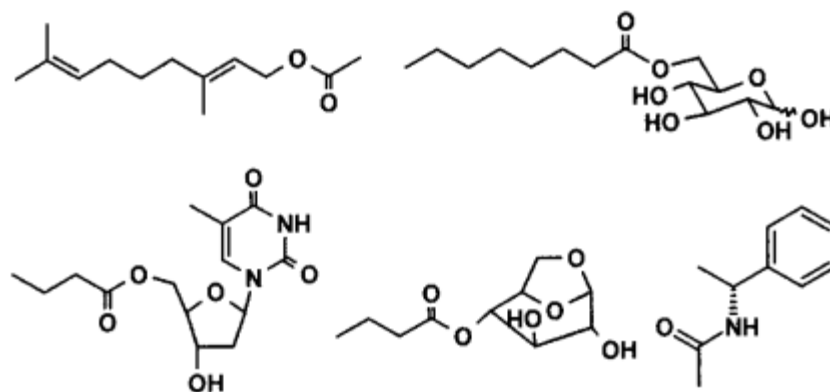


**Figura 8.** A) Superficie de la estructura cristalográfica de CalB donde se puede observar la entrada al sitio activo. B) Triada catalítica (Ser105-Asp187-His224) del centro activo de CalB, así como los residuos que conforman el agujero o cavidad oxianión (Thr40 y Gln106).

CalB, al ser inmovilizada, muestra un aumento en su estabilidad operacional a diferentes disolventes y a la temperatura, comportamiento que generalmente ha sido asociado a una rigidización de su estructura terciaria (Heldt-Hansen H.P., 1989). Esta enzima es capaz de catalizar un gran número de reacciones orgánicas y exhibe un alto grado de selectividad hacia los sustratos que transforma, es decir, presenta elevada regio

y enantioselectividad. A la fecha no se ha caracterizado otra enzima capaz de igualar su versatilidad, haciéndola el catalizador más utilizado en el área de síntesis orgánica.

CalB es comercializada por la compañía Novozymes, tanto en su forma soluble (Novozym 525) como en su forma inmovilizada (Novozym 435). El uso más extensivo de CalB es la resolución de mezclas racémicas de alcoholes y aminas, pero también se ha reportado la síntesis de triglicéridos, esterificaciones regioselectivas de azúcares, nucleósidos, estereoisómeros, entre otros. Algunos de estos procesos han sido llevados a gran escala en la industria farmacéutica, de alimentos e incluso en la producción de biocombustibles como el biodiesel (**Morris F. y Gotor V., 1993**). Algunos de los diferentes compuestos que han sido acilados por la lipasa B de *Candida antarctica*, así como la complejidad de los mismos, pueden observarse en la figura 9.



**Figura 9.** Ejemplos de las estructuras de algunas de las moléculas sintetizadas exitosamente usando CalB como biocatalizador

### 2.3.5 Resolución enzimática quimioselectiva con lipasas

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 y de compuestos bifuncionales con aminas e hidroxilos (**Klibanov A.M., 1990; Roberts S.M., 1998**). Sin embargo, se han reportado pocas aplicaciones relacionadas con síntesis quimioselectiva. Algunos ejemplos del uso de lipasas en procesos quimioselectivos son la aminólisis de ésteres acrílicos, en donde en presencia de enzimas se reporta la formación exclusiva de amidas sin la consecuente formación de aductos de Michael (**Gotor V. et al., 1999**). Por otro lado, se reporta la preparación enantio y quimioselectiva de  $\beta$ -hidroxiésteres o  $\beta$ -hidroxiamidas a partir de sus correspondientes hidroxiaácidos. En estos casos, la resolución quimioselectiva está

favorecida por la reactividad del grupo amino y por el reconocimiento enantioselectivo de los grupos hidroxilo o amino (**Gotor V. et al., 1990**).

Con respecto a la resolución de compuestos bifuncionales, se ha reportado que con amino-alcoholes como el 6-amino-1-hexanol y el trans-4-aminociclohexanol, usando disolventes orgánicos y a la lipasa subtilisina, se logró una formación preferencial del éster utilizando al 2-cloroetilbutirato como donador de acilo, pero con rendimientos bajos (47% y 42% respectivamente) (**Chinsky N. et al., 1989**). Por otra parte, se han podido resolver quimioselectivamente amino-alcoholes como el 1-amino-2-propanol y al 2-amino-1-butanol favoreciendo la acumulación selectiva de amidas en un sistema catalizado por una lipasa y utilizando al acetato de etilo como disolvente y donador de acilo (**Gotor V. et al., 1988**).

Así mismo, en medios orgánicos como el éter diisopropílico y el 1,4-dioxano, usando a CalB como biocatalizador, se ha logrado la monoacilación altamente quimioselectiva de amino-alcoholes de cadena corta como la etanolamina, encontrando como único producto al derivado N-acilado con rendimientos hasta del 95% y con diferentes donadores de acilo (C10 a C16) (**Kiwai M. et al., 2009**). De igual forma en otros reportes, utilizando el mismo amino-alcohol (etanolamina) y trabajando con sistemas similares (lipasas y disolventes orgánicos), se llegó a resultados equivalentes, favoreciendo completamente la síntesis quimioselectiva de amidas al equilibrio de reacción (**Furatani T. et al., 1996**). Otras publicaciones, donde se efectuó la acilación quimioselectiva del 3-amino-3-fenil-1-propanol con acetato de etilo como donador de acilo y terbutil-metiléter como disolvente, así como diferentes lipasas, también reportaron al producto N-acilado como mayoritario y con buenos rendimientos (hasta del 96%) (**Oliver T. et al., 2006**). Cabe señalar, gracias a estos reportes y a otros más donde se utilizaron diferentes amino-alcoholes (**Couturier L. et al., 2009**), que esta generación de amidas, no ocurre por acilación directa sobre el grupo amino del amino-alcohol, sino que su acumulación fue favorecida por el fenómeno de acil migración efectuado en amino-alcoholes de cadena corta (C2-C5) por un ataque nucleofílico del grupo amino libre sobre el carbonilo del producto éster primeramente formado. En otras palabras, se concluyó que el producto más favorecido por la lipasa en una primera instancia fue el producto O-acilado, mismo que por la mayor nucleofilicidad y cercanía del grupo amino libre, dio lugar a la amida como producto mayoritario.

Se puede observar que en general existen diversos procesos donde las lipasas son capaces de resolver aminas y alcoholes quirales e incluso moléculas bifuncionales de diferente grado de complejidad. Sin embargo, tratándose específicamente de amino-alcoholes, a la fecha es muy difícil encontrar procesos biocatalíticos que logren realizar de

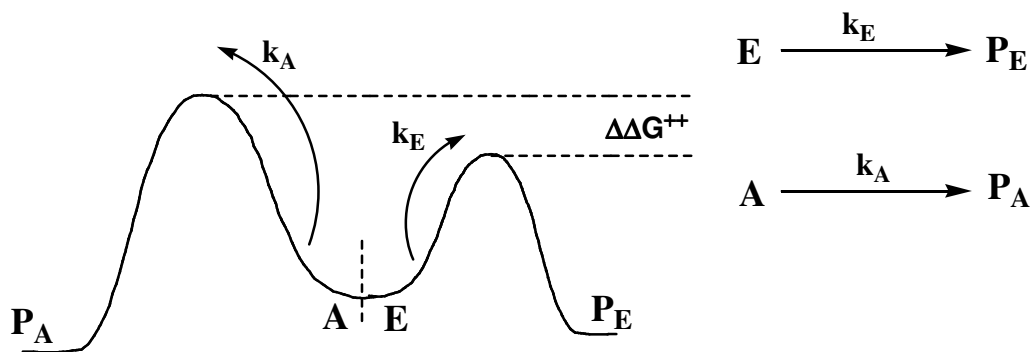
manera directa y con buenos rendimientos una acilación quimioselectiva sobre cada grupo funcional. Considerando los biocatalizadores más utilizados, la lipasa B de *Candida antarctica* destaca como una de las mejores enzimas para llevar a cabo este tipo de procesos.

## 2.4 Estrategias generales para establecer quimioselectividad en biocatálisis

### 2.4.1 Control cinético

Una de las estrategias disponibles en el área de la catálisis enzimática para resolver moléculas quirales o de carácter bifuncional de manera quimioselectiva, es efectuar un control cinético de la reacción. Un ejemplo de esto puede observarse en la literatura donde usando a CalB como catalizador, logran resolver al 2-octanol con un rendimiento teórico del 66% y una pureza enantiomérica (S) mayor al 99.99% (**Reetz M.T. et al., 2003**). De igual forma, se ha reportado la resolución de un mezcla racémica de la alfa-metilbencilamina de manera enzimática a través de una transaminación favoreciendo al isómero (S) (**Shin J.S. et al., 1998**).

En la transformación enzimática o no enzimática de una molécula bifuncional, la energía de los estados de transición para la reacción sobre cada grupo funcional puede ser diferente (figura 10). Si la diferencia de energía entre el estado fundamental y el estado de transición (energía de activación) para cada producto es diferente, se pueden llegar a grandes diferencias en la velocidad, dando como resultado diferentes rendimientos en la resolución (**Woodard S.S., 1981**). En esta metodología una de las variables más importantes a controlar es el tiempo de reacción, ya que puede ser un factor determinante en la quimioselectividad. Es decir, la reacción debe ser detenida justo cuando la conversión favorezca al producto de interés para evitar la posible acumulación del producto no deseado.



**Figura 10.** Ejemplificación gráfica de los deltas de energía de activación entre la reacción de una molécula con funciones E y A que dan paso a los productos  $P_E$  y  $P_A$  respectivamente, donde  $k_E > k_A$  (tomado de Kagan, H. B.; Fiaud, J. C. *Top. Stereochem.* 1988).

Para una molécula bifuncional, el mejor de los casos sería cuando la diferencia de velocidad de reacción es suficientemente grande para que uno de los grupos funcionales reaccione rápidamente para dar el producto correspondiente, mientras el otro se transforma lentamente (**Martín B., 2006**).

A través de la “Ingeniería de proteínas”, con herramientas moleculares, es posible modificar las propiedades cinéticas del biocatalizador. De esta manera se puede lograr que una enzima actúe preferentemente sobre una función específica y así, en términos de velocidad, favorecer la reacción (disminuyendo su energía de activación) sobre el grupo funcional deseado. En el caso de los amino-alcoholes, consistiría en modificar el sitio activo de la enzima de tal modo que la catálisis sea específica sobre el grupo amino o hidroxilo, según se prefiera.

#### 2.4.2 Control termodinámico

Diferentes reportes abordan el control de la quimioselectividad desde un punto de vista termodinámico. Es decir, se estudian cambios en la polaridad del medio de reacción con el fin de alterar las interacciones entre los componentes de la reacción y así favorecer la acumulación de una especie química al equilibrio. Esta estrategia consiste en modificar la naturaleza química del medio de reacción de manera que el sistema favorezca la acumulación del producto deseado (**Castillo E., et al., 2003**). Esta estrategia, definida como “Ingeniería del Medio de Reacción” (IMR), presenta la ventaja de no requerir la modificación de las propiedades estructurales de la enzima y del sustrato, sino diseñar y

desarrollar el medio de reacción más favorable para que el biocatalizador despliegue de manera óptima sus propiedades catalíticas.

### 2.4.3 Ingeniería del Medio de Reacción

La manipulación de la quimioselectividad en sistemas enzimáticos ha sido abordada a través de un área de estudio definida como “Solvent Engineering” (Ingeniería del Medio de Reacción: IMR). De manera general, esta estrategia se basa en un adecuado control termodinámico del sistema, en donde en base a variaciones de temperatura y cambios en la polaridad del medio, se puede modificar la posición del equilibrio termodinámico del sistema y en consecuencia orientar la acumulación favorable del producto de interés. Una de las estrategias más estudiadas para la manipulación del equilibrio termodinámico, es la modificación de la actividad termodinámica  $a_i$  de las moléculas en cuestión de manera que se pueda modificar su disponibilidad para llevar a cabo un proceso químico (**Ec. 1**) (Klibanov A.M., 1997 y 2000). Como se observa en la **Ec. 1**, este valor de “disponibilidad química”  $a_i$  depende de la fracción molar de la molécula ( $X_i$ ) y de su coeficiente de actividad termodinámica  $\gamma_i$ , el cual es función del número y naturaleza de las de interacciones químicas que se presentan entre la molécula y el medio de reacción.

$$a_i = \gamma_i * X_i \quad \text{Ec. 1}$$

Bajo estos argumentos, un disolvente o medio de reacción afín a una molécula específica (producto deseado) generara un coeficiente  $\gamma_i$  bajo y por lo tanto para alcanzar su valor específico de  $a_i$  al equilibrio de la reacción, necesariamente su valor de  $X_i$  deberá incrementarse de manera proporcional. En caso contrario, un disolvente poco afín a un producto, corresponderá a un coeficiente  $\gamma_i$  alto y su fracción molar se verá disminuida,

Un aspecto importante a observar cuando se utiliza esta estrategia es el efecto de la naturaleza del disolvente sobre la velocidad en reacciones enzimáticas, comportamiento que también puede ser abordado desde la perspectiva de la IMR. Matemáticamente, este efecto puede observarse al sustituir los términos de concentración por los valores de actividad termodinámica ( $a_i$ ) en la ecuación cinética (**Ec.3**). En este sentido, se ha reportado que mediante el cambio en la polaridad del medio de reacción es posible modular la actividad termodinámica de los sustratos y en consecuencia modificar el comportamiento cinético del biocatalizador (Sandoval G. y Marty A., 2001).

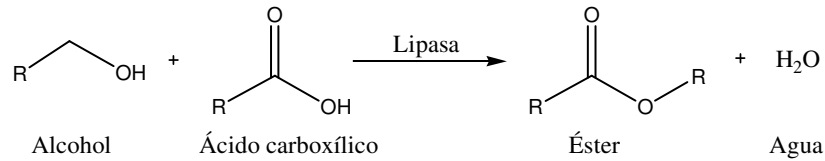
$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} \longrightarrow v = \frac{V_{max}[a_i]}{K_m + [a_i]} \quad \text{Ec. 2.}$$

Los autores sugieren que al modificar el medio de reacción, buscando favorecer la velocidad de transformación de un grupo funcional específico en una molécula bi o polifuncional, es posible manipular cinéticamente la reacción enzimática. De esta manera, una mayor diferencia de velocidades de transformación de los grupos presentes en la molécula impactará en una mejor resolución quimioselectiva.

Para entender mejor el concepto de la IMR y el papel que juega la actividad termodinámica en una reacción, cabe insistir que modificaciones en el valor de los coeficientes de actividad ( $\gamma_i$ ) de una especie química, son el reflejo de cambios en las interacciones específicas entre los reactivos y productos con el medio de reacción. Estas interacciones son ocasionadas entre otros factores, por moléculas cargadas, efectos polares e hidrofóbicos que ocurren entre los solutos y el disolvente que forman la solución. Las interacciones que generan cambios en el coeficiente de actividad termodinámica para cada especie, están determinadas por los grupos funcionales y los tipos de enlace inter- e intramoleculares tanto del soluto como del disolvente.

Todas las interacciones que ocurren y provocan un aumento en la solubilidad de un soluto en un disolvente, reflejan disminuciones en el coeficiente de actividad de la especie y viceversa. Así, el valor de la actividad termodinámica adquiere valores de 0 a 1 y el coeficiente de actividad de un compuesto se hace igual a la unidad cuando este es 100% disponible (fracción molar igual a actividad).

En las reacciones mediadas por lipasas (figura 1 y 11) se ha estudiado el control de la actividad termodinámica  $a_i$  de los productos enfocada al aumento del rendimiento de un producto específico de la reacción. Así, tomando en cuenta la ecuación general de la constante de equilibrio termodinámico (**Ec. 3**), y considerándola para soluciones no ideales, cualquier reacción puede ser definida en términos de las actividades termodinámicas de las especies reactivas (**Ec. 4**). De esta manera, la acumulación preferencial de los productos de reacción estará dada cuando el coeficiente  $\gamma_i$  de los compuestos deseados adopte su valor más bajo. La consecuencia directa de este comportamiento es que los valores de las fracciones molares  $X_i$  de los mismos aumenten proporcionalmente (**Ec. 5**).



**Figura 11.** Reacción de acilación entre un alcohol y un ácido carboxílico catalizada por una lipasa

Para una reacción como la de la figura anterior, la constante de equilibrio en condiciones de idealidad:

$$K_{eq} = K_X = \frac{X_{éster} * X_{agua}}{X_{alcohol} * X_{ácido}} \quad \text{Ec. 3}$$

definida en términos de actividad termodinámica (condiciones no ideales):

$$K_{eq(a)} = \frac{a_{éster} * a_{agua}}{a_{alcohol} * a_{ácido}} \quad \text{Ec. 4}$$

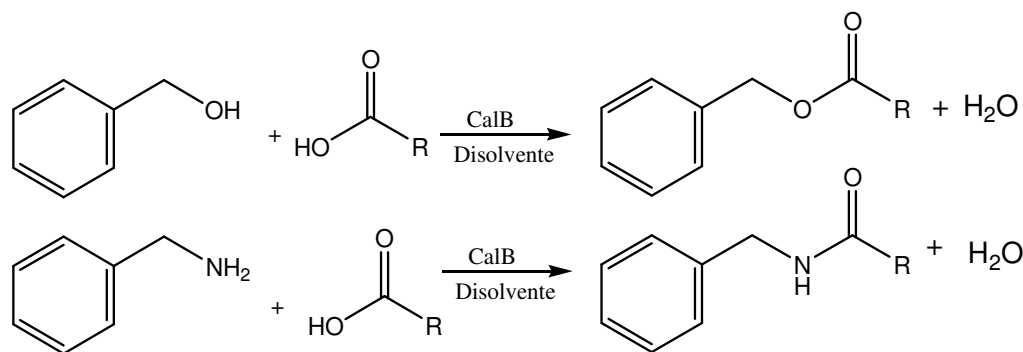
sustituyendo con Ec. 2 y agrupando los términos  $\gamma_i$  y  $X_i$ :

$$K_{eq(a)} = K_{eq(\gamma X)} = \frac{\gamma_{éster} * \gamma_{agua}}{\gamma_{alcohol} * \gamma_{ácido}} * \frac{X_{éster} * X_{agua}}{X_{alcohol} * X_{ácido}} \quad \text{Ec. 5}$$

Es importante considerar que la constante de equilibrio es independiente del medio de reacción y que los coeficientes de actividad de las especies reactivas son función directa de las interacciones y compatibilidad con el disolvente. Así, un aumento o disminución en estos coeficientes  $\gamma_i$  es posible mediante el diseño apropiado del medio de reacción. De la misma forma, para evitar la acumulación de una especie indeseada, se requiere de un disolvente poco afín a dicha especie, lo que conlleva a un aumento en su coeficiente de actividad y una consecuente disminución en los valores de sus fracciones molares  $X_i$  (Bellot J.C., et al., 2001). En este contexto, contar con el valor de los coeficientes de actividad es de gran ayuda para la predicción y manipulación de la quimioselectividad en los sistemas enzimáticos.



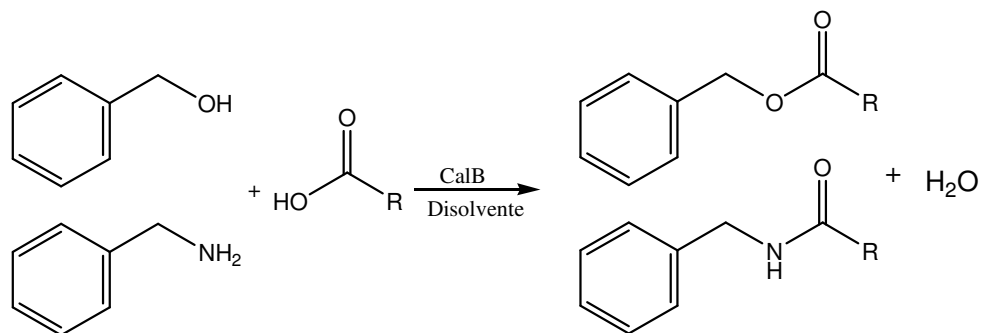
Existen abundantes reportes que consideran el estudio de las reacciones enzimáticas de amidación y esterificación con moléculas monofuncionales de manera independiente, es decir acilación de hidroxilos y de aminas en reacciones separadas (similares a las descritas en la figura 12).



**Figura 12.** Reacción de acilación catalizada por CalB sobre un alcohol y una amina primarios en sistemas de reacción separados a 45°C.

Sin embargo, pocos de ellos han descrito con detalle el diseño de un medio de reacción favorable para cada una de ellas. En este sentido se ha reportado que un medio propicio para la acumulación de compuestos polares tales como las amidas fue un disolvente también con características polares, como el 2-metil-2-butanol (2M2B). Por el contrario, la acumulación de ésteres o moléculas hidrofóbicas fue favorecida en disolventes de naturaleza apolar tal como el *n*-hexano (Torres Gavilán A., 2009). Considerando esta información, se efectuó la síntesis de amidas y ésteres en sistemas de reacción comunes, utilizando como modelo para establecer la quimioselectividad, mezclas de moléculas monofuncionales alcoholes y aminas con estructura molecular similar, tal como se muestra en la figura 13. Para estas reacciones, se observó que la quimioselectividad del sistema muestra un perfil similar al encontrado en los diferentes disolventes utilizados en reacciones independientes. Así mismo, estos resultados además de realizarse experimentalmente, fueron descritos previamente a través de los cálculos teóricos de  $\gamma_i$ . Los resultados sugirieron que la quimioselectividad era controlada termodinámicamente determinada por la naturaleza del medio de reacción. Por lo tanto, se demostró, que efectivamente en disolventes hidrofílicos como el 2M2B la amida presentada en la figura 13 tiene valores de  $\gamma_i$  menores que el del éster y en consecuencia las amidas se acumulan en mayor proporción que los ésteres. Por el contrario, en disolventes hidrofóbicos como el *n*-hexano los valores de  $\gamma_i$  de los ésteres son menores que los de las amidas y por ello, el equilibrio está favorecido hacia la acumulación preferencial de ésteres. Sin embargo, dado que en todos los casos las reacciones se

realizaron con moléculas monofuncionales, la quimioselectividad de los procesos sólo se pudo establecer de manera aparente (Torres Gavilán A., 2009; Castillo E. et al., 2003).



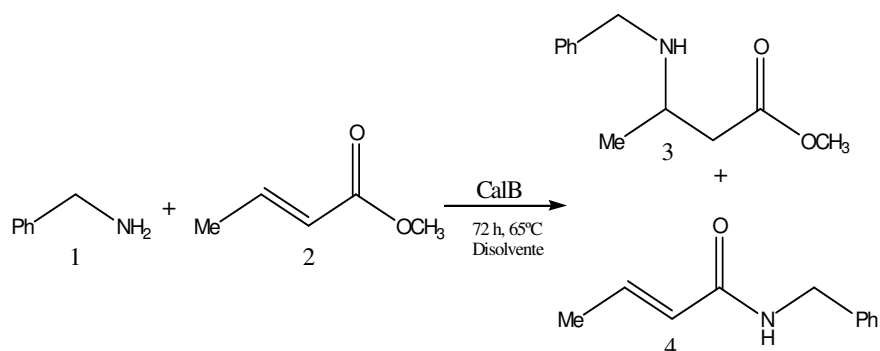
**Figura 13.** Reacción de acilación catalizada por CalB con una mezcla de alcohol y amina primarios en el mismo sistema a 45°C.

De manera empírica, se puede considerar que la quimioselectividad para la formación de amidas catalizada por lipasas, se favorece en medios de reacción de naturaleza polar (2M2B). Además que la acumulación selectiva de ésteres se favorece en disolventes apolares (*n*-hexano). Sin embargo, es importante establecer que este comportamiento está lejos de ser una regla general. En efecto, el tipo de enlace (amida o éster) en muchas ocasiones no es suficiente para clasificar la naturaleza hidrofílica o hidrofóbica de las moléculas y que para ello deben tomarse en cuenta todas las características estructurales de la especie. Si bien hasta ahora se ha expresado que las amidas por su tipo de enlace pueden considerarse como moléculas de naturaleza hidrofílica, existen amidas que por su estructura adquieren características hidrofóbicas (por ejemplo amidas poliaromáticas o con cadenas alifáticas con alto contenido de carbonos). Así mismo, se pueden encontrar ésteres que, pese al tipo de enlace, sean de naturaleza hidrofílica (Torres Gavilán A., 2009).

Para establecer una quimioselectividad enzimática efectiva, usar compuestos bifuncionales como los amino-alcoholes es de gran utilidad, ya que son moléculas modelo de importancia que integran dos grupos nucleofílicos usuales en compuestos comerciales y que compiten por reaccionar en los procesos de síntesis. En particular, el uso de moléculas tales como el 6-amino-1-hexanol puede resultar adecuado para este fin, ya que por el número de carbonos que separan a los grupos funcionales alcohol y amina no presenta problemas de acil migración por ataque nucleofílico del grupo amina sobre el carbonilo del éster formado durante una O-acilación (Baldwing J.E., 1976; Chinsky N., 1988).

Estudios recientes describen a la IMR como una estrategia efectiva no solo para dirigir la quimioselectividad en reacciones con amino-alcoholes. En la literatura se muestra

que es posible la síntesis enzimática quimioselectiva de producto de adición tipo Michael y del producto de aminólisis para un sistema bencilamina (**1**) y crotonato de metilo (**2**), tal y como se muestra en la figura 14 (J. Priego et al., 2009).



**Figura 14.** Adición de bencilamina (1) a crotonato de metilo (2) catalizada por CalB en medio orgánico produciendo aducto de Michael (3) o amida (4).

En este trabajo se establece que en base a la polaridad del medio de reacción la acumulación del aducto de Michael (**3**) se ve favorecida en medios más hidrofóbicos (*n*-hexano) con rendimientos superiores al 90%. Por lo contrario, la formación de amida (**4**) fue favorecida en más del 80% en medios más polares (2M2B).

#### 2.4.4 Modelo de predicción COSMO-RS

Un conocimiento fiable de las propiedades termodinámicas de un sistema es un requisito indispensable para el diseño y optimización de diferentes procesos, incluyendo el control de la selectividad de procesos enzimáticos. Los procesos de separación físico-química, en las industrias farmacéuticas, petroleras, de alimentos, de procesamiento de gas, así como en el área de síntesis orgánica y biotecnología entre otras, son ejemplo de las áreas en donde es indispensable el conocimiento de las propiedades termodinámicas de un sistema. Durante el desarrollo de dichos procesos, los métodos capaces de predecir parámetros termodinámicos tales como los coeficientes de actividad de especies químicas, son herramientas muy valiosas para la estimación de las propiedades requeridas en una mezcla de componentes (Grensemann H., 2005).

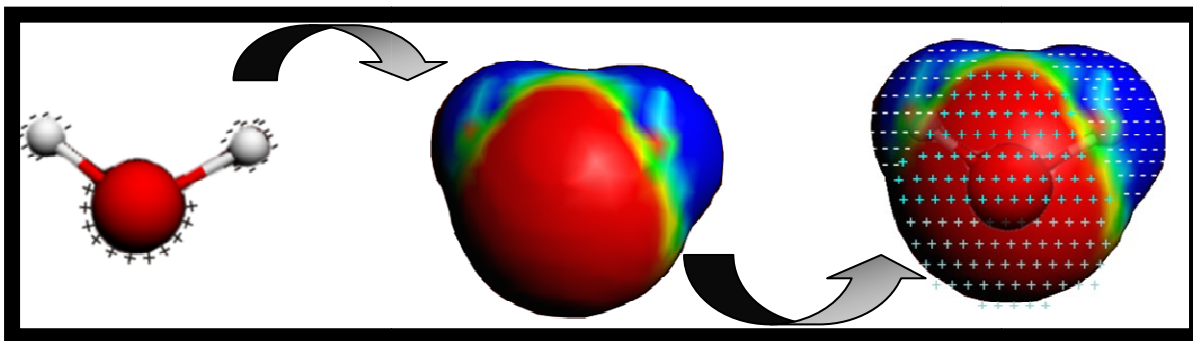
Los modelos predictivos más utilizados y exitosos son los métodos de “contribución de grupos” como UNIFAC (UNiversal Functional group Activity Coefficients) y su variante más popular, el modelo modificado “UNIFAC (Dortmund)” (Putnam R., 2003). Este método es un sistema semi-empírico, para la estimación de la actividad en mezclas no ideales. Sus fundamentos se basan en que una propiedad física de un fluido es la suma

de las contribuciones de los grupos funcionales de las moléculas que lo integran. Sin embargo, cabe señalar que aunque existan un gran número de moléculas compuestas por un gran número de átomos, sus efectos están constituidos por la combinación de un número reducido de grupos funcionales (**Fredenslund et al., 1975**). Así, con este reducido número de grupos funcionales, se puede formar un gran número de moléculas y predecir parámetros de equilibrio de fases en diversos sistemas multicomponentes utilizando solo las funciones químicas de las especies de interés.

UNIFAC ha sido empleado para el cálculo de equilibrio líquido-vapor, equilibrio líquido-líquido, sólido-líquido, además soluciones poliméricas, presiones de vapor de componentes puros, entalpías de exceso, azeótropos de mezclas y otras propiedades. Sin embargo, aún con sus modificaciones en base a datos experimentales, este método continua presentando deficiencias para la predicción de  $\gamma_i$  en mezclas muy alejadas de la idealidad y regularmente es poco preciso en situaciones con nuevas clases de componentes químicos (**Rarey J. et al., 2007**). Posiblemente esta limitación se debe a la implicación que presenta la reducción de las interacciones globales intermoleculares a sólo sus grupos funcionales.

En años recientes, la teoría conocida como “**Conductor-like Screening Model for Realistic Solvents**” (COSMO-RS), basado en química cuántica y termodinámica estadística, ha sido reportado como un modelo predictivo más confiable con respecto a los métodos empíricos (UNIFAC y NRTL). Este modelo ha sido extendido a resolver una amplia gama de problemas, por ejemplo la predicción de propiedades termodinámicas como energías de exceso (Gibbs), presiones de vapor, coeficientes de partición, equilibrios entre fases, entre muchas otras, incluyendo el cálculo de los coeficientes de actividad de especies químicas en mezclas alejadas de la idealidad. El uso de esta teoría brinda mayor precisión en el cálculo estimativo del potencial químico al tomar en cuenta interacciones no solo entre grupos funcionales sino también interacciones estructurales. Incluso puede ser aplicado a líquidos iónicos, soluciones electrolíticas, polímeros, surfactantes micelares, y más. Así también, es capaz de distinguir isómeros estructurales, enantiómeros e incluso conformeros (**Klamt A. et al., 2010**).

La teoría ha sido descrita en varias publicaciones (**Klamt A. et al., 2001, 2005 y 2010; Hans Gmehlin H. et al., 2005**). De manera general Inicia con la representación de una estructura molecular en dos dimensiones y concluye con el cálculo del potencial químico en la mayoría de los disolventes o mezclas de disolventes. Este modelo parte de un planteamiento que proporciona una estimación del potencial químico simulando la superficie discreta de la especie embebida en un conductor virtual (figura 15). Esta teoría es explicada más a detalle en el anexo 1.



**Figura 15.** Imagen del modelamiento con COSMO-RS. Primero se muestra a la molécula a trabajar (en esta caso agua) con sus respectivas cargas, después el modelo introduce a la molécula con sus cargas embebida en una cavidad de un medio continuo virtual y por último coloca las densidades de carga de apantallamiento (SCD) de la superficie de la cavidad, generadas por las interacciones electrostáticas entre la molécula y el medio.

### 3. Hipótesis y objetivos

#### 3.1 Hipótesis

- Mediante la aplicación de estrategias propias de la Ingeniería del Medio de Reacción (IMR) a procesos enzimáticos de acilación catalizados por lipasas, es posible resolver quimioselectivamente moléculas bifuncionales del tipo amino-alcohol.

#### 3.2 Objetivos

##### 3.2.1 General

- Diseñar condiciones del medio de reacción que permita la resolución quimioselectiva eficiente de amino-alcoholes mediante el uso de lipasas como catalizadores.

##### 3.2.2 Objetivos particulares

- Determinar teóricamente las condiciones propicias y el medio de reacción favorable para la acumulación selectiva del producto amida y/o éster a partir del compuesto bifuncional 6-amino-1-hexanol (6A1H).
- Diseñar el medio de reacción que permita la acumulación selectiva de amida utilizando como sustrato el 6-amino-1-hexanol a través de la IMR.
- Diseñar el medio de reacción que permita la acumulación selectiva de éster utilizando como sustrato el 6-amino-1-hexanol a través de la IMR.
- Establecer los perfiles cinéticos de síntesis de los productos (amida y/o éster), así como establecer la ruta de obtención de los productos de síntesis quimioselectiva.

#### 4. Estrategia experimental

El establecimiento de un proceso de síntesis quimioselectivo se basa en el diseño del medio de reacción. En este sentido, fue necesario establecer las condiciones en las cuales los productos se obtuvieran de manera preferencial. Para esto, se cuantificó cada uno de los productos cuando la reacción llegó al equilibrio y las especies obtenidas en cada sistema se caracterizaron estructuralmente. Al mismo tiempo se establecieron las condiciones en las cuales el proceso presentó la posibilidad de contar con un control cinético, esto es donde las velocidades de reacción pudieran determinar la selectividad del proceso.

Para lograr esto:

1. Se realizó el cálculo de los coeficientes termodinámicos de los productos esperados en los sistemas de reacción, con el fin de elucidar los disolventes más adecuados para la síntesis de la especie de interés. De esta manera se pudo tener información indicativa del tipo de disolvente que favorece la síntesis de un producto al equilibrio. Esta operación se realizó utilizando el modelo COSMO-RS (COSMO/logic GmGH & Co, KG. Leverkusen, Alemania) el cual mediante estimaciones químico-cuánticas es capaz de calcular los coeficientes de actividad termodinámica de cada uno de los componentes de la reacción (sustratos y productos).
2. En base al cálculo efectuado en el paso anterior se eligió el disolvente en el que el producto de interés presentó un coeficiente termodinámico de valor lo más bajo posible, esto con el fin de favorecer su acumulación.
3. Se realizaron las reacciones de acilación sobre moléculas bifuncionales de tipo amino-alcohol en el disolvente elegido. Se hizo un monitoreo de las reacciones tomando muestras a diferentes tiempos de reacción con el fin de observar la velocidad inicial de reacción y se determinó el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio termodinámico del sistema.
4. Se purificaron los productos de reacción, separando a la enzima y al tamiz molecular por centrifugación y la subsecuente purificación de los compuestos por cromatografía Flash. La identificación y caracterización estructural de las especies recuperadas se llevó a cabo por Espectrometría de masas (MS), espectroscopia infrarroja (IR) y por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).
5. Con los productos purificados y mediante análisis HPLC se realizó la cuantificación de los productos de reacción, esto a fin de establecer la quimioselectividad en términos de la velocidad y el equilibrio de las reacciones estudiadas.
6. Se determinó la selectividad de cada sistema de reacción observando al producto que fue favorecido en su acumulación al llegar al equilibrio de la reacción.

## 5. Materiales y métodos

### 5.1 Materiales

El 2-metil-2-butanol (2M2B, 99.7%), el cloroformo (99.99%), *n*-hexano (95%), sulfato de sodio anhidro (99.4%), el bicarbonato de sodio (99.7%), los cristales de yodo (99.9%) y el hidróxido de amonio (28-30%) se obtuvieron de J.T. Baker (Edo. de México, México). El metanol (grado HPLC) se obtuvo de Burdick & Jackson (TECROM, México). El ácido acético glacial (99.94%) se obtuvo de Mallinckrodt AR (Edo. de México, México). El 6-amino-1-hexanol (6A1H, 97%), el ácido oleico (98%), el ácido trifluoroacético (TFA, 98%), la dicitohexilcarbodimida (99%), la 4-dimetilaminopiridina (99.98%), el benciloxicarbonilo (Cbz, 99.9%) y la ninhidrina, se obtuvieron de Sigma Aldrich Chemical (MO, E.U.A). El tamiz molecular (8-12 mesh) se adquirió de Aldrich (WI, E.U.A). La lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym 435), se obtuvo de Novozymes A/C (México). La sílica gel 60 (0.06-0.2) se adquirió de Merck (Alemania). Las placas de sílica gel 60 ALUGRAM SIL G/UV<sub>254</sub> se obtuvieron de Macherey-Nagel (Alemania).

### 5.2 Reacciones enzimáticas

De manera general, todas las reacciones se llevaron a cabo en viales de 7 ml sellados con teflón y agitación magnética controlada en baños de agua a 55°C. Los sustratos de la reacción, amino-alcohol y donador de acilo, fueron adicionados en 5ml de medio de reacción previamente deshidratado con tamiz molecular y se dejaron incubando por 20 min a la temperatura de reacción antes de agregar el biocatalizador. Con el propósito de controlar la actividad de agua cuando fuera necesario durante el proceso, se agregaron 2 pellets de tamiz molecular por mililitro de disolvente. Una vez realizada la incubación, la reacción se inició agregando la enzima CalB a 10mg\*ml<sup>-1</sup>. Cuando fue requerido se monitoreó la reacción tomando muestras a diferentes intervalos de tiempo.

### 5.3 Identificación, purificación y caracterización

Primeramente se identificaron los productos de reacción mediante cromatografía de capa fina (TLC) haciendo un análisis cualitativo del perfil de la reacción. En esta técnica se emplearon dos fases de elución para observar y separar con mejor resolución los productos. Una fase a la que se denominó "F1" a base de metanol (70%), *n*-hexano (29%) e hidróxido de amonio (1%) y la segunda ("F2") compuesta por cloroformo (95%), ácido



acético (0.5%) y metanol (4.5%). La elución fue ascendente y unidimensional. Como fase estacionaria se utilizaron placas de sílica gel 60 de 0.25mm de espesor ALUGRAM SIL G/UV<sub>254</sub>. Una vez efectuada la elución, los compuestos con aminos libres se revelaron por aspersion con ninhidrina al 5% en metanol y los compuestos restantes con vapores de yodo y/o aspersion de ácido sulfúrico diluido.

Para la purificación, se procedió a separar la enzima y el tamiz molecular por filtración al vacío, proseguida de la evaporación del disolvente en un rota-vapor Büchi modelo R-114, de Büchi Labortechnik (Suiza)(85°C, 100 rpm, -60 Pa). Una vez evaporado el disolvente, los residuos fueron resuspendidos en la fase de elución en el mínimo volumen posible, para posteriormente ser separados y aislados por cromatografía flash. Esta se realizó empacando una columna de cristal de 1cm de diámetro con una masa de sílica correspondiente a 30 veces la masa en gramos de los sustratos de la reacción. La elución se llevó a cabo con un flujo de 2ml\*min<sup>-1</sup>, utilizando las fases "F1" y/o "F2" de manera isocrática y recolectando fracciones de 2ml en tubos de ensaye. Las fracciones se analizaron nuevamente por TLC, se identificaron las que contenían compuestos puros y se concentraron para obtener los productos aislados y así poder utilizarlos como estándares.

Los compuestos recuperados en la purificación fueron analizados, identificados y caracterizados por espectroscopia <sup>1</sup>H RMN y <sup>13</sup>C RMN en CDCl<sub>3</sub> a 200 MHz, en un equipo Varian Gemini-200 de Varian, Inc. (E.U.A); por espectroscopia infrarroja (IR), en un equipo Spectrum 100 Series FT-IR de PerkinElmer Inc. (E.U.A); y por espectrometría de masas (MS) FAB+, en un equipo Jeol JMS 102A de Jeol Ltd. (Japón).

#### **5.4 Cuantificación**

En todos los procesos, cada reacción fue monitoreada tomando muestras a diferentes tiempos de reacción. Dichas muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos para separar el tamiz molecular y la enzima, posteriormente se diluyeron 4:1 para su posterior cuantificación. Este proceso se llevó a cabo utilizando un equipo HPLC Dionex, modelo Ultimate U3000, de Dionex Corporation (parte de "Thermo Fisher Scientific, E.U.A) y con un detector de arreglo de diodos del mismo equipo a 210 nm. La separación de los compuestos se realizó con una columna Altima Amida C18 (125x2.1 mm) de Altech (E.U.A). Después de probar diferentes fases de elución, la fase móvil utilizada en la cuantificación de las reacciones efectuadas con sustratos monofuncionales, consistió en una mezcla metanol/agua/TFA con una composición en porcentaje inicial de 90/10/0.1 respectivamente, a flujo de 0.2 ml\*min<sup>-1</sup>, de manera isocrática y a temperatura ambiente. Específicamente para las reacciones con el sustrato bifuncional, después de equilibrar la

columna a las condiciones anteriores, se aplicó un gradiente para alcanzar una concentración de metanol/TFA (100/0.1) después de 5 minutos. Esta concentración se mantuvo por 15 minutos seguido de un progresivo descenso hasta alcanzar las condiciones iniciales en un tiempo total de elución por muestra de 30 minutos. Para la identificación y cuantificación de las señales cromatográficas encontradas, se utilizaron estándares de los sustratos y productos purificados.

## 5.5 Cálculos de coeficientes de actividad COSMO-RS

Los valores de los coeficientes de actividad de los diferentes compuestos empleados en este trabajo se elucidaron bajo la teoría descrita en la sección 2.4.4. Primeramente, las estructuras moleculares de los compuestos, incluidos los disolventes, se esquematizaron como estructuras de dos dimensiones y subsecuentemente se transformaron en geometrías de 3 dimensiones mediante el software Marvin 5.4.0.1 (ChemAxon <http://www.chemaxon.com/>). Con este programa también se calcularon 20 confórmeros para cada estructura con diferencias energéticas menores a  $1.5\text{kcal mol}^{-1}$  entre cada confórmero. Los cálculos COSMO se realizaron con el paquete TURBOMOLE 5.7 a un nivel de teoría de funcionales de la densidad BP (B88-VWN-P86) con un set de valencia triple-z polarizada (TZVP). Todos los cálculos COSMO-RS se llevaron a cabo con el software COSMOthermX-2.1 (COSMO/logic GmGH & Co, KG, Leverkusen, Alemania). La parametrización BP\_TZVP\_C21\_0105 se empleó para obtener una mejor calidad en la predicción.

## 5.6 Síntesis química del O-oleoilaminohexanol

### 5.6.1 Protección del 6-amino-1-hexanol (6A1H)

La protección del amino-alcohol se llevó a cabo utilizando el grupo protector cloruro de benciloxicarbonilo (Cbz) específico para bloquear grupos amino libres. Para realizar la protección se disolvió en un matraz el 6A1H (500mg) con 1.2eq. (molares) de bicarbonato de sodio en 14ml de agua destilada. A esta mezcla se adicionó lentamente a una solución (previamente preparada) de 1.2eq. de Cbz en 1ml de tetrahidrofurano (THF). La mezcla de reacción (15ml) se colocó en un baño de hielo con agitación magnética constante, dejándola reaccionar hasta que el hielo se derritiera por completo y se formara un precipitado blanco indicando el final de la reacción. Posteriormente, la mezcla fue filtrada por vacío y el precipitado se lavó con agua fría abundante. Una vez lavado, el

precipitado se colocó bajo un flujo de aire por 2 horas para ser secado y se resuspendió en diclorometano agregando sulfato de sodio anhidro para absorber el agua residual. Finalmente, la mezcla orgánica fue filtrada nuevamente para retirar la sal quedando como residuo el amino-alcohol protegido (Cbz-6A1H).

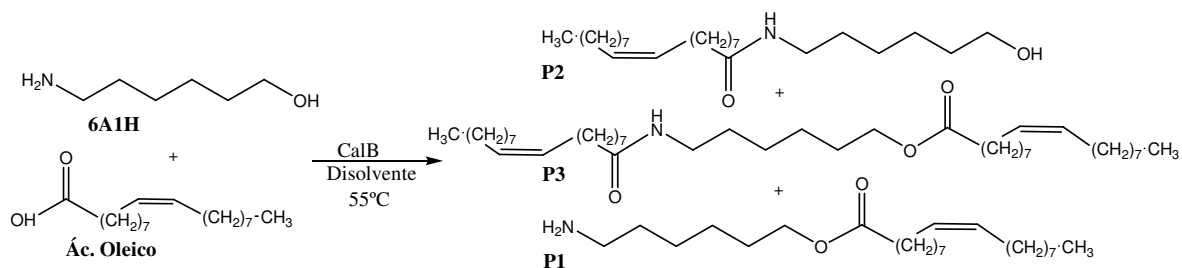
#### 5.6.2 Esterificación y desprotección química del Cbz-6-amino-1-hexanol

Para la esterificación química del amino-alcohol amino-protegido (Cbz-6A1H) se recurrió a la metodología conocida como “esterificación de Steglich” (**Neises B. y Steglich W., 1978**). Primeramente se realizó la activación del ácido carboxílico (100mg de ácido oleico) con 1.1eq. de dicitlohexilcarbodimida (DCC) en un matraz con 10ml de diclorometano en un baño de hielo y con agitación magnética constante. Después de 5 minutos de la activación, se adicionó el alcohol a esterificar (2eq. Cbz-6A1H) seguido de la adición de 4-dimetilaminopiridina (5% molar) de manera consecutiva. La mezcla de reacción se dejó en el hielo y en agitación por 3 horas, tiempo en el cual la reacción termina y el ácido carboxílico se agota. Para confirmar la formación de un producto de esterificación se realizó una TLC con ácido oleico y Cbz-61H como estándares, y con una muestra del crudo de reacción. Una vez verificada la presencia del producto, el éster sintetizado se purificó por cromatografía flash usando la fase F2 y posteriormente se procedió a su desprotección por hidrogenación catalítica utilizando paladio sobre carbono como catalizador (5% en masa). La desprotección fue monitoreada cualitativamente por capa fina revelada con ninhídrina, la cual confirmó la presencia del amino libre en el producto éster. Al terminar la hidrogenación, el producto desprotegido fue purificado también por cromatografía flash utilizando la fase de elución F1.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Acilación enzimática del 6-amino-1-hexanol : Predicciones termodinámicas

El modelo de reacción elegido para estudiar el control de la quimioselectividad en procesos de acilación catalizados por lipasas, fue la reacción entre el 6-amino-1-hexanol (6A1H) y el ácido oleico catalizada por CalB (figura 16). Para la elección de este sistema de reacción se consideró la presencia de dos grupos funcionales con carácter nucleofílico del tipo amina primaria y alcohol primario en una misma molécula. Adicionalmente, se consideró el hecho de que esta molécula no presenta el fenómeno de acil migración, lo cual permite cuantificar de manera diferenciada la incorporación de grupos acilos sobre cada uno de los grupos funcionales presentes. Es importante señalar que en el caso del modelo elegido, existe la posibilidad de acilación del alcohol o de la amina de manera selectiva y además la posibilidad de acilación de ambos grupos de manera indiscriminada. En este sentido, la quimioselectividad en las reacciones estudiadas será evaluada mediante la cuantificación de cada uno de los tres productos posibles: el éster **P1**, la amida **P2**, y el compuesto diacilado amida-éster **P3**.

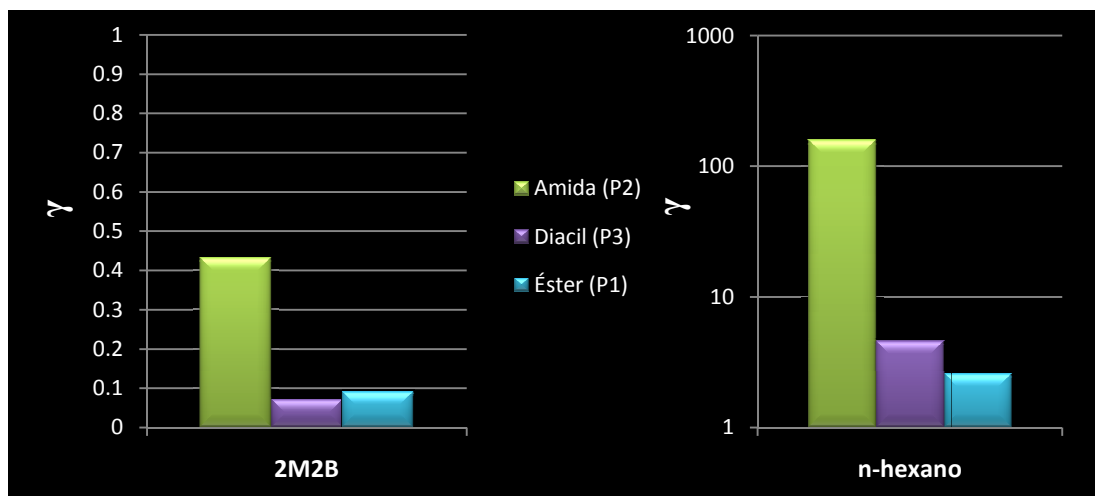


**Figura 16.** Reacción de acilación entre el ácido oleico y el 6-amino-1-hexanol (6A1H) catalizada por CalB a 55°C en medio orgánico, así como los productos posibles de la misma (O-oleoilaminohexanol, **P1**; N-oleoilaminohexanol, **P2**; N,O-dioleoilaminohexanol, **P3**), los cuales generan un molécula de agua por cada ácido consumido.

Previamente se ha discutido que a partir del cálculo del coeficiente de actividad termodinámica ( $\gamma_i$ ) para los productos obtenidos en una reacción se pueden diseñar medios adecuados para su producción quimioselectiva. Estos sistemas han sido estudiados para el caso específico de moléculas monofuncionales del tipo aminas y alcoholes aromáticos. En efecto, a partir de los datos de estos reportes el 2M2B resultó ser un medio de reacción favorable para la acumulación de amidas, mientras que el *n*-hexano resultó propicio para la acumulación de ésteres, ambos hasta llegar al equilibrio de reacción (Torres Gavilán A., 2009). En este trabajo nuestro primer objetivo se centro en hacer extensiva la estrategia del control termodinámico para moléculas bifuncionales de cadena abierta tal como el 6A1H.

Teniendo como objetivo inicial de este trabajo el diseñar un medio de reacción favorable para la acumulación selectiva de los productos monoacilados resultantes de la reacción entre el 6A1H y el ácido oleico catalizada por CalB, se calculó en primera instancia el coeficiente de actividad  $\gamma$  para los productos éster (**P1**) y amida (**P2**) en diferentes medios de reacción. El cálculo de los  $\gamma$  se realizó utilizando el modelo cuántico termodinámico COSMO-RS descrito con detalle en la sección 2.4.4 y en el anexo 1. Adicionalmente, se incluyó en estos cálculos al producto diacilado (**P3**) en la medida de que este producto puede ser resultado de un proceso de acilación total. Entre los medios de reacción evaluados se incluyeron disolventes con diferentes grados de polaridad tales como el *n*-hexano, como medio hidrofóbico, y la piridina, el 2-metil-2-butanol (2M2B), o el o el 2-metil-2-propanol (2M2P) como medios polares. Con el fin de evaluar sistemas más polares que el 2M2P se calcularon los coeficientes  $\gamma$  en mezclas de 2M2P con piridina y con dimetilsulfóxido (DMSO).

Los resultados del cálculo de los coeficientes  $\gamma$  mostraron en primera instancia, que los valores obtenidos en 2M2B para los tres posibles productos **P1**, **P2**, y **P3**, presentan valores similares (0.09, 0.07 y 0.43), prácticamente dentro del mismo orden de magnitud y por abajo de 1. Por el contrario, los valores de  $\gamma$  para estos mismos productos obtenidos en *n*-hexano presentan valores de un orden de magnitud similar para el producto **P1** y el producto **P3** (2.59 y 4.57) y dos órdenes de magnitud superiores para el producto **P2** (159.29). Todos ellos muy por arriba de 1 (figura 17).



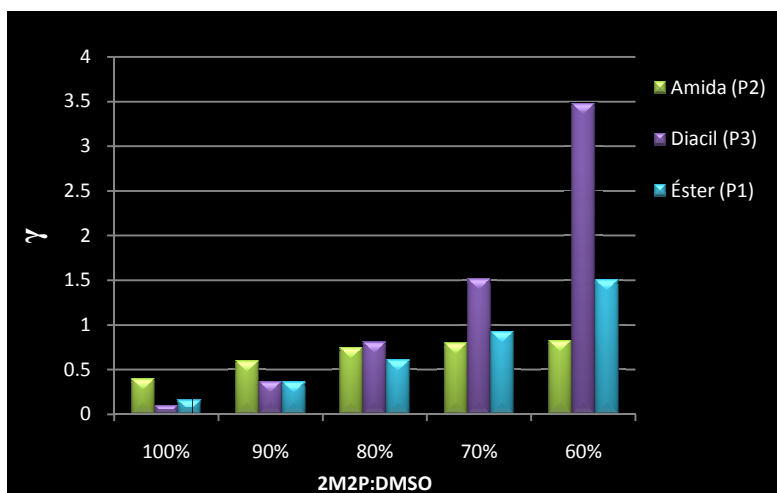
**Figura 17.** Coeficientes de actividad termodinámica ( $\gamma$ ) de los productos de la acilación del 6-amino-1-hexanol con el ácido oleico (éster **P1**, amida **P2** y producto diacilado **P3**) en 2M2B y *n*-hexano estimados a 55 °C y a dilución infinita.

De estos resultados se puede advertir que los valores altos de  $\gamma$  para la amida **P2** implican una menor afinidad de este compuesto por el *n*-hexano y que la afinidad que

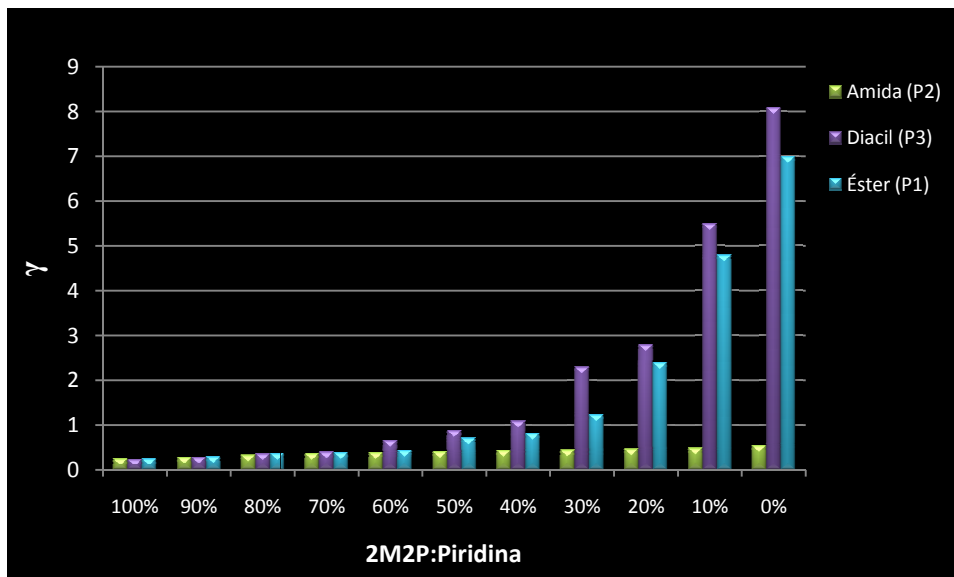
presentan el éster **P1** y el diacilado **P3** es mayor por el mismo disolvente. Así entonces se puede inferir que después de una reacción en este disolvente los productos **P1** y **P3** se pueden acumular mejor que el producto **P2**. En el caso de los valores obtenidos para estos tres compuestos en 2M2B, se infiere que termodinámicamente este disolvente favorecería la acumulación de cualquiera de los tres productos después de una reacción.

En congruencia con los reportes previos, esta primera aproximación mostró que en *n*-hexano se puede tener un proceso quimioselectivo en donde la síntesis del producto polar amida se vería disminuida en favor de la síntesis de los compuestos hidrofóbicos éster y diacilado. Cabe señalar que un proceso aun más selectivo en donde los productos **P1** y **P3** pudieran ser sintetizados de manera exclusiva, tendría que contemplar disolventes en donde sus correspondientes coeficientes  $\gamma$  fueran diferentes entre ellos tanto como lo son con respecto a los valores obtenidos para la amida.

Al explorar los medios de reacción con mayor polaridad que el 2M2B (2M2P adicionado con DMSO y con piridina), se observa que efectivamente en los medios con mayor contenido de disolventes hidrofílicos, los valores de  $\gamma$  para el producto **P2** son cada vez menores con respecto a los valores que se obtienen para los compuestos hidrofóbicos para los productos polares y los hidrofóbicos se alcanza en el medio más polar (piridina 100%), medio en el que podría suponer que la síntesis del producto **P2** se vería favorecida con la consecuente disminución en la síntesis de los compuestos hidrofóbicos **P1** y **P3**.

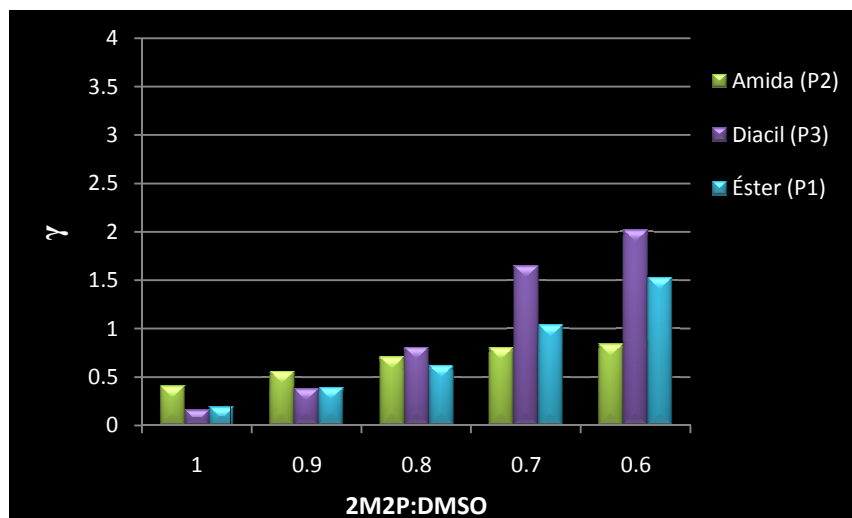


**Figura 18.** Coeficientes de actividad termodinámica ( $\gamma$ ) a dilución infinita de los productos de la acilación del 6-amino-1-hexanol con el ácido oleico (éster P1, amida P2 y producto diacilado P3). Cálculos realizados en 2M2P adicionado con diferentes proporciones de DMSO a 55°C.



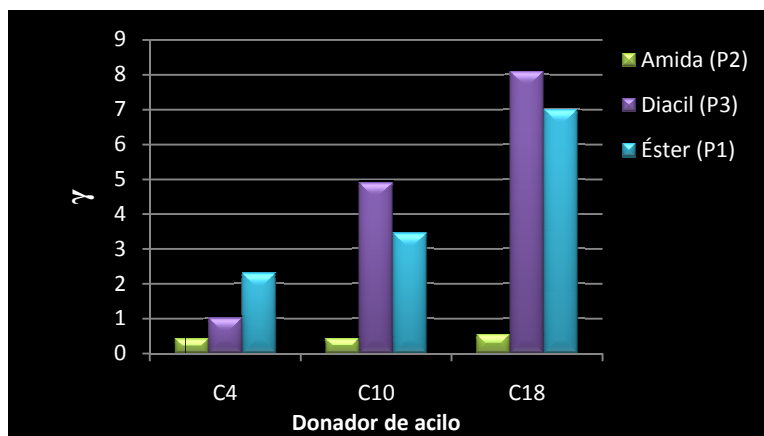
**Figura 19.** Coeficientes de actividad termodinámica ( $\gamma$ ) a dilución infinita de los productos de la acilación del 6-amino-1-hexanol con el ácido oleico (éster P1, amida P2 y producto diacilado P3). Cálculos realizados en 2M2P adicionado con diferentes proporciones de piridina a 55 °C.

Estos resultados permiten confirmar de manera teórica la mayor afinidad del producto polar **P2** por medios polares y una menor afinidad de los compuestos hidrofóbicos **P1** y **P3** en estos medios. Es importante señalar que al realizar los cálculos de  $\gamma$  en el sistema 2M2P:DMSO a una temperatura de 60 °C, los valores de  $\gamma$  se ven en general discretamente disminuidos con respecto al sistema evaluado a 55 °C, comportamiento que resultaría coherente con un aumento generalizado en la afinidad de los compuestos con el medio de reacción. Es decir, una mayor solubilidad de todos los componentes del sistema en el medio de reacción por efecto de la temperatura (figura 20).



**Figura 20.** Coeficientes de actividad termodinámica ( $\gamma$ ) a dilución infinita de los productos de la acilación del 6-amino-1-hexanol con el ácido oleico (éster P1, amida P2 y producto diacilado P3). Cálculos realizados en 2M2P adicionado con diferentes proporciones de DMSO a 60 °C.

Con el fin de aportar elementos adicionales que confirmen la influencia de los componentes estructurales de los productos **P1**, **P2** y **P3** sobre los valores de  $\gamma$  se realizaron cálculos modificando la naturaleza hidrofóbica de las moléculas mediante la modificación en la longitud del residuo acilo. Como se muestra en la figura 21 al convertir a los productos en moléculas mas polares mediante la disminución de la longitud del residuo acilo, los valores de  $\gamma$  en 100% piridina disminuyen progresivamente hasta alcanzar los valores más bajos para las moléculas menos hidrofóbicas con el residuo C4.



**Figura 21.** Coeficientes de actividad termodinámica ( $\gamma$ ) a dilución infinita de los productos de la acilación del 6-amino-1-hexanol con el ácido oleico (éster P1, amida P2 y producto diacilado P3.). Cálculos realizados en 100% piridina ambos a 55 °C.



De manera general, el diseño de un medio de reacción que conduzca adecuadamente a procesos enzimáticos selectivos, consiste en un barrido de diferentes sistemas de reacción. Bajo la estrategia presentada en este trabajo, el parámetro principal de evaluación de los diferentes sistemas ha sido el cálculo de los coeficientes  $\gamma$  para los productos en diferentes medios de reacción. El análisis de estos cálculos resultó congruente con las observaciones previamente reportadas, en donde en medios de reacción hidrofóbicos los valores de los coeficientes  $\gamma$  son menores para los productos hidrofóbicos y por lo tanto se presume una acumulación preferencial en dichos medios. Por el contrario, en medios polares los valores de los coeficientes  $\gamma$  resultaron menores para los compuestos polares, resultando estos sistemas más favorables para su acumulación. Si bien esta estrategia puede arrojar información importante en términos de la predicción del medio más favorable para establecer una síntesis quimioselectiva para el sistema de reacción entre el 6A1H y el ácido oleico catalizada por CalB, la confianza en los resultados demanda una confirmación experimental.

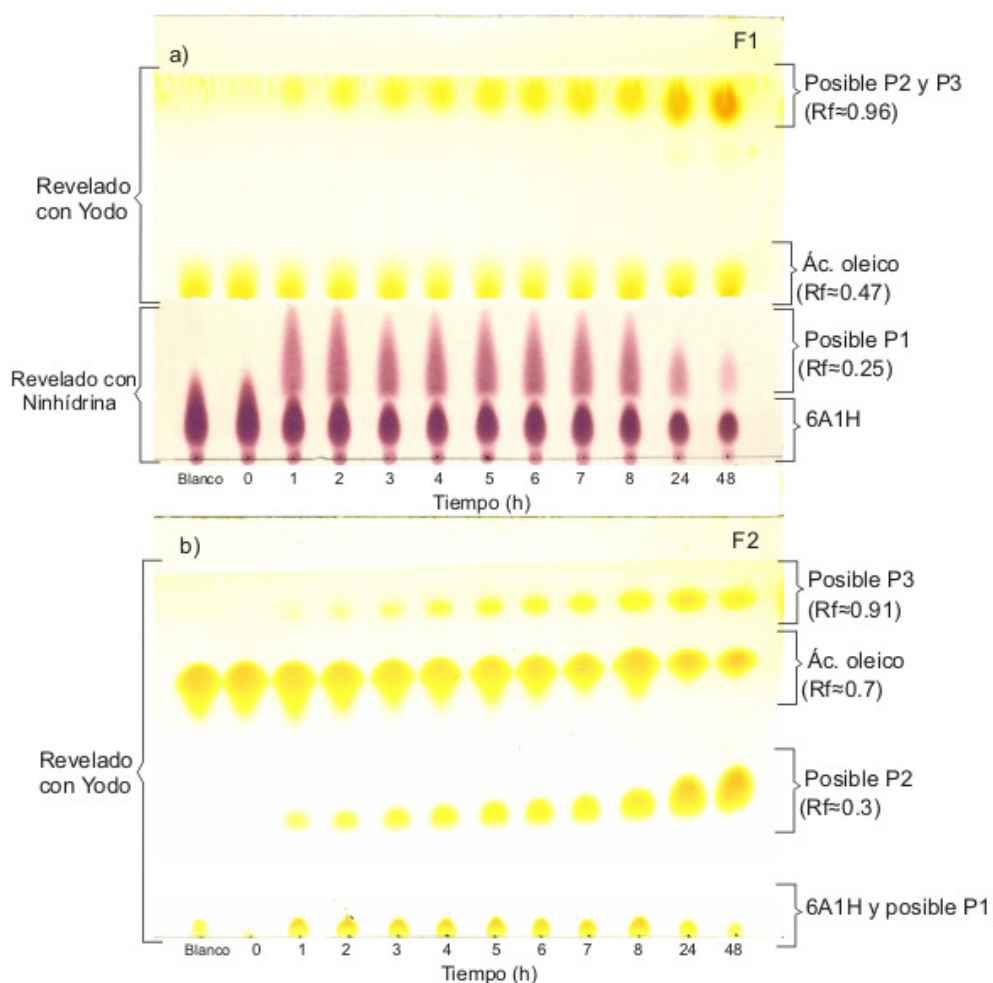
## 6.2 Acilación enzimática del 6-amino-1-hexanol: Evaluación experimental

Es importante señalar que el diseño de un medio de reacción utilizando una estrategia termodinámica que permita una estimación confiable de los coeficientes  $\gamma$  de los productos de una reacción enzimática, debe conducir a la disminución significativa del número de evaluaciones experimentales. De la sección anterior se concluye que para la acumulación de productos hidrofóbicos (i.e. **P1** y **P3**) el hexano puede resultar un disolvente adecuado. Sin embargo, en el caso de la síntesis de productos polares (i.e. **P2**) la estimación de los coeficientes  $\gamma$  en diferentes medios de reacción hizo suponer que disolventes como el 2M2B y el 2M2P o mezclas de estos en presencia de DMSO (>30%) y piridina (100%) podrían ser los más indicados. Para la evaluación experimental de la reacción entre el 6A1H y el ácido oleico catalizada por CalB se decidió evaluar al *n*-hexano como medio de reacción para la síntesis quimioselectiva de los productos hidrofóbicos **P1** y **P3** y al 2M2B para la síntesis quimioselectiva de la amida **P2**. Si bien los sistemas 2M2P adicionado con DMSO o el sistema 100% piridina arrojaron los valores más contrastantes de el coeficiente  $\gamma$  para el producto **P2** en relación con los productos **P1** y **P3**, estos no fueron evaluados debido a que un número importante de reportes mencionan que concentraciones por arriba de 20% de estos disolventes afectan drásticamente la capacidad catalítica de CalB (Pérez-Victoria I., 2006).

Por lo tanto, la evaluación experimental se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones descritas en la sección 5.2, en donde se establece que para las reacciones en *n*-hexano y 2M2B la relación molar 6A1H:ácido oleico fue de 1:2. Con el fin de mantener una actividad de agua lo más baja posible al inicio del proceso, las reacciones se

preincubaron durante 20 minutos a 55°C en presencia de tamiz molecular. Todas las reacciones se estudiaron por triplicado y se iniciaron al agregar 10mg\*ml<sup>-1</sup> de CalB monitoreándolas a diferentes tiempos de reacción hasta alcanzar el equilibrio. En un primer tiempo el seguimiento de las reacciones fue durante 48 horas. Después de este tiempo, las muestras centrifugadas fueron analizadas cualitativamente por cromatografía de capa fina (TLC). Para observar y separar con mejor resolución los productos de reacción se utilizaron dos fases de elución (F1 y F2) descritas en el apartado 5.3.

El análisis por TLC de la reacción entre el 6A1H y el ácido oleico catalizada por CalB en 2M2B, utilizando la fase F1 (metanol:*n*-hexano:NH<sub>4</sub>OH; 70:29:1) como fase de elución se presenta en la figura 22a. En esta figura se observa que en el blanco de reacción (reacción sin enzima) y el tiempo inicial de la reacción solo aparecen los sustratos ácido oleico (Rf≈0.47 reveló con yodo) y el amino-alcohol (Rf≈0.1 reveló con ninhídrica). Se presenta además un sistema de separación alternativa utilizando una fase menos polar F2 (cloroformo:metanol:ácido acético; 95:4.5:0.5 v/v) como fase de elución (figura 22b), en donde se confirma que en el blanco de reacción y el tiempo inicial de la reacción solo aparecen los sustratos ácido oleico (Rf≈0.7) y el 6A1H (Rf≈0.03).



**Figura 22.** Placas TLC que muestran el perfil de sustratos y productos de la reacción entre el 6-amino-1-hexanol (6A1H) y el ácido oleico catalizada por CalB en 2M2B. Se utilizaron dos fases de elución distinta para cada placa. a) fase de elución F1 y b) fase de elución F2.

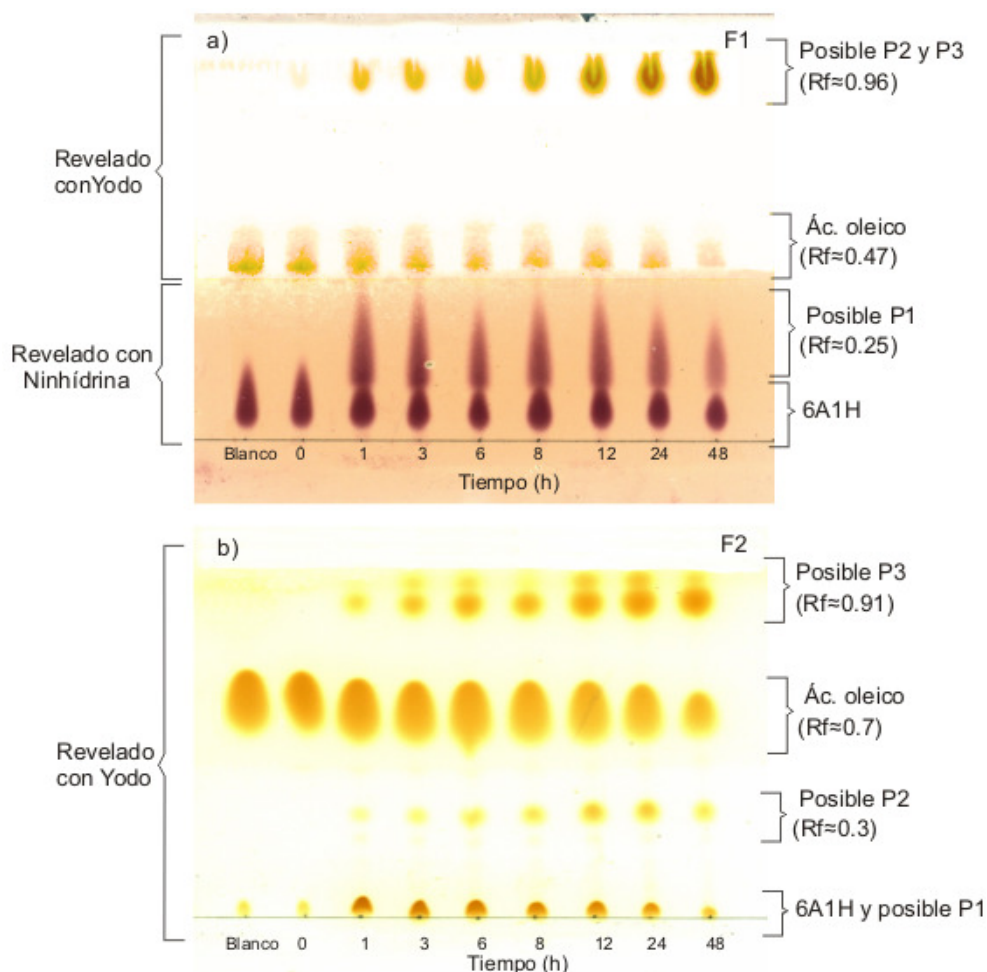
En términos de los productos obtenidos después de la reacción en 2M2B, al revelar la TLC con ninhidrina se identifica a un primer producto ( $R_f \approx 0.25$ , en figura 22), señal que pone en evidencia que este producto presenta un grupo amino libre (de manera similar al sustrato 6A1H). Este primer producto se propone como el producto éster **P1** debido a que se trata del único producto de acilación que tendría un grupo amino libre. En la misma placa (figura 22a) se observa la aparición de un segundo producto, a partir de la primera hora de reacción ( $R_f \approx 0.96$ ). Así mismo, se alcanza a apreciar que a partir de las 8 horas del proceso, aparece otro compuesto con el mismo valor de  $R_f$  ya que la marca se torna más oscura, ambos compuestos revelan sólo con yodo. Al utilizar la fase F2, y al tratarse de una fase poco polar, los compuestos que revelan con ninhidrina (**P1** y 6A1H) quedan en el punto de aplicación por la fuerte interacción del grupo amino libre con la sílica, y los otros dos productos son separados y solo revelan con yodo, es decir no contienen grupos amino

libres (figura 22a). El producto menos polar ( $R_f \approx 0.91$ ) se propone como el producto diacilado y el más polar ( $R_f \approx 0.3$ ) se propone como el producto amida.

Hasta este punto del análisis de la reacción efectuada en 2M2B podemos observar de manera cualitativa, la conversión concomitante del ácido oleico en productos éster (**P1**), amida (**P2**) y diacilado (**P3**). Si bien, el análisis de las placas de TLC no da una idea precisa de las proporciones de estos compuestos, si nos permite observar que durante el proceso, la síntesis del éster alcanza un máximo de producción a las 2 horas y posteriormente una disminución significativa al final del proceso. De hecho, después de 48 horas de reacción el producto mayoritario es el producto amida, mientras que los productos éster y diacilado se acumulan en menor proporción.

Las reacciones de acilación efectuadas en *n*-hexano, al igual que las reacciones en 2M2B, mostraron la conversión del ácido oleico en productos éster **P1**, amida **P2** y diacilado **P3** (figura 23a y b). Sin embargo, al analizar las placas TLC con los mismos sistemas de elución F1 y F2 y en tiempos de reacción equivalentes, se observa que, contrario al sistema 2M2B, al final del proceso los productos hidrofóbicos **P1** y **P3** se acumulan de manera preferencial (figura 23a y figura 23b). Evidentemente, en tiempos similares de reacción la acumulación de la amida es significativamente menor (figura 23b).

En términos generales, los resultados obtenidos de estas reacciones muestran total coherencia con la predicción hecha a partir de los cálculos teóricos de los coeficientes y reportados en la sección previa. Sin embargo para corroborar esta apreciación fue preciso confirmar la naturaleza química de los productos obtenidos y obtenerlos en cantidad y pureza suficiente para poder cuantificarlos. Para esto fue necesario desarrollar las metodologías apropiadas para la producción de dichos compuestos a escala de miligramos (20-100 mg).



**Figura 23.** Placas TLC que muestran el perfil de sustratos y productos de la reacción entre el 6-amino-1-hexanol (6A1H) y el ácido oleico catalizada por CalB en *n*-hexano. Se utilizaron dos fases de elución distinta para cada placa. a) fase de elución F1 y b) fase de elución F2.

### 6.3 Purificación y caracterización de los productos de la acilación enzimática del 6-amino-1-hexanol

#### 6.3.1 Recuperación y purificación de los compuestos

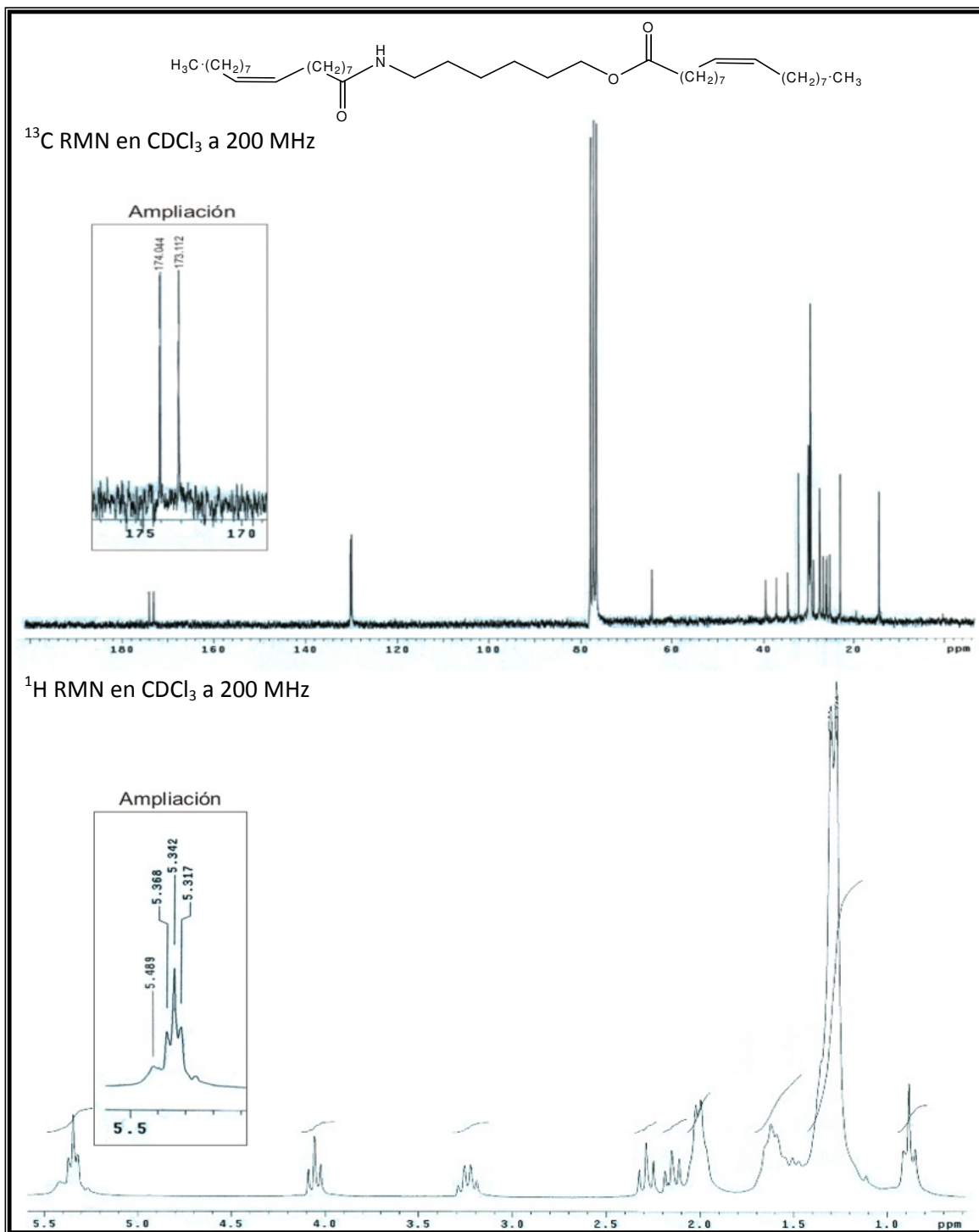
La recuperación y purificación de los productos **P2** y **P3**, se inició a partir de las mezclas de reacción obtenidas en la acilación enzimática del 6-amino-1-hexanol. Para este proceso se partió de las mezclas obtenidas en los sistemas *n*-hexano y 2M2B después de 48 horas de reacción. Primeramente, se procedió a separar la enzima y el tamiz molecular, proseguida de la evaporación del disolvente. Una vez evaporado el disolvente, los residuos fueron resuspendidos en la fase de elución F1 en el mínimo volumen posible, para

posteriormente ser separados y aislados por cromatografía flash. Considerando que el valor de Rf asignado a estos compuestos en la capa fina ( $R_f \approx 0.96$ ), se trató de realizar la separación usando la fase móvil F1 como eluyente en la columna. Desafortunadamente esta separación no fue lograda ya que los productos asignados como producto **P2** y **P3** eluyeron en gran parte de manera conjunta con el donador de acilo pese a su diferencia en su valor de Rf observados en la placa TLC. Debido a esto, se evaluó la fase F2 como nueva fase móvil lográndose aislar en este sistema a los productos asignados como amida **P2** y diacilado **P3**.

Para la purificación del producto identificado como posible éster **P1** ( $R_f \approx 0.25$  en F1), se utilizó el crudo de *n*-hexano a las 2 horas de reacción y se planteó el mismo procedimiento que para el sistema 2M2B, sin embargo, debido a la similitud de su valor de Rf con el valor de Rf para el ácido oleico, se prefirió neutralizar el ácido y extraerlo en un sistema de dos fases, previo a la separación en la columna flash. Para efectuar esto, se resuspendieron en diclorometano los residuos de la reacción y se realizaron extracciones con una solución acuosa de hidróxido de sodio a pH 12 hasta dejar de observar turbidez en las fases (agua-disolvente). Ya neutralizado el ácido, se separó la fase orgánica por decantación y fue deshidratada utilizando sulfato de sodio anhidro. La sal insoluble del ácido oleico fue separada por filtración al vacío y posteriormente el disolvente fue evaporado con una corriente de aire. Se realizó la cromatografía flash con el residuo obtenido y se logró la recuperación del producto correspondiente al asignado como éster **P1** (aproximadamente 20 mg). Ya aislados los 3 productos de reacción se procedió a su caracterización química por diferentes métodos analíticos.

### 6.3.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La estructura química de los productos acilados purificados **P1**, **P2** y **P3** fue determinada por espectroscopia  $^1\text{H}$  RMN y  $^{13}\text{C}$  RMN en  $\text{CDCl}_3$  a 200 MHz. En primer lugar, los espectros generados para el compuesto **P3** son presentados en la figura 24, a partir de los cuales se confirmó la estructura del producto diacilado. Es importante señalar que para la asignación de la estructura del producto **P3** fue crucial la identificación de las señales características de la cadena hidrocarbonada en campo alto y la insaturación de estas cadenas en campo bajo. Además, las señales diferenciadas del carbonilo amida y del carbonilo éster, a las cuales de acuerdo a reportes previos, se les asignaron las señales en el espectro de  $^{13}\text{C}$  de 173.112 y a 174.044 ppm respectivamente. A partir de estos datos, la identificación de los compuestos amida **P2** y éster **P1** fueron establecidas (ver detalle de la elucidación estructural en el anexo 2).



**Figura 24.** Espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) del compuesto correspondiente al producto diacilado P3 en la fase de elución F2 observado en la cromatografía por capa fina. De manera más sobresaliente, en el <sup>13</sup>C se observa claramente el desplazamiento de dos grupos carbonilo, uno a 173.235 correspondiente al grupo amida y otro a 174.044 ppm correspondiente al grupo éster de este compuesto. Así mismo en el <sup>1</sup>H se ve la señal abultada de un hidrógeno a 5.489 ppm, señal característica del -NH- del grupo amida.

Bajo esta referencia, y apoyados en los espectros correspondientes, se confirmó la estructura del producto amida **P2** y del éster **P3**. Así, las señales comunes de las cadenas hidrocarbonadas en el éster y la amida son identificadas al mismo tiempo que la de los carbonilos diferenciados para cada compuesto. En la sección de anexos se reporta el detalle de la caracterización estructural, así como los espectros de resonancia correspondientes para cada compuesto.

### 6.3.3 Espectroscopía Infrarroja (IR)

Para tener una mayor certeza en los resultados obtenidos en las resonancias, se efectuó un análisis por espectroscopia infrarroja (anexo 2). En el espectro obtenido del producto **P3**, se detectó la presencia de un grupo amida y de un grupo éster, identificados por la presencia de dos señales una a  $1634\text{ cm}^{-1}$  (amida) y otra a  $1725\text{ cm}^{-1}$  (éster), ambas de intensidad muy similar. Con respecto al espectro IR de del producto **P2** se identificó una señal muy clara a  $1634\text{ cm}^{-1}$  ratificándolo como producto amida.

### 6.3.4 Espectrometría de Masas

Se realizó un análisis de espectrometría de masas a los productos aislados **P3** y **P2**. El análisis de ambos compuestos se efectuó por separado utilizando la técnica FAB+ arrojando como resultados un ion másico de  $m/z=645\text{ gmol}^{-1}$  para el diacilado y una  $m/z=382\text{ gmol}^{-1}$  para la amida (anexo 2). Las relaciones masa carga obtenidas correlacionan de manera correcta con los pesos moleculares de los productos de reacción ahora confirmados.

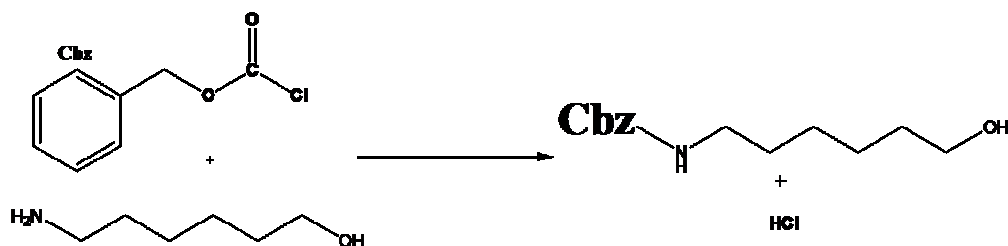
Es importante señalar que, además de haber elucidado la estructura de los productos obtenidos en la reacción de acilación entre el 6-aminohexanol y el ácido oleico catalizada por CalB, la suma de las evidencias estructurales aquí presentadas confirman que en los sistemas *n*-hexano y 2M2B si es posible la síntesis y acumulación de la amida **P2**, incluso, en el sistema 2M2B es posible acumularla de manera selectiva. Estos resultados contrastan fuertemente con lo reportado previamente para un sistema de reacción similar, en donde en todas las reacciones estudiadas se descarta la presencia del compuesto amida (Husson E. et al., 2008).



### 6.3.5 Síntesis química producto éster (P1)

Un elemento adicional que contribuyó a confirmar la identidad estructural del compuesto **P1**, fue la comparación de los resultados espectroscópicos del producto **P1** obtenido por síntesis enzimática con la caracterización estructural del compuesto obtenido por síntesis química. Cabe mencionar que esta estrategia no se puede establecer con la síntesis química del compuesto **P2**, ya que no es posible acilar químicamente el extremo amino del 6-amino-1-hexanol, sin la obligada protección de su extremo alcohol. En efecto, debido a la complejidad en la protección del grupo alcohol de esta molécula, la acilación enzimática del sustrato 6-amino-1-hexanol (6A1H) queda como una alternativa adecuada de síntesis selectiva.

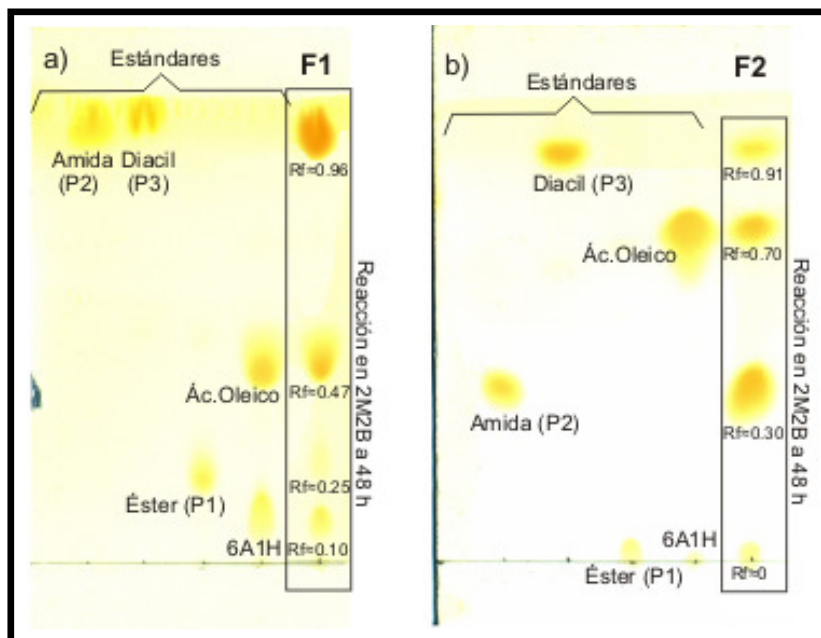
Para la síntesis química del éster se siguió la metodología detallada en la sección de 5.6. de materiales y métodos. Se utilizó al 6-amino-1-hexanol con el grupo amino protegido con cloruro de benciloxicarbonilo (Cbz) y el ácido oleico como donador de acilo, (figura 25). Al finalizar la reacción el éster sintetizado se purificó por cromatografía flash usando la fase F1 y posteriormente se procedió a su desprotección por hidrogenación catalítica utilizando paladio sobre carbono como catalizador. La desprotección fue monitoreada cualitativamente por capa fina revelada con ninhídrina, la cual confirmó la presencia del amino libre en el producto **P1**, así como la ausencia del fenómeno de acil migración. Al terminar la hidrogenación, el producto desprotegido fue purificado por cromatografía flash y fue caracterizado por RMN confirmándolo como Oleoilaminohexanol (**P1**).



**Figura 25.** Reacción de protección para el grupo amino del 6-amino-1-hexanol utilizada para la síntesis química del éster.

Ya contando con los tres productos de la acilación debidamente purificados y caracterizados estructuralmente, se procedió a la construcción de curvas estándar en HPLC y a la cuantificación de las reacciones de síntesis en *n*-hexano y 2M2B. El conjunto de

compuestos purificados se presenta en la figura 26, en la cual se confirman los valores de Rf asignados previamente en las placas TLC.



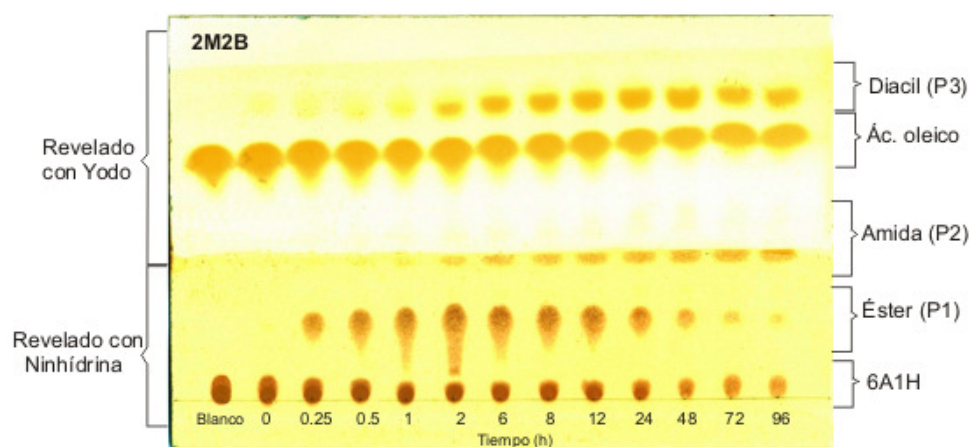
**Figura 26.** Placas TLC que muestran los estándares de los sustratos y productos encontrados después de la reacción entre el 6-amino-1-hexanol (6A1H) y el ácido oleico catalizada por CalB en *n*-hexano y 2M2B. Se utilizaron dos fases de elución distinta para cada placa. a) fase de elución F1 y b) fase de elución F2, ambas se revelaron con Yodo.

#### 6.4 Cuantificación de las reacciones de acilación enzimática del 6-amino-1-hexanol: Perfiles cinéticos

Las reacciones se efectuaron en condiciones de temperatura y de concentraciones de sustrato y enzima similares a las etapas anteriores. Para esta etapa, el estudio se centró en uso de *n*-hexano y 2M2B como disolventes. El seguimiento de las reacciones se efectuó primeramente por análisis de TLC durante 96 horas, de manera que pudiera establecerse de forma aproximada el punto de equilibrio del sistema. Posteriormente las muestras monitoreadas se analizaron por HPLC.

#### 6.4.1 Análisis cualitativo de los medios de reacción

De manera similar a los experimentos anteriores los análisis en TLC se efectuaron con las fases F1 y F2. La modificación realizada en esta etapa consistió en eluir la placa completa con la fase F2 y subsecuentemente se eluyó el 50% de la placa con la fase F1. Esta estrategia se adoptó para separar en una primera elución (fase F2) al producto **P3**, al producto **P2** y al sustrato ácido oleico y en la segunda etapa separar al producto **P1** del sustrato 6-amino-1-hexanol (fase F2).

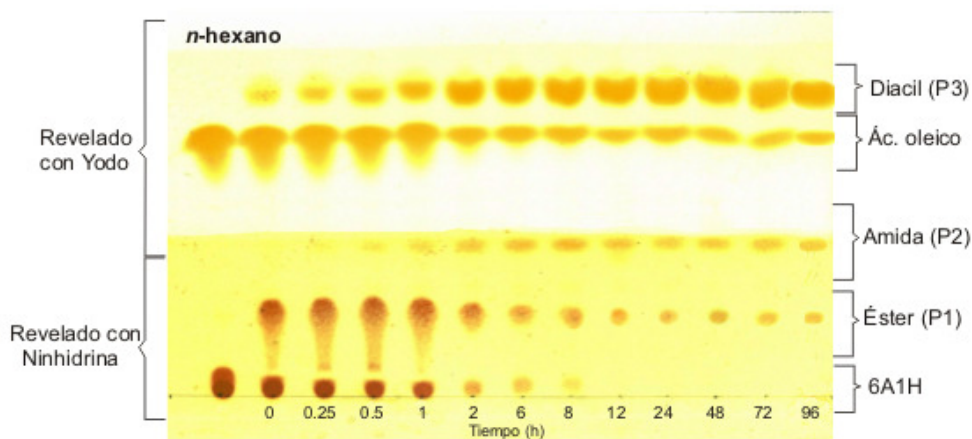


**Figura 27.** Placas TLC que muestran el perfil de sustratos y productos de la reacción entre el 6-amino-1-hexanol (6A1H) y el ácido oleico catalizada por CalB en 2M2B a 55°C.

En la figura 27 se presenta el perfil TLC de la reacción realizada en 2M2B en donde se observa una alta velocidad de transformación del 6A1H formando al producto **P1**. A partir de las 2 horas de reacción se produce una disminución drástica de **P1** hasta prácticamente desaparecer al final del proceso. El punto máximo de producción de **P1** coincide con el aparente inicio de la síntesis de los productos **P3** y **P2**, compuestos que mantienen su velocidad de síntesis, incrementando su concentración hasta el final del experimento (96 h).

En el caso de la reacción efectuada en *n*-hexano el perfil TLC (figura 28) también muestra un incremento rápido en la síntesis de éster **P1** seguido de un dramático descenso, pero a diferencia de la reacción en 2M2B, la concentración de éste, aparentemente alcanza un nivel mayor en menor tiempo. Para el caso de la amida **P2**, es importante señalar que si bien su síntesis es constante, los niveles alcanzados al final del proceso son sensiblemente menores que los que alcanzó este producto en 2M2B.

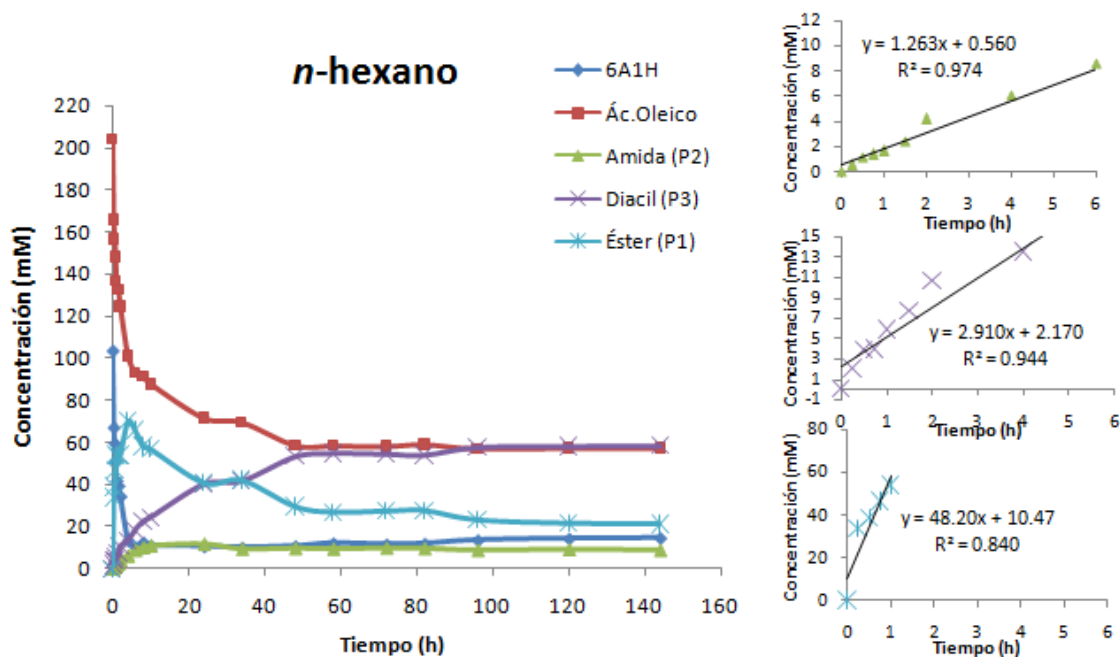
Finalmente, la síntesis del producto diacilado **P3** es constante durante prácticamente todo el proceso y su acumulación más favorable que la alcanzada en 2M2B.



**Figura 28.** Placas TLC que muestran el perfil de sustratos y productos de la reacción entre el 6-amino-1-hexanol (6A1H) y el ácido oleico catalizada por CalB en *n*-hexano a 55°C.

#### 6.4.2 Análisis cuantitativo de los medios de reacción

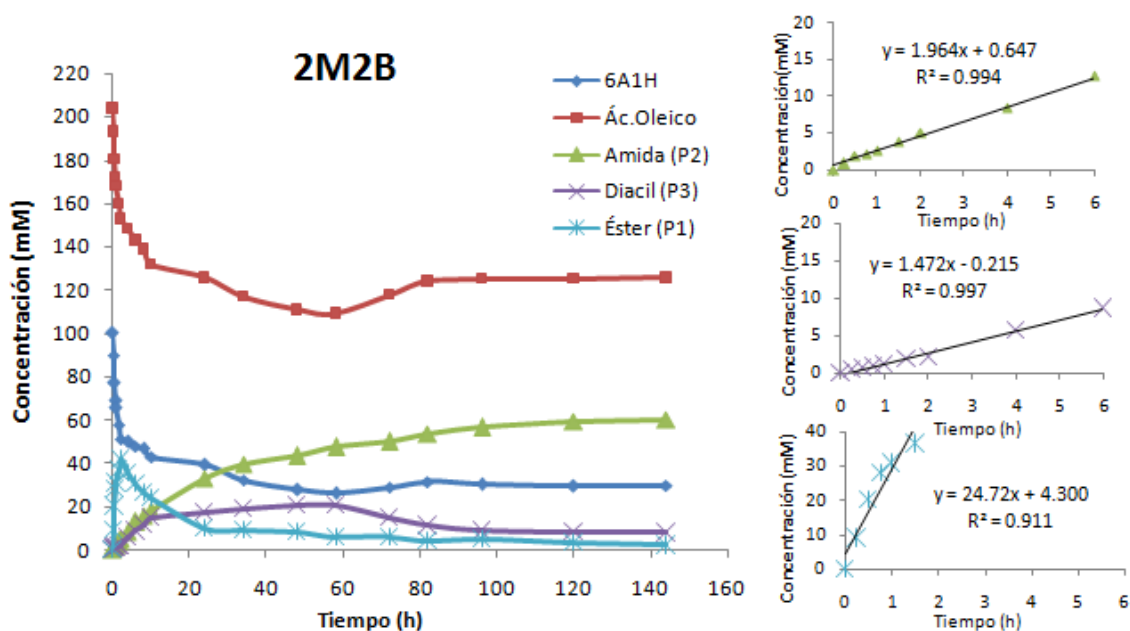
Para tener un análisis más detallado de las reacciones descritas en la sección anterior, se realizó la cuantificación de las muestras de las reacciones por HPLC y se estableció el perfil cinético de los procesos después de 144 horas de reacción (figura 29 y 30). Con el fin de comprobar que las condiciones observadas al final de la reacción correspondieran realmente al equilibrio termodinámico, se agregó más enzima después de las 144 horas de reacción. Se tomaron muestras a las 168 y 172 horas, se cuantificaron por HPLC y se obtuvo una concentración prácticamente igual al observado a las 144 horas, confirmando de manera efectiva las condiciones de equilibrio.



**Figura 29.** Perfil cinético correspondiente a la reacción de acilación entre el 6-amino-1-hexanol (100mM) y el ácido oleico (200mM) a diferentes tiempos de reacción en *n*-hexano. Del lado derecho se encuentran las pendientes que corresponden a las velocidades iniciales de cada producto. Proceso catalizado por CalB (10mg/ml) a 55°C.

En los perfiles cinéticos, se observa en primer lugar, una conversión del aminoalcohol (6A1H)  $88 \pm 6\%$  para *n*-hexano (figura 29) y del  $70 \pm 7\%$  para el sistema 2M2B (figura 30). Así mismo se observa que al alcanzar el equilibrio termodinámico, en los dos sistemas se encuentran todos los posibles productos de reacción, a concentraciones diferentes en cada uno de ellos. De esta manera, es notoria la acumulación del compuesto diacilado **P3** como producto mayoritario en *n*-hexano alcanzando una concentración final de 59mM. Aunado al compuesto diacilado, en este sistema se observa una concentración final del éster **P1** de 21mM. El conjunto de estos productos hidrofóbicos logran conformar un 90.2% del total de los productos formados y solo un 9.8% correspondiente al producto polar amida **P2**. Como correspondió a la predicción realizada de manera teórica calculando los coeficientes  $\gamma$  de estos compuestos en *n*-hexano ( $\gamma_{P1}=2.59$ ,  $\gamma_{P2}=159.29$ ,  $\gamma_{P3}=4.57$ ), estos resultados experimentales confirman al proceso en *n*-hexano como un sistema quimioselectivo hacia los productos más hidrofóbicos y validan de manera efectiva las predicciones cuántico-termodinámicas presentadas en la sección correspondiente. Es importante resaltar la alta concentración alcanzada de éster (**P1**) (70mM) entre las 2 y las 4 horas de reacción. Resultado que convierte a este proceso en un método de resolución cinética quimioselectiva favorable para la síntesis del éster

correspondiendo a un 80% del total de productos formados a ese tiempo de reacción (2-4h).



**Figura 30.** Perfil cinético correspondiente a la reacción de acilación entre el 6-amino-1-hexanol (100mM) y el ácido oleico (200mM) a diferentes tiempos de reacción en 2M2B. Del lado derecho se encuentran las pendientes que corresponden a las velocidades iniciales de cada producto. Proceso catalizado por CalB (10mg/ml) a 55°C.

De manera contrastante, en el gráfico correspondiente a la cinética de reacción en 2M2B (figura 30), el equilibrio favorece la acumulación del producto amida (**P2**) alcanzando una concentración final de 60.3mM. Esto concuerda con los perfiles obtenidos en capa fina y confirma experimentalmente la quimioselectividad favorable hacia el producto **P2** en 2M2B en un 84.5% y de solo 15.5% para los productos no polares **P1** y **P3**. Al igual que en el sistema *n*-hexano, estos resultados experimentales ratifican al proceso 2M2B como un sistema quimioselectivo hacia el producto polar (**P2**) y nuevamente confirman la utilidad de las predicciones cuántico-termodinámicas presentadas anteriormente ( $\gamma_{P1}=0.09$ ,  $\gamma_{P2}=0.43$ ,  $\gamma_{P3}=0.07$ ).

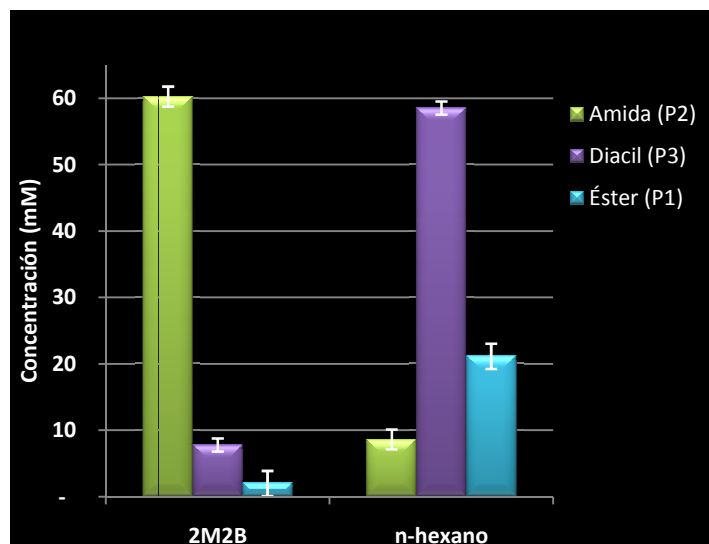
En términos del comportamiento cinético de ambos sistemas, al analizar las velocidades iniciales correspondientes a la síntesis de los productos, se observa claramente que en ambos sistemas la velocidad de reacción correspondiente a la formación del éster **P1** es netamente superior a las velocidades de síntesis de los demás compuestos (**P2** y **P3**). Esto confirma que el producto que se acumula con mayor rapidez en los dos sistemas de reacción es el producto **P1**, encontrado su concentración máxima entre las 2 y las 4 horas de reacción, tiempo al cual comienza a desaparecer

aparentemente para formar producto diacilado **P3**. Con respecto a la síntesis de la amida, es importante señalar que su velocidad de síntesis en 2M2B es mayor que la velocidad de síntesis del diacilado, sin embargo, en el sistema *n*-hexano la velocidad de síntesis de la amida es menor comparada con el producto **P3** (pendientes de la figura 29 y 30). De hecho, de acuerdo a la cinética presentada en la figura 30 (reacción en 2M2B) en donde se observa una disminución importante en la concentración del producto diacilado (clara a partir de 60h) y una velocidad de síntesis menor que la velocidad para la amida **P2**, el efecto puede estar asociado a que parte del diacilado generado es rápidamente hidrolizado por la enzima por su extremo éster, contribuyendo así, a la formación de amida. Esta reacción de hidrólisis en el extremo éster podría ser un comportamiento normal de la enzima considerando que se trata de una reacción natural de las lipasas en presencia de cantidades suficientes de agua en el medio de reacción. De hecho, esta cantidad de agua podría ser producida como resultado de las reacciones de acilación, cantidad que al parecer el tamiz molecular no logra capturar por completo en este medio (2M2B). Si bien este comportamiento no es evidente en el sistema *n*-hexano (figura 29), no se descarta la posibilidad de que en este sistema la síntesis inicial del producto amida **P2** pueda ser debida a ambos procesos: por acilación directa sobre el sustrato 6A1H o por hidrólisis del diacilado formado. Estas hipótesis serán abordadas en detalle en secciones subsecuentes.

La tabla 4 y la figura 31 resumen los resultados experimentales concernientes a la acilación enzimática del 6-amino-1-hexanol con el ácido oleico. En estos resultados se aprecia que al equilibrio de la reacción en los sistemas 2M2B y *n*-hexano resultan quimioselectivos para la síntesis de compuestos polares y compuestos hidrofóbicos respectivamente. De hecho, a conversiones por arriba del 70% en ambos sistemas la acumulación de producto polar **P2** en 2M2B es casi 9 veces mayor que la acumulación de los compuestos no polares **P1** y **P3**. Por el contrario, en el sistema *n*-hexano, la acumulación preferencial de los compuestos hidrofóbicos resultó casi 10 veces mayor que la acumulación del compuesto polar. De manera gráfica en la figura 31, se observa que los resultados se apegan casi en su totalidad a lo predicho teóricamente mediante el cálculo cuántico-termodinámico de los coeficientes  $\gamma$ . En resumen, medios de reacción hidrofílicos (polares) resultaron efectivos para la acumulación de compuestos polares y medios de reacción hidrofóbicos (apolares) favorecieron la acumulación de moléculas no polares. Como se ha ido presentando a lo largo de este estudio, el nivel de polaridad (hidrofilicidad) o de hidrofobicidad de los disolventes o de las moléculas en cuestión está estrechamente ligado a las características estructurales de dichos compuestos.

**Tabla 4.** Eficiencia y selectividad de la reacción de acilación del 6-amino-1-hexanol (6A1H) con ácido oleico 2:1 catalizada por CalB a 55°C.

Sistemas de reacción	Tiempo de reacción (h)	Conversión 6A1H	Selectividad			
			(P1)	(P2)	(P3)	Hidrofóbicos (P1 + P3)
2M2B	144	70.0±7 %	4.40%	84.5%	11.1%	15.5%
<i>n</i> -hexano	144	85.5±6 %	24.0%	9.80%	66.2%	90.2%



**Figura 31.** Concentración al equilibrio de los productos de la reacción de acilación del 6-amino-1-hexanol (100mM) con el ácido oleico (200mM) catalizado por CalB (10mg/ml) a 55°C en 2M2B y en *n*-hexano.

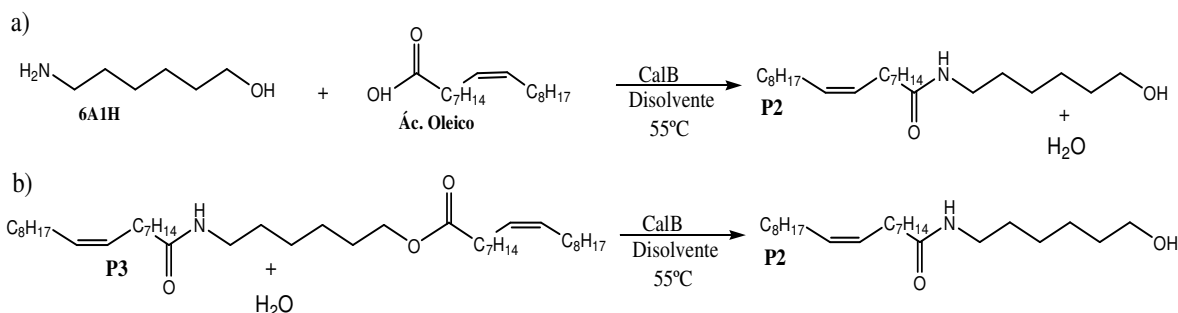
### 6.5 Condiciones que definen la ruta de síntesis del producto P2 N-oleoilaminohexanol: acilación directa o hidrólisis

A pesar de que los reportes de la literatura mencionan que el producto amida **P2** no se sintetiza en sistemas de reacción similares a los probados en este trabajo, los cálculos teóricos del coeficiente  $\gamma$  para el producto amida **P2** y nuestros resultados experimentales mostraron que este producto puede sintetizarse ya sea en *n*-hexano o en 2M2B. En efecto, los cálculos establecieron que el medio más favorable para este compuesto es el 2M2B, en donde el valor de  $\gamma$  resulta sensiblemente menor al valor calculado en *n*-hexano. Este comportamiento altamente quimioselectivo se demostró experimentalmente en ambos sistemas, confirmando la validez de las predicciones y poniendo en relevancia su utilidad en el diseño de medios de reacción en biocatálisis. Ante estas evidencias, nuestro interés se centró en describir cual es el perfil cinético que determina el modo de síntesis de la amida **P2** y como este perfil se puede asociar con su nivel de acumulación en cada uno de los sistemas evaluados.



### 6.5.1 Acumulación de N-oleoilaminohexanol

Si bien a concentraciones diferentes, la generación de **P2** (N-oleoilaminohexanol) es un hecho innegable en los sistemas *n*-hexano y 2M2B. De acuerdo a lo observado (figura 29 y 30), se sugiere que en dichos disolventes (ambos en condiciones de bajo contenido de agua favorables a la síntesis) una parte de la acumulación de la amida podría darse por acilación directa sobre el grupo amino del 6-amino-1-hexanol (figura 32a). Sin embargo, otra parte de la acumulación de la amida podría también deberse a la hidrólisis enzimática del enlace éster correspondiente al producto diacilado (figura 32b), resultado que fue mucho más evidente en el sistema 2M2B. La estrategia general en la definición de la ruta preferencial de síntesis de este producto **P2**, fue el establecer las condiciones en las cuales predomina cada una de estas dos posibilidades y como pueden ser manipuladas manteniendo la quimioselectividad del sistema. Hasta cierto punto, el perfil de síntesis de productos es muy similar en los dos sistemas estudiados (*n*-hexano y 2M2B). Sin embargo, por la acumulación preferencial de **P2** en 2M2B y por la posible hidrólisis de **P3**, se decidió utilizar al sistema 2M2B como modelo para el estudio de la ruta de formación del producto amida **P2**.



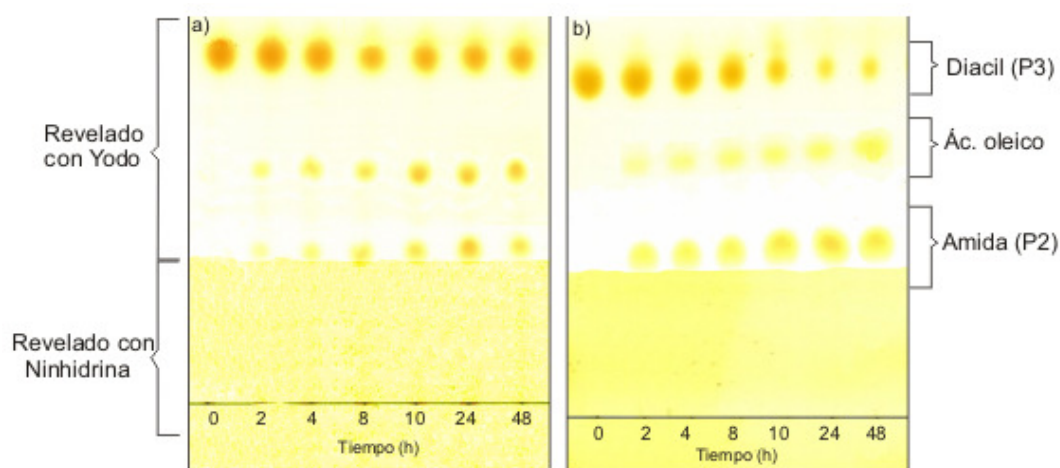
**Figura 32.** Posibles rutas de síntesis del producto N-oleoilaminohexanol **P2** en 2M2B. a) reacción de síntesis por acilación directa del 6-amino-1-hexanol (6A1H), b) reacción de hidrólisis enzimática efectuada por CalB sobre el enlace éster del producto N,O-dioleoilaminohexanol **P3**.

### 6.5.2 Hidrólisis del N,O-dioleoilaminohexanol: diacilado P3

Con el fin de establecer con certeza si el compuesto **P3** es sensible a la hidrólisis enzimática con CalB y si a partir de esta reacción la acumulación de la amida **P2** es significativa, se realizaron 2 sistemas de reacción (2M2B y *n*-hexano) en condiciones similares a las reacciones previamente reportadas (T=55 °C, CalB 10 mg\*mL<sup>-1</sup>). En estas

reacciones se utilizó como único sustrato al N,O-dioleoilaminohexanol **P3** (25mM) y se le adicionó un equivalente de agua a manera de favorecer la reacción de hidrólisis con CalB. De igual forma, como control se colocaron 2 sistemas con los mismos disolventes en condiciones anhidras (sin adición de agua), todos los procesos fueron monitoreados durante 144 horas de reacción. Con algunas de estas muestras se realizó una placa de cromatografía de capa fina usando primeramente F2 como eluyente (específico para visualizar diacilado **P3**, amida **P2** y ácido oleico), para posteriormente eluir el 50% de la placa con F1 (visualizar éster **P3** y 6A1H). Al revelar la placa (figura 33), se pudo observar en ambos disolventes (con adición o sin adición de agua) la aparición del ácido oleico y de la amida **P2**, una reacción control sin enzima no generó ningún producto. De hecho, en los controles considerados anhidros, se observaron los productos de hidrólisis ácido oleico y a la amida **P2** con la misma intensidad que las reacciones con un equivalente de agua. En el caso de las reacciones en *n*-hexano las intensidades de los productos fueron muy tenues mostrando una baja conversión del producto diacilado **P3**, no así en 2M2B. Este comportamiento sugiere que en el sistema 2M2B deshidratado existe una actividad de agua suficiente para efectuar una hidrólisis significativa, mientras que en el sistema *n*-hexano deshidratado e hidratado al parecer podría ser necesaria una cantidad mayor de agua para poder observar una reacción de hidrólisis más notable.

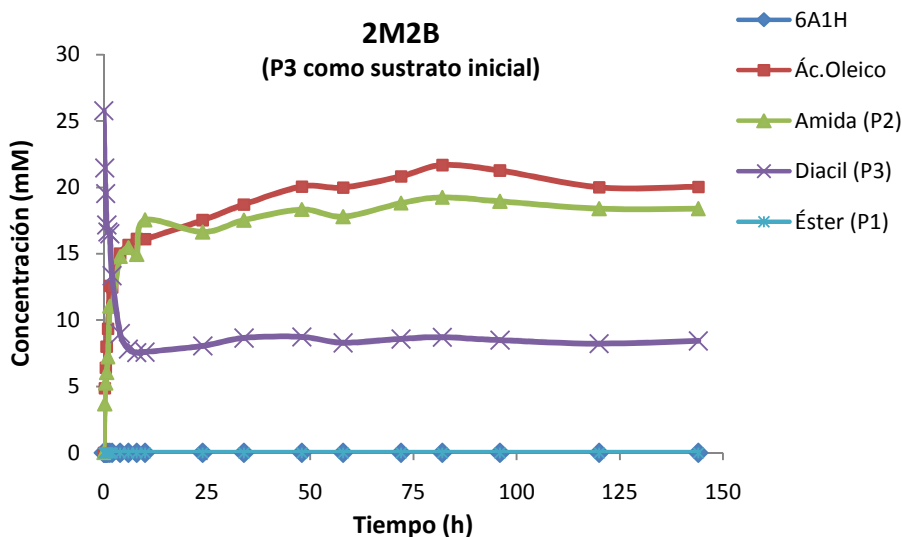
Al no detectarse la aparición del producto **P1**, se confirma que la hidrólisis de **P3** se lleva a cabo solamente sobre el enlace éster.



**Figura 33.** Placas TLC que muestran el perfil de productos de la reacción de hidrólisis enzimática efectuada por CalB a 55°C sobre el enlace éster del producto diacilado **P3**. a) sistema *n*-hexano y b) sistema 2M2B.

Con el fin de estimar la disponibilidad del agua para las reacciones de hidrólisis enzimática, se calculó su coeficiente  $\gamma$  en ambos sistemas 2M2B y *n*-hexano. El valor de

$\gamma_{H_2O}$  a dilución infinita arrojó un valor de 387.79 en *n*-hexano y un valor de 3.29 en 2M2B. Esto indica que si bien la disponibilidad del agua en 2M2B sería menor que en *n*-hexano, esta disponibilidad es suficiente para llevar a cabo la reacción de hidrólisis del producto **P3**, en otras palabras, su hidrólisis es un proceso muy favorable en ambos sistemas. Sin embargo, la acumulación baja de **P2** en *n*-hexano, confirma nuevamente su poca afinidad por este disolvente acorde a los resultados arrojados por los cálculos teóricos. Al encontrar que la reacción efectuada en 2M2B aparentemente presentaba una mayor conversión y una acumulación preferencial de producto amida **P2**, y por ser el modelo de estudio elegido, se procedió a la cuantificación de dicha reacción (figura 34).



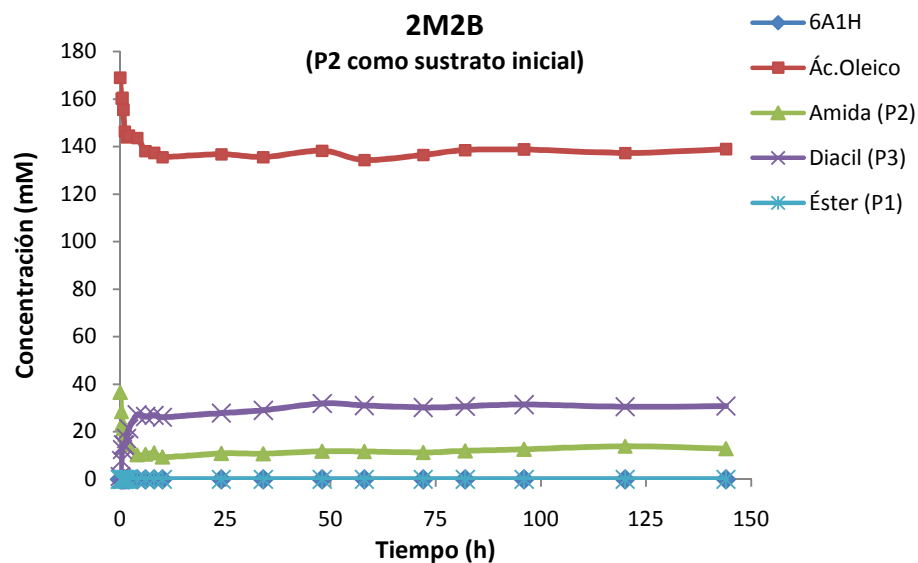
**Figura 34.** Cinética de la reacción de hidrólisis del N,O-dioleoilaminohexanol (25mM) con un equivalente de agua en 2M2B catalizada por CalB (10mg\*ml<sup>-1</sup>) a 55°C.

En dicha figura se observa una rápida velocidad de hidrólisis del diacilado **P3** con la consecuente aparición de amida y ácido oleico en la misma proporción; no se detectó la presencia del producto éster **P1**. Cabe mencionar que de manera similar a las reacciones reportadas previamente, en este medio de reacción 2M2B la acumulación del producto amida **P2** es sensiblemente superior a los niveles residuales de diacilado **P3**. Los niveles de conversión variable del producto diacilado **P3** con la consecuente acumulación de amida **P2** en los sistemas 2M2B y *n*-hexano, aportan elementos que contribuyen a confirmar la hipótesis de que la acumulación del compuesto **P2** por hidrólisis del enlace éster presente en el producto **P3** depende de las condiciones de la reacción (contenido de agua) y de la composición del medio de reacción y la naturaleza del disolvente.

### 6.5.3 Acilación enzimática del N-oleoilaminohexanol y O-oleoilaminohexanol

Con el fin de aportar elementos adicionales sobre la vía de formación de los diferentes productos de reacción y en especial el del compuesto amida **P2**, se decidió efectuar 2 reacciones de acilación de los compuestos monoacilados en 2M2B. La primera de ellas utilizando como sustrato a la amida **P2** y en la otra utilizando como sustrato al éster **P1**. La hipótesis planteada para la reacción con la amida **P2** fue que en condiciones favorables para la reacción de acilación, bajo contenido de agua y presencia de un agente acilante, una proporción de la amida será transformada en diacilado **P3** por esterificación en su grupo alcohol libre y este diacilado no será hidrolizado para acumular éster **P1**. Las condiciones de reacción fueron  $10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de CalB a  $55\text{ }^\circ\text{C}$ , una concentración inicial de amida **P2** de  $35\text{mM}$  y ácido oleico a  $100\text{mM}$ .

En la figura 35 se observa una transformación rápida de la amida **P2** (65%), originando de manera proporcional la formación de producto diacilado **P3**. Después de 8 horas de reacción el sistema alcanza el equilibrio sin detectarse la formación del éster **P1**. Tampoco se observa la formación de 6A1H ni un incremento del donador de acilo. De esta manera confirmamos que el producto diacilado **P3** puede ser generado por acilación de la amida **P2** y que la acumulación selectiva de estos compuestos depende de las condiciones del sistema. Además se confirma que bajo estas condiciones no se lleva a cabo la hidrólisis del enlace amida en el sistema.

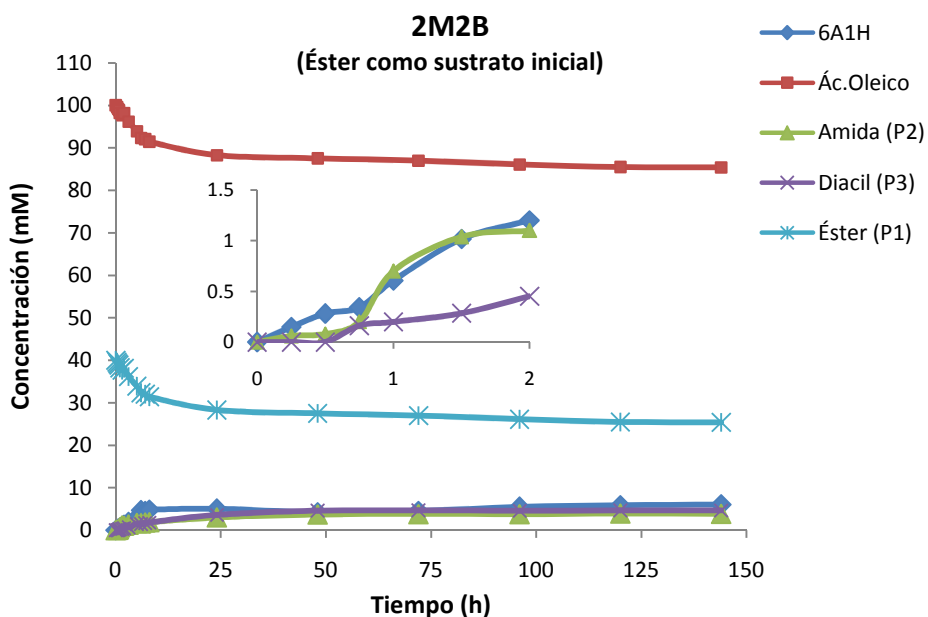


**Figura 35.** Cinética de la reacción entre el N-oleoilaminohexanol **P2** ( $35\text{mM}$ ) con ácido oleico en 2M2B catalizada por CalB ( $10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$

Si bien, a partir de los cálculos de  $\gamma$  para **P1**, **P2** y **P3**, se estableció que estos tres compuestos podrían acumularse de la misma forma en 2M2B (no fue el caso para el sistema *n*-hexano), la selectividad depende de las condiciones específicas del sistema. Así, en condiciones de acilación como son las condiciones de este experimento la acumulación del diacilado **P3** se ve favorecida, por otro lado en condiciones de hidrólisis como las de la reacción general o de las presentadas en la sección anterior, el producto **P2** será acumulado preferencialmente por acilación directa o por hidrólisis del compuesto **P3**.

En lo que se refiere a la reacción efectuada en presencia del éster **P1**, la hipótesis planteada fue que en condiciones favorables para la reacción de acilación (bajo contenido de agua y presencia de agente acilante), una proporción del éster **P1** será transformado en diacilado **P3** y otra proporción podría ser hidrolizado para generar amino-alcohol y este a su vez podría ser transformado en amida **P2**. En este caso, las condiciones de reacción fueron  $10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  de CalB a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ , una concentración inicial de éster **P1** de  $25\text{mM}$  y ácido oleico a  $100\text{mM}$ .

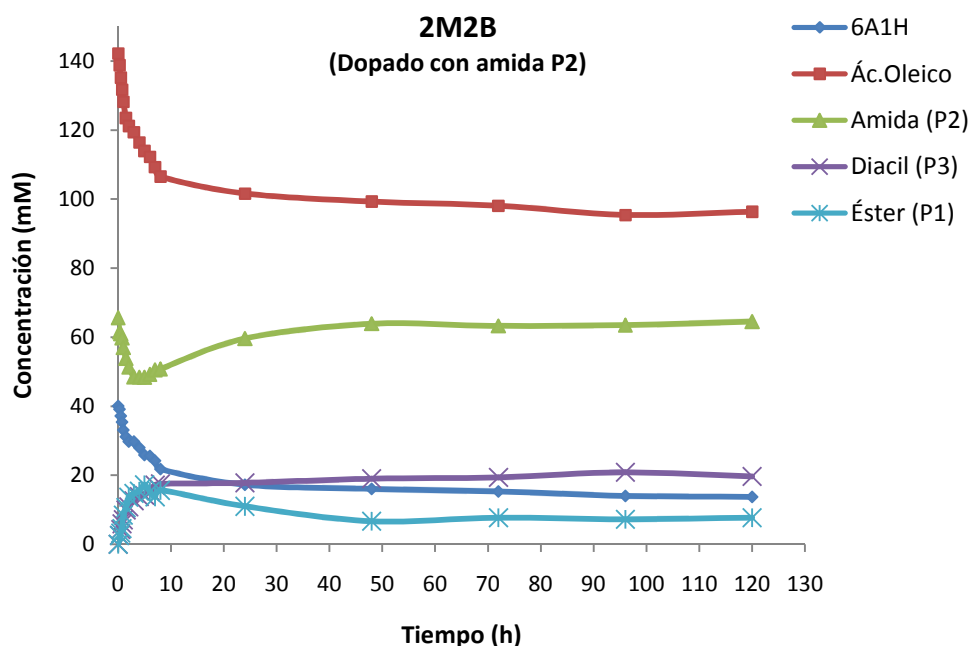
En la figura 36 se observa una lenta y escasa generación de amida **P2**, de producto diacilado **P3** y de 6A1H, la concentración al equilibrio de los productos de esta reacción fue muy similar:  $3.9$ ,  $4.7$  y  $6\text{mM}$  respectivamente. La conversión del ácido oleico apenas de un  $15\%$  y del éster **P1** menos del  $40\%$ . La presencia de 6A1H en el sistema confirma la sensibilidad del éster para ser hidrolizado por CalB. De hecho, al hacer un balance de los productos formados en la reacción (**P3** y 6A1H) se infiere que el éster se transforma preferencialmente en 6A1H por hidrólisis y no en diacilado por amidación. Además, que la acilación del éster (reacción de amidación) para formar el diacilado **P3** es lenta, lo que resulta coherente con lo reportado en la literatura en donde se sugiere que para las lipasas, la velocidad de formación de ésteres es superior a la velocidad de formación de amidas. Por último, pero no menos importante, en lo referente a la generación de amida **P2**, se confirma también que su producción se debe tanto a la posible hidrólisis del producto diacilado **P3** ya formado (por el extremo éster), así como a su síntesis por acilación directa del 6A1H acumulado en el medio (por el extremo amino).



**Figura 36.** Cinética de la reacción entre el O-oleoilaminohexanol **P1** (25mM) con ácido oleico en 2M2B catalizada por CalB (10mg mL<sup>-1</sup>) a 55°C

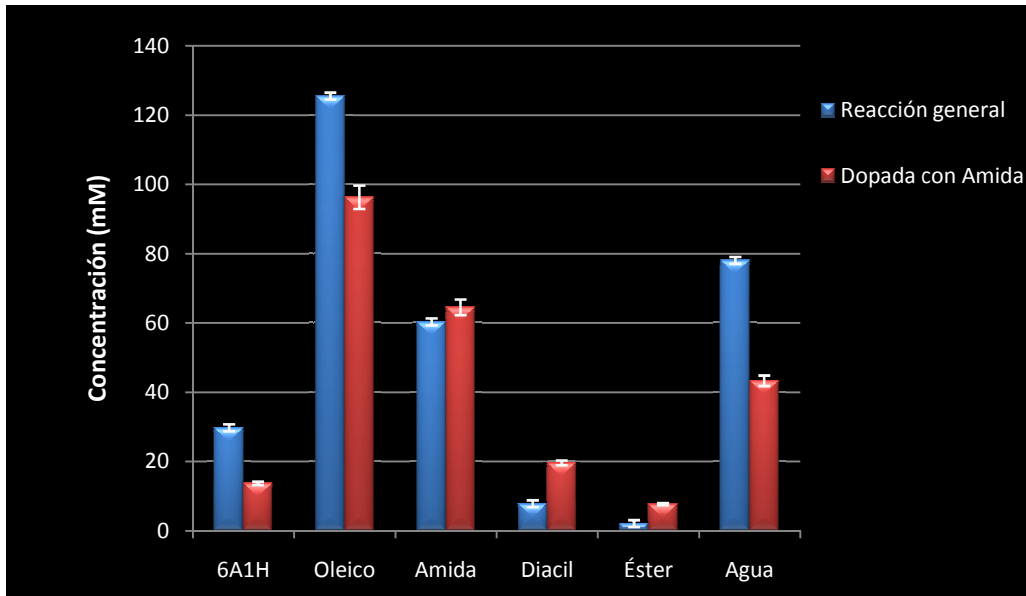
#### 6.5.4 Reacción general en presencia inicial de N-oleoilaminohexanol

Si se considera que la conversión máxima de amida **P2** en el equilibrio de la reacción general está determinada por una capacidad máxima del medio para poder acumularla, una concentración equivalente al inicio de la reacción no permitirá una acumulación adicional en el sistema. Así entonces, considerando que la reacción general de acilación del 6-amino-1-hexanol con el ácido oleico como donador de acilo acumuló una concentración total de 60.3mM de amida al equilibrio, se realizó una reacción en 2M2B a las condiciones usuales, pero “dopada” (dopar: adicionar de manera voluntaria una sustancia para producir un comportamiento específico) con amida. En este caso, se consideró con una concentración inicial de 60mM de este compuesto junto con las concentraciones equivalentes de 6A1H, de ácido oleico y agua que corresponden al equilibrio de la reacción global. Así, se utilizó 140mM de ácido oleico, 40mM de aminoalcohol y 60mM de agua. El proceso se realizó por duplicado y se monitoreó de la misma manera que las reacciones anteriores observándose el comportamiento cinético mostrado en la figura 37.



**Figura 37.** Cinética de la reacción de acilación del 6-amino-1-hexanol (40mM) con ácido oleico (140mM) en 2M2B catalizada por CalB ( $10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) a  $55^\circ\text{C}$  en presencia de 60mM de amida **P2** y 60 mM de agua.

Como se puede observar en la cinética, la concentración de amida **P2** tiene un drástico descenso a las primeras 3 horas de reacción, evento que coincide con la concomitante formación de compuesto **P3**. Al mismo tiempo de reacción se observa una disminución del 6A1H equivalente al aumento de éster **P1**. La confirmación de estos eventos concertados se puede soportar al observar el perfil de la conversión del ácido oleico, el cual presenta conversiones que coinciden con la formación de éster **P1** y de diacilado **P3**. Es importante señalar que a pesar de que en esta reacción global la concentración de amida **P2** cambia a lo largo del proceso, su concentración al equilibrio se mantiene igual a la concentración utilizada para dopar el sistema. Dicho en otras palabras la acumulación de amida **P2** está determinada por una capacidad máxima del medio para poder acumularla, en el caso del sistema estudiado en este trabajo igual a 60mM. De hecho, al observar las concentraciones de los demás componentes del sistema, se observa que a pesar de haber iniciado en un punto de concentración diferente a las reacciones previas, sus concentraciones son similares en el equilibrio del sistema. En la figura 38, se presenta la comparación de las concentraciones alcanzadas al equilibrio en la reacción global y en la reacción dopada a concentraciones equivalentes de todos los componentes del sistema. Si bien en esta figura se observan algunas diferencias en las concentraciones para cada sistema, el perfil es coherente y muy similar.



**Figura 38.** Comparación de las concentraciones de los compuestos encontrados al llegar al equilibrio entre la reacción general global en 2M2B y la dopada con amida **P2** en el mismo disolvente.



## 7. Conclusiones

Con los resultados de este proyecto se demostró que la resolución quimioselectiva de amino-alcoholes puede ser realizada mediante estrategias de la Ingeniería del Medio de Reacción (IMR). En efecto, mediante el diseño adecuado del medio de reacción y el empleo de CalB como catalizador se logró la acilación selectiva entre el 6-amino-1-hexanol y el ácido oleico. En este sentido, se pudo acumular de manera específica ya sea productos hidrofóbicos o productos polares derivados de esta molécula bifuncional. Para lograr esto, se calcularon los coeficientes  $\gamma$  para los productos de la reacción en diferentes disolventes. Los cálculos demostraron que los productos de naturaleza hidrofóbica tales como el éster **P1** y el diacilado **P3** tienen una afinidad mayor por disolventes hidrofóbicos (*n*-hexano) que la afinidad que presentan moléculas polares por este tipo de medios. Por el contrario, estos cálculos de  $\gamma$  mostraron que dichos productos hidrofóbicos muestran muy poca afinidad por medios de alta polaridad tales como el DMSO y la piridina. Un producto polar como lo es la amida **P2** mostró afinidad por disolventes polares tales como el 2M2B y DMSO y la piridina. Cabe señalar que no se evaluaron experimentalmente medios como el DMSO y la piridina ya que resultan medios altamente agresivos para la actividad catalítica de CalB. Considerando estos resultados teóricos, se evaluó experimentalmente la reacción entre el 6-amino-1-hexanol y el ácido oleico en *n*-hexano como sistema hidrofóbico y el 2M2B como medio de reacción polar. Los resultados obtenidos en estas reacciones confirmaron las observaciones teóricas, mostrando que en el sistema *n*-hexano se acumulan de manera preferencial los productos no polares **P1** y **P3** (>90%) y que en el sistema 2M2B se acumuló de manera quimioselectiva el producto polar **P2** (84.5%). Si bien en el sistema *n*-hexano los productos hidrofóbicos **P1** y **P3** representan de manera conjunta más del 90% de los productos totales, la concentración individual del éster **P1** es de solo 24%. Una estrategia que resultó efectiva para obtener el compuesto **P1** fue el aprovechar la mayor velocidad de síntesis de este compuesto con respecto a las velocidades de síntesis de **P2** y **P3**. Mediante este control cinético fue posible obtener al producto **P1** con rendimientos del 80%.

El elucidación estructural de los productos **P1**, **P2**, y **P3** y el análisis de los perfiles cinéticos de las reacciones estudiadas confirmaron que, contrario a todos los reportes de la literatura, la síntesis quimioselectiva de la amida **P2** si es posible efectuarla en este tipo de sistemas. En efecto, los resultados de este proyecto permitieron establecer que la acumulación de la amida **P2** puede seguir dos vías de síntesis: una de ellas la acilación directa del grupo amino del 6-amino-1-hexanol y la otra mediante la hidrólisis del enlace éster del producto diacilado **P3**. Así mismo, se pudo observar que en las condiciones de reacción estudiadas en este trabajo, el producto **P3** se produce preferentemente por acilación sobre **P2** que por acilación sobre **P3**.

En resumen, este trabajo confirmó que la IMR es una herramienta útil en biocatálisis para el diseño de sistemas de reacción altamente selectivos. Además permitió demostrar que es posible la resolución enzimática quimioselectiva de moléculas bifuncionales del tipo amino-alcohol.

## 8. Bibliografía

- **Baldwin J.E.**; (1976). Rules for the Ring Closure. *Journal of the Chemical Society. Chemical Communications.* 734-736.
- **Bellot J.C.**; Choisnard L.; Castillo E.; Marty A.; (2001). Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase catalyzed esterification. *Enzyme and Microbial Technology.* 28, 4-5: 362–369.
- **Bevinakatti H.S.**; Newadkar R.V.; (1990). Lipase-Catalysed Kinetic Resolution of N,O-Diacetyl-2-Amino-1-Butanol in Diisopropyl Ether. *Tetrahedron Asymetry.* 1, 9: 583-586.
- **Boy Cornils**; (2008). Catalysis. *Encyclopedia of Chemical Technology.* 120, 30: 5583–5584.
- **Bradbury A.F.** and Smyth D.G.; (1991). Peptide amidation. *Trends Biochemical Sciences.* 16: 112-115.
- **Carrea G.**; Riva S.; (2000). Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. *Angewandte Chemie-International Edition.* 39, 2226-2254.
- **Castillo E.**; Pezzotti F.; Navarro A.; López-Munguía A.; (2003). Lipase-catalyzed synthesis of xylitol monoesters: solvent engineering approach. *Journal of Biotechnology* 102:251-259.
- **Chinsky N.**; Margolin A. L.; Klibanov A. M.; (1989). Chemoselective Enzymatic Monoacylation of Bifunctional Compounds. *Journal of the American Chemical Society.* 11, 1: 386-388.
- **Coca J.**; Hernández O.; Berrio R.; Martínez S.; Díaz E.; Dustet J.C.; (2001). Producción y caracterización de las lipasas de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. *Biotecnología aplicada.* 18:216-220.
- **Couturier L.**; Taupin D.; Yvergnaux F.; (2009). Lipase-Catalyzed chemoselective aminolysis of various amino-alcohols with fatty acids. *Journal of Molecular Catalysis B.* 56, 1: 29-33.
- **Dawar P.**, Bhagavan Raju M. and Ramakrishna R.A.; (2011). One-pot esterification and Ritter reaction: chemo- and regioselectivity from tert-butyl methyl ether. *Tetrahedron Letters.* doi:10.1016/j.tetlet.2011.04.100
- **Faber K.**; (2011). *Biotransformations in Organic Chemistry*, 6<sup>th</sup> Edition Springer. 309
- **Fermeglia M.**; Braiuca P.; Gardossi L.; Pricl S.; Halling P. J.; (2006). In Silico Prediction of Medium Effects on Esterification Equilibrium Using the COSMO-RS Method. *Biotechnol. Prog.* 22: 1114-1152.
- **Florian Le Joubioux**; Oussama A.; Bridiau N.; Graber M.; Maugard T.; (2011). Kinetic study of 2-butanol O-acylation and sec-butylamine N-acylation catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis.* 70, 3-4: 108-113.
- **Fredenslund A.**; Russell L.J.; Prausnitz J.M.; (1975). Group-contribution estimation of activity coefficients in nonideal liquid mixtures. *AIChE Journal.* 21, 6: 1086–1099.
- **Furutani T.**; Furui M.; Ooshima H.; Kato J.; (1996). N-acylation of Beta-amino alcohol by acyl migration following enzyme –catalyzed esterification. *Enzyme and Microbial Technology.* 19: 578-584.
- **García T.**; Coteron A.; Martinez M.; Aracil J.; (1996). Kinetic modeling of esterification reactions catalysed by immobilized lipase. *Chemical Engineering Science.* 51, 11: 2841-2846.
- **García T.**; Coteron A.; Martinez M.; Aracil J.; (2000). Kinetic model for the esterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst. *Chemical Engineering Science.* 55:1411-1423.
- **García-Urdiales E.**; Rebolledo F.; Gotor V.; (2000). Enzymatic one-pot resolution of two nucleophiles: alcohol and amine. *Tetrahedron-Asymmetry.* 11, 7.
- **Gotor V.**; (1999). Non-Conventional Hydrolase Chemistry: Amide and Carbamate Bond Formation Catalyzed By Lipases. *Biorganic & Medicinal Chemistry.* 7:2189-2197.

- **Gotor V.**; Brieva R.; Rebolledo F; **(1988)**. Enantioselective Acylation of Amino-Alcohols by Porcine Pancreatic Lipase. *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*. 14: 957-958.
- **Gotor V.**; García M.J.; Rebolledo F.; **(1990)**. An enzymatic method for the preparation of chiral diamides. *Tetrahedron Asymmetry*.1: 277-278.
- **Grensemann H.**; Gmehling J.; **(2005)**. Rebuttal to the Comments of Andreas Klamt on “Performance of a COSMO-RS Model in Comparison to Classical Group Contribution Methods. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 44:7043-7044.
- **Grensemann H.**; Gmehling J.; **(2005)**. Performance of a Conductor-Like Screening Model for Real Solvents Model in Comparison to Classical Group Contribution Methods. *Industrial & Engineering Chemistry*. 44:1610-1624.
- **Guisán J.M.**; Bastida A.; Sabuquillo P.; Armisen P.; Fernández-Lafuente R.; Huguet J.; **(1998)**. A single step purification immobilization and hiperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnology and Bioengineering*. 58:486-93.
- **Heldt-Hansen, H.P.**; Ishii, M.; Patkar, S.; Hansen, T.T.; Eigtved, P.; **(1989)**. In *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*. American Chemical Society. 158-172.
- **Henkel, T.**; Brunne, R. M.; Reichel, F.; **(1999)**. Statistical Investigation into the Structural Complementarity of Natural Products and Synthetic Compounds. *Angewandte Chemie International Edition*. 38, 5: 643–647.
- **Hernaiz M.J.**; Sánchez-Montero; Sinisterra J.M.; **(1999)**. Modification of purified lipase from *C. rugosa* with polyethylene glycol: A systematic study. *Enzyme and Microbial Technology*. 24:181-90.
- **Husson E.**; García V.; Humeau C.; Chevalot I.; Fournier F.; Marc I.; **(2010)**. Enzymatic acylation of a bifunctional molecule in 2-methyl-2-butanol: Kinetic modeling. *Enzyme and Microbial Technology*. 46:338-346.
- **Husson E.**; Humeau C.; Blanchard F.; Framboisier X.; Marc I.; Chevalot I.; **(2008)**. Chemo-selectivity of the N, O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*. 55, 110–117.
- **J. Priego**; Ortíz-Nava C.; Carrillo-Morales M.; López-Munguía A.; Escalante J.; Castillo E.; **(2009)**. Solvent engineering: an effective tool to direct chemoselectivity in a lipase-catalyzed Michael addition. *Tetrahedron* 65, 2: 536–539.
- **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: 315-351.
- **Jaeger K.E.**; Eggert T.; **(2002)**. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 390-397.
- **Jones J.B.**; Holland H.; **(1997)**. *Biocatalysis*. Synopsis Scientific System. Leeds, UK
- **Kagan H. B.**; Fiaud, J. C.; **(1988)**. *Topics in Stereochemistry*. 18: 249-330.
- **Kallenberg A.I.**, Van Rantwijk F. and Sheldon R.A.; **(2005)**. Immobilization of penicillin G acylase: the key of the optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*. 347, 7-8: 905-926.
- **Kazlauskas R.**; **(1994)**. Elucidating structure mechanism relationship in lipases. Prospects for predicting and engineering catalytic properties. *Trends of Biotechnology*. 12:464-72.
- **Kiqwai M.**; Poddar R.; Mothra P.; **(2009)**. N-acylation of ethanolamine using lipase: a chemoselective catalyst. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 5, 10. Doi:103762/bjoc.5.10.
- **Kirk O.**; Christensen M.W.; **(2002)**. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. *Organic Process Research & Development*. 6:446-451.
- **Klamt A.**; **(2005)**. *Cosmo- RS from quantum chemistry to fluid phase Thermodynamics and Drug Desing*. Elseiver. 234.
- **Klamt A.**; **(2005)**. Comments on “Performance of a Conductor-Like Screening Model for Real Solvents Model in Comparison to Classical Group Contribution Methods. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 44:7042.

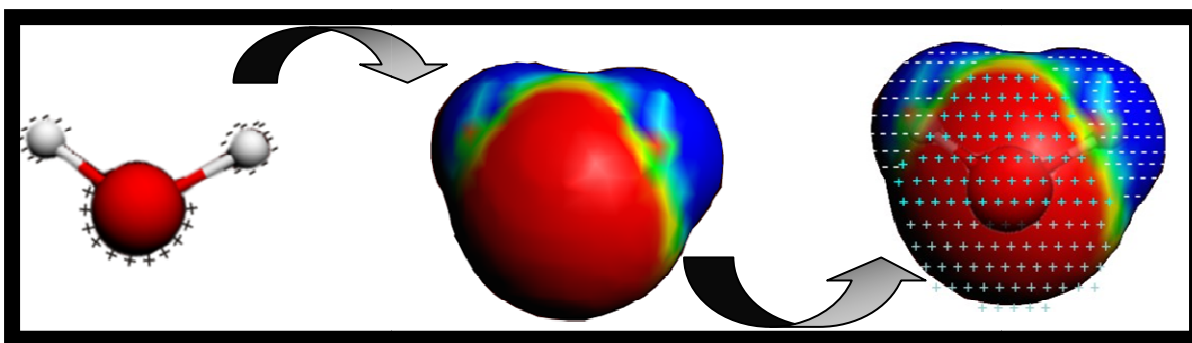
- **Klamt A.**; Ecker F.; Hornig M.; (2001). COSMO-RS: A novel view to physiological solvation and partition questions. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 15:355-365.
- **Klamt A.**; Eckert F.; Arlt W.; (2010). COSMO-RS: An Alternative to Simulation for Calculating Thermodynamic Properties of Liquid Mixtures. *The Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 1:101-122.
- **Klamt A.**; Jonas V.; Bürger T.; Lohrenz J.C.W.; (1998). Refinement and Parametrization of COSMO-RS. *Journal of Physical Chemistry*. 102: 5074-5085.
- **Klibanov A.M.**; (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in Biotechnology*. 15, 5: 97-10.
- **Klibanov A.M.**; (2000). Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*. 409, 241-246.
- **Margolin A.L.**; Klibanov A.M.; (1987). Peptide Synthesis Catalyzed by Lipases in organic media. *J. Am. Chem. Soc.* 109:3802-3804.
- **Mark D.** Argentine; Paul K. Owens; Bernard A. Olsen; (2007). Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59, 1: 12-28.
- **Martin B.**; (2006). Resolución cinética dinámica catalizada por enzimas y metales de transición. *Real Sociedad Española de Química*. 102, 4:46-68.
- **Mehejabeen K.**; Deshpande S.S.; Srinivas D.; (2011). Esterification of fatty acids with glycerol over Fe-Zn double-metal cyanide catalyst. *Catalysis Communications*. 12, 14: 1302-1306
- **Morris F.**; Gotor V.; (1993). Useful and versatile procedure for the acylation of nucleosides through and enzymatic reaction. *Journal of Organic Chemistry*. 58: 653-660.
- **Nahmany M.**; Melman A.; (2004). Chemoselectivity in reactions of esterification. *Organic & Biomolecular Chemistry*. 2:1563-1572.
- **Neises B.**; Steglich W.; (1978). *Angewandte Chemie International Edition*. 17: 522-524.
- **Oliver T.**; Gotor V.F.; Gotor F.; (2006). Lipase-catalyzed resolution of chiral 1,3-aminoalcohols: application in the asymmetric synthesis of S-dapoxetine. *Tetrahedron Asymmetry*. 17: 860-866.
- **Panda T.**; Gowrishankar B.S.; (2005). Production and applications of esterases. *Applied microbiology and Biotechnology*. 67: 160-169.
- **Pedersen N.R.**; Wimmer R.; Emmersen J.; Degn P.; 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.
- **Peelman F.**; Vanloo B.; Verschelde Jean-Luc; Labeur C.; Caster H.; Taveirne J.; Verhee A.; Duverger N.; Vandekerckhove J.; Tavernier J.; Rosseneu M.; (2001). Effect of mutations of N- and C-terminal charged residues on the activity of LCAT. *The Journal of Lipid Research*. 42: 471-479.
- **Pérez-Victoria I.**; (2006). Acilaciones Regioselectivas de Oligosacáridos Catalizadas por Enzimas: Caracterización y Propiedades de los Productos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- **Pouilloux Y.**; Abro S.; Vanhove C.; Barrault J.; (1999). Reaction of glycerol with fatty acids in the presence of ion-exchange resins: Preparation of monoglycerides. *Journal of Molecular Catalysis*. 149:243-254.
- **Putnam R.**; Taylor R.; Klamt A.; Eckert F.; Schiller M.; (2003). Prediction of Infinite Dilution Activity Coefficients Using COSMO-RS. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 42: 3635-3641.
- **Rarey J.**; Gmehling J.; (2007). Group Contribution Prediction of Surface Charge Density Profiles for COSMO-RS (OI). *AIChE Journal*. 53,1:3231-3240.
- **Reetz M.T.**; Wolfgang W.; Francio G.; Leitner W.; (2003). Continuous Flow Enzymatic Kinetic Resolution and Enantiomer Separation using Ionic Liquid/Supercritical Carbon Dioxide Media. *Adv. Synth. Catal.* 345: 1221-1228.

- **Sandoval G.**; Marty A.; (2001). Thermodynamic Activity-Based Enzyme Kinetics: Efficient Tool for Nonaqueous Enzymology. *AIChE Journal*. 47, 3:718-726.
- **Schmid R.D.**; Verger R.; (1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie-International Edition*. 37, 12.
- **Shin J.S.**; Kim B.G.; (1998). Kinetic modeling of w-Transamination for Enzymatic Kinetic Resolution of alfa-methylbenzylamine. *Biotechnology and Bioengineering*. 60, 5: 534-540.
- **Sivasamy A.**; Krishnaveni M.; 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.
- **Torre O.**; Alfonso I.; Gotor V.; (2004). Lipase catalysed Michael addition of secondary amines to acrylonitrile. *Chemical Communications*. 1724.1725.
- **Torre O.**; Gotor F.; Gotor V.; (2006). Lipase-catalyzed resolution of chiral 1,3-amino alcohols: application in the asymmetric synthesis of (S) dapoxetine. *Tetrahedron Asymmetry*. 17: 860-866.
- **Torres Gavilán A.**; (2009). Estudio de la Resolución Enantio- y Quimioselectiva de Mezclas racémicas de moléculas Bifuncionales. Tesis Doctoral; Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología (UNAM).
- **Torres-Gavilán A.**; Castillo E.; Lopez-Munguía A.; (2006).The amidase activity of *Candida antarctica* lipase B is dependent on specific structural features of the substrates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 41,4:136-140.
- **Uppenberg J.**; Ohrner N.; Norin M.; Hult K.; Kleywegt G.J.; Patkar S.; (1995). Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Cantarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry*. 34, 51: 16838-16851.
- **Uppenberg J.**; Patkar S.; Bergfors T.; Alwyn Jones T.; (1994). Crystallization and Preliminary X-ray studies of Lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of Molecular Biology*. 235, 2.
- **Van Rantwijk F.**; Sheldon R.A.; (2004). Enantioselective acylation of chiral amines catalysed by serine hydrolases. *Tetrahedron*. 60, 3: 501-519.
- **Vonderhagen A.**; Rath H.C.; Eilers E.; (1999). Enzymatic catalyzed N-acylation of amino acids protein hydrolysates and/or their derivatives. Alemania, Henkel K. G.a.A.
- **West J.B.**; Wong C.H.; (1987). *Tetrahedron Letters*. 28: 1629-1632.
- **Woodard S. S.**; Katsuki, T.; Yamada, Y.; Ideda, M.; Sharpless, K. B.; (1981). *Journal of the American Chemical Society*. 103, 6237-6240.

## 9. ANEXOS

### Anexo 1

La teoría conocida como “Conductor-like Screening Model for Realistic Solvents” (COSMO-RS), de manera general, comienza con la representación de una estructura molecular en 2 dimensiones y concluye con el cálculo del potencial químico en casi cualquier disolvente o mezcla de disolventes. COSMO-RS es una teoría que permite calcular por métodos químico cuánticos (QM) la energía de interacción entre superficies moleculares. La teoría COSMO-RS parte del planteamiento QM-COSMO, el cual proporciona una estimación del potencial químico simulando la superficie discreta de la especie embebida en un conductor virtual. Para la superficie molecular, cada segmento está caracterizado por un área y una densidad de carga de apantallamiento (Screening charge density SCD,  $\sigma_i$ , figura A1).



**Figura A1.** Imagen del modelamiento con COSMO-RS. Primero se muestra a la molécula a trabajar (en esta caso agua) con sus respectivas cargas, después el modelo introduce a la molécula con sus cargas embebida en una cavidad de un medio continuo virtual y por último coloca las densidades de carga de apantallamiento (SCD) de la superficie de la cavidad, generadas por las interacciones electrostáticas entre la molécula y el medio.

Posterior a la generación de las SCD, COSMO-RS contempla al medio como un conjunto de moléculas ideal y estrechamente empaçadas. El empaquetamiento se logra mediante la compresión del sistema, lo que genera interacciones electrostáticas entre las dos diferentes SCD's ( $\sigma$  y  $\sigma'$ ) con una energía de interacción ( $E_{misfit}$ ) descrita por:

$$E_{misfit}(\sigma, \sigma') = a_{eff} e_{misfit}(\sigma, \sigma') = a_{eff} \frac{\alpha'}{2} (\sigma + \sigma')^2 \quad \text{Ec. 6}$$

En donde  $a_{eff}$  es el área efectiva de contacto entre segmentos de las superficies moleculares del soluto y el disolvente con densidades de carga  $\sigma$  y  $\sigma'$ . En esta ecuación  $\alpha'$  es un parámetro de interacción ajustable. Así mismo, COSMO-RS considera la energía de

interacción generada por puentes de hidrógeno ( $E_{HB}$ ) entre las especies del sistema; misma que también depende de las densidades de carga (SCD):

$$E_{HB} = a_{eff} c_{HB} \min(0; \min(0; \sigma_{donor} + \sigma_{HB}) \max(0; \sigma_{acceptor} - \sigma_{HB})) \quad \text{Ec. 7}$$

Donde

$$\sigma_{acc} = \max[\sigma, \sigma'] \quad \text{and} \quad \sigma_{don} = \min[\sigma, \sigma']$$

En donde  $c_{HB}$  y  $\sigma_{HB}$  son parámetros ajustables que se refieren a la fuerza y umbral de los puentes de hidrógeno, respectivamente. La densidad de carga del donador de hidrógeno se presenta por  $\sigma_{donor}$  y  $\sigma_{acceptor}$  para el aceptor. Más aun, COSMO-RS también considera la energía de interacción dependiente de las propiedades de cada átomo (energías de Van Der Waals), independiente de las densidades de carga de las moléculas ( $E_{vdw}$ ):

$$E_{vdw} = a_{eff} (\tau_{vdw} + \tau'_{vdw}) \quad \text{Ec. 8}$$

Esta ecuación es fuertemente dependiente del tipo de átomo y el cálculo de esta energía de Van Der Walls se basa en contactos efectivos entre áreas y parámetros de interacción del elemento, denotados por  $\tau$  y  $\tau'$ , respectivamente. Una vez que todas esas energías son computadas, COSMO-RS calcula la energía total del sistema ( $E_{TMI}$ ). En este parámetro la teoría integra una corrección de energía dependiente del número y tipo de anillos aromáticos que se encuentren en las moléculas. En consecuencia, la energía total puede interpretarse como la sumatoria de todas las interacciones favorables y desfavorables entre los solutos y es un reflejo de la energía interna del sistema. Conceptualmente y representativamente COSMO-RS describe el potencial químico  $\mu_s(\sigma)$  de segmentos de una superficie con densidad de carga  $\sigma$  en un conjunto con  $\sigma'$ , por medio de una función de distribución normalizada  $p_s(\sigma')$  como:

$$\mu_s(\sigma) = -\left(\frac{RT}{a_{eff}}\right) \ln \left[ \int p_s(\sigma') \exp \left\{ \frac{a_{eff}}{RT} [\mu_s(\sigma') - E_{misfit}(\sigma, \sigma') - E_{HB}(\sigma, \sigma')] \right\} d\sigma' \right] \quad \text{Ec. 9}$$

Por medio de esta ecuación el potencial químico del compuesto  $X_i$  en el sistema  $S_i$  está disponible para la integración del potencial ( $\sigma$ -potential) sobre la superficie de  $X_i$  el cual puede ser empleado para calcular el coeficiente de actividad  $\gamma_{xi}$  en  $S$ :

$$\gamma_{xi}^S = \exp \left[ \frac{\mu_s^{X_i} - \mu_x^{X_i}}{RT} \right] \quad \text{Ec. 10}$$

En esta ecuación,  $\mu_s$  y  $\mu_x$  son los potenciales químicos de la especie  $X$  en  $S$  y en  $X$  puro, respectivamente.

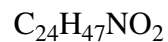
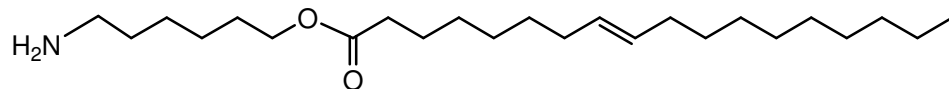


## **Anexo 2**

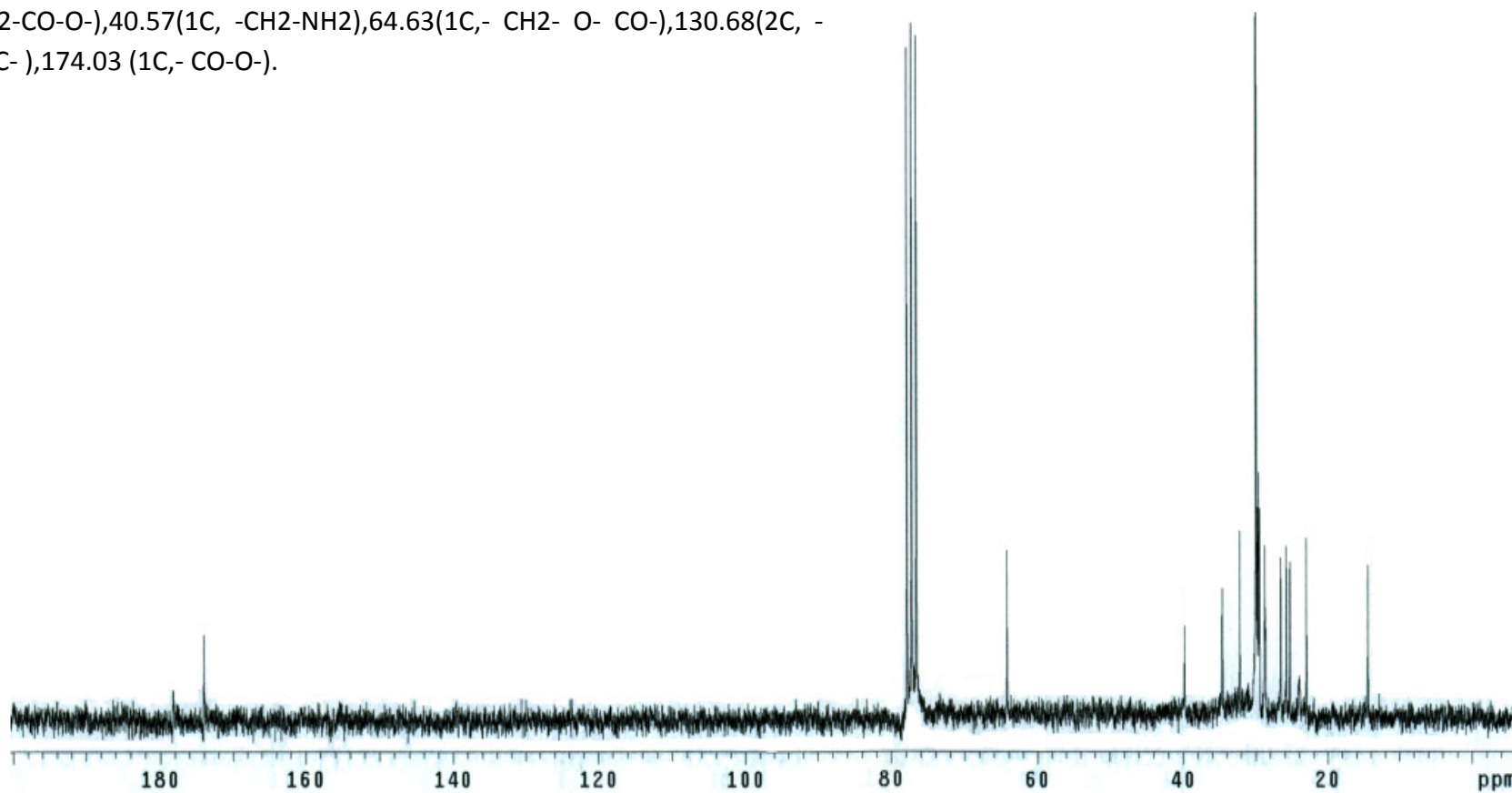
*Espectros:*

- *Resonancia Magnética Nuclear (RMN)*
- *Espectroscopía Infrarroja (IR)*
- *Espectrometría de Masas (MS)*

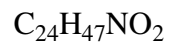
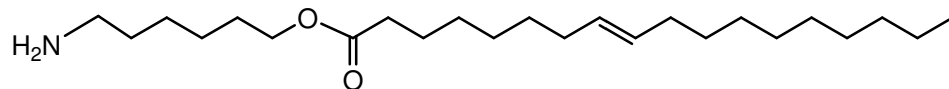
## O-oleilaminohexanol



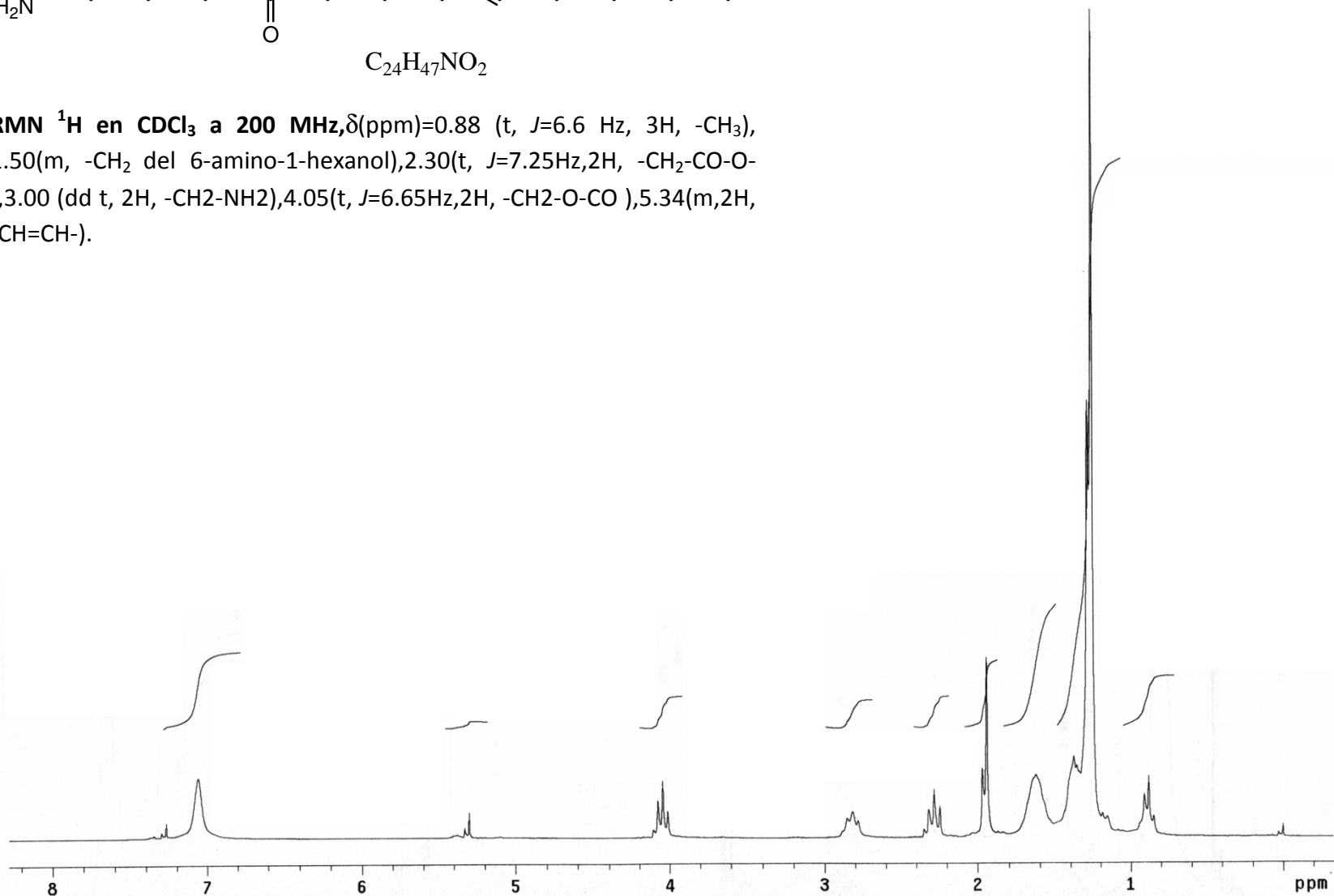
RMN  $^{13}C$  en  $CDCl_3$  a 200 MHz,  $\delta$  (ppm)= 14.77(1C, -CH<sub>3</sub>), 23.35(1C, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-), 25.65-32.58(múltiples picos, -CH<sub>2</sub>- de la cadena oleil), 35.02(1C, -CH<sub>2</sub>-CO-O-), 40.57(1C, -CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 64.63(1C, -CH<sub>2</sub>-O-CO-), 130.68(2C, -C=C-), 174.03 (1C, -CO-O-).



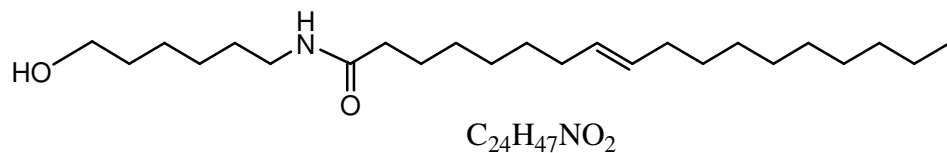
## O-oleilaminohexanol



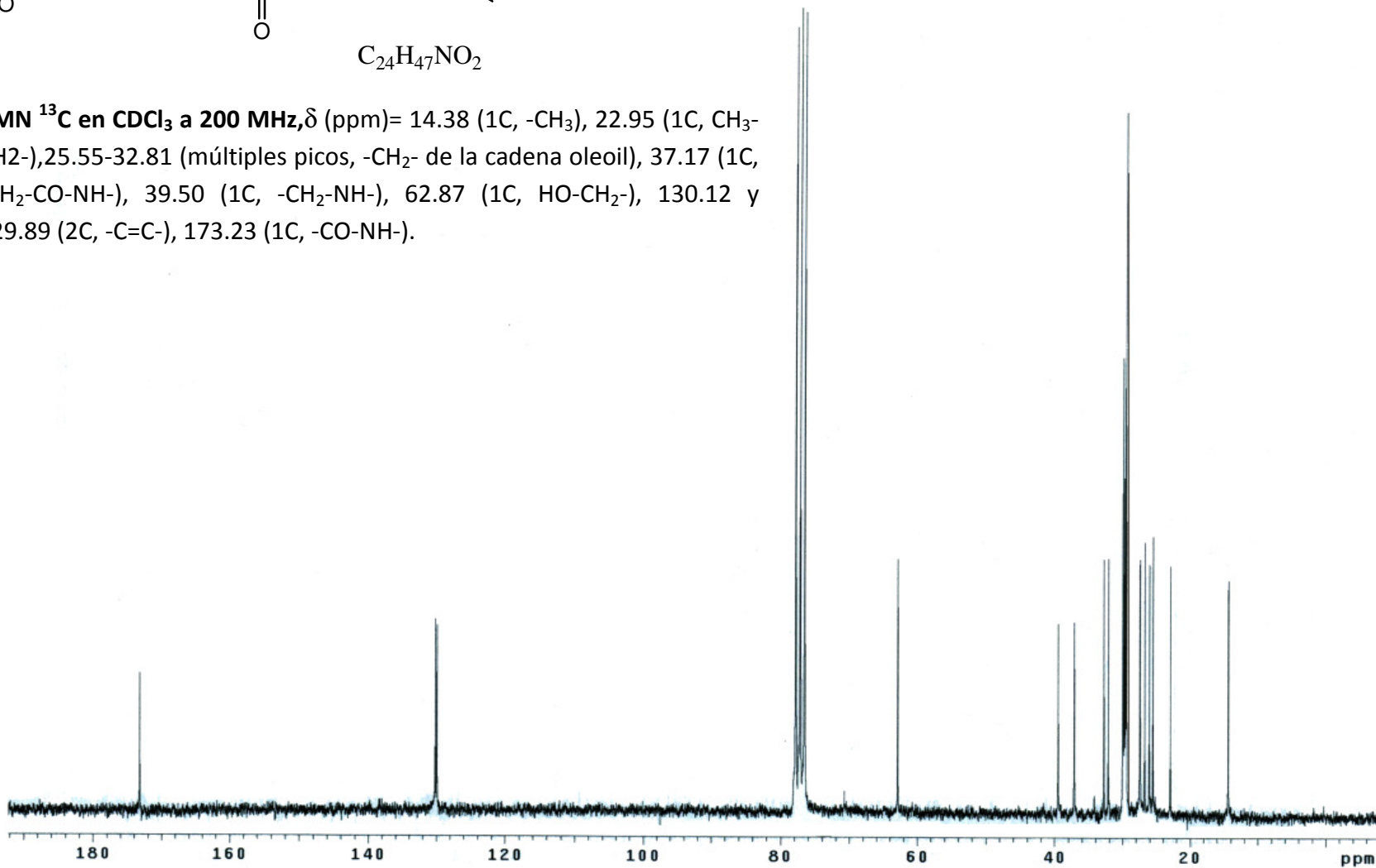
**RMN  $^1H$  en  $CDCl_3$  a 200 MHz,**  $\delta$ (ppm)=0.88 (t,  $J=6.6$  Hz, 3H,  $-CH_3$ ), 1.50(m,  $-CH_2$  del 6-amino-1-hexanol), 2.30(t,  $J=7.25$ Hz, 2H,  $-CH_2-CO-O-$ ), 3.00 (dd t, 2H,  $-CH_2-NH_2$ ), 4.05(t,  $J=6.65$ Hz, 2H,  $-CH_2-O-CO-$ ), 5.34(m, 2H,  $-CH=CH-$ ).



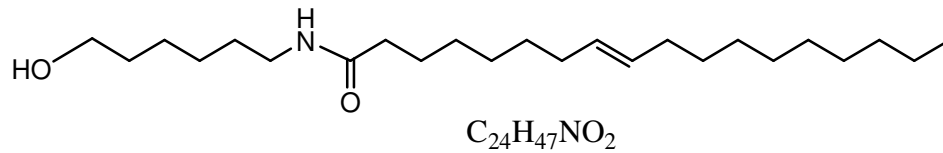
## N-oleilaminohexanol



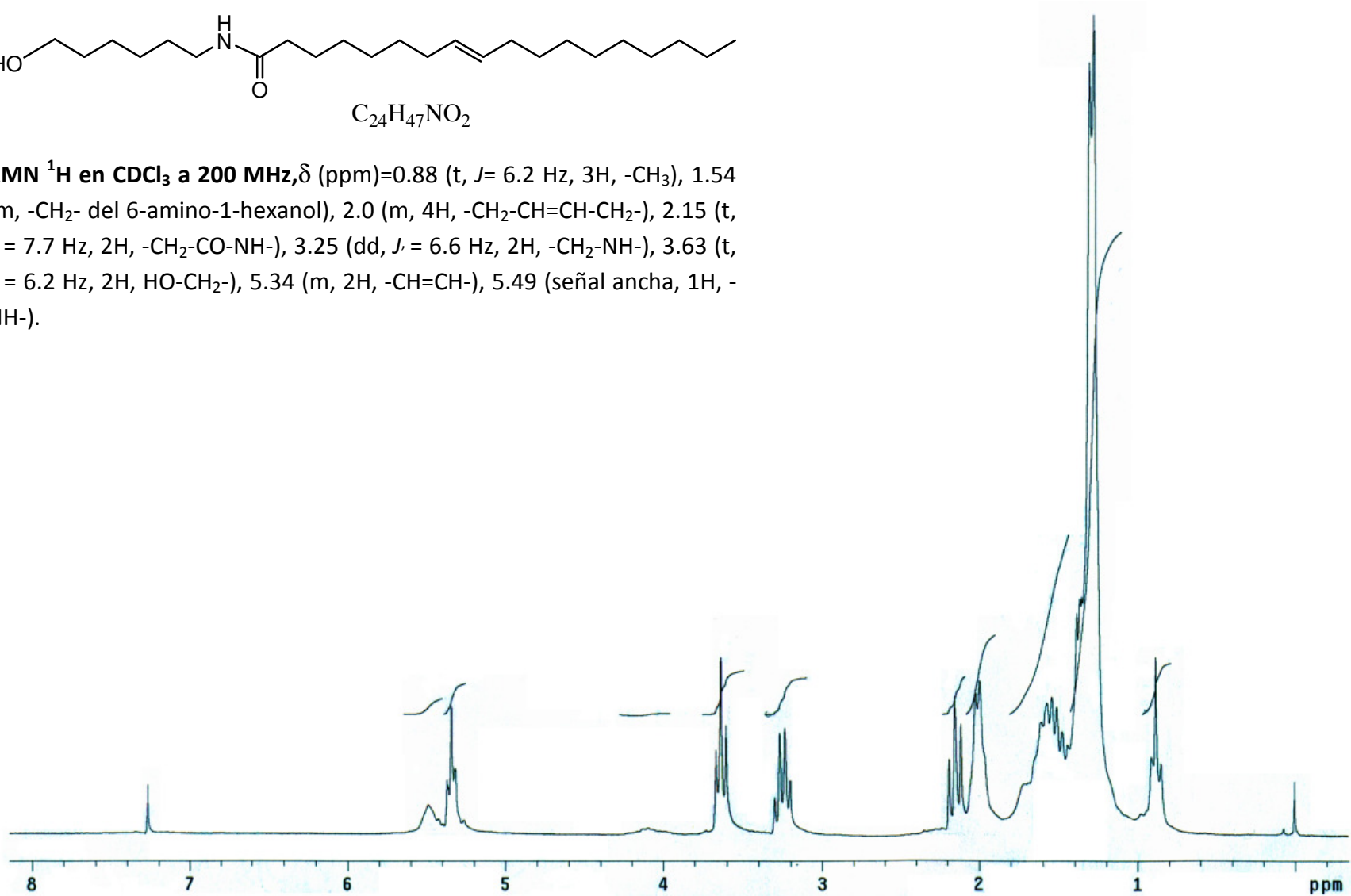
RMN  $^{13}C$  en  $CDCl_3$  a 200 MHz,  $\delta$  (ppm) = 14.38 (1C,  $-CH_3$ ), 22.95 (1C,  $CH_3-CH_2-$ ), 25.55-32.81 (múltiples picos,  $-CH_2-$  de la cadena oleoil), 37.17 (1C,  $-CH_2-CO-NH-$ ), 39.50 (1C,  $-CH_2-NH-$ ), 62.87 (1C,  $HO-CH_2-$ ), 130.12 y 129.89 (2C,  $-C=C-$ ), 173.23 (1C,  $-CO-NH-$ ).



## N-oleilaminohexanol

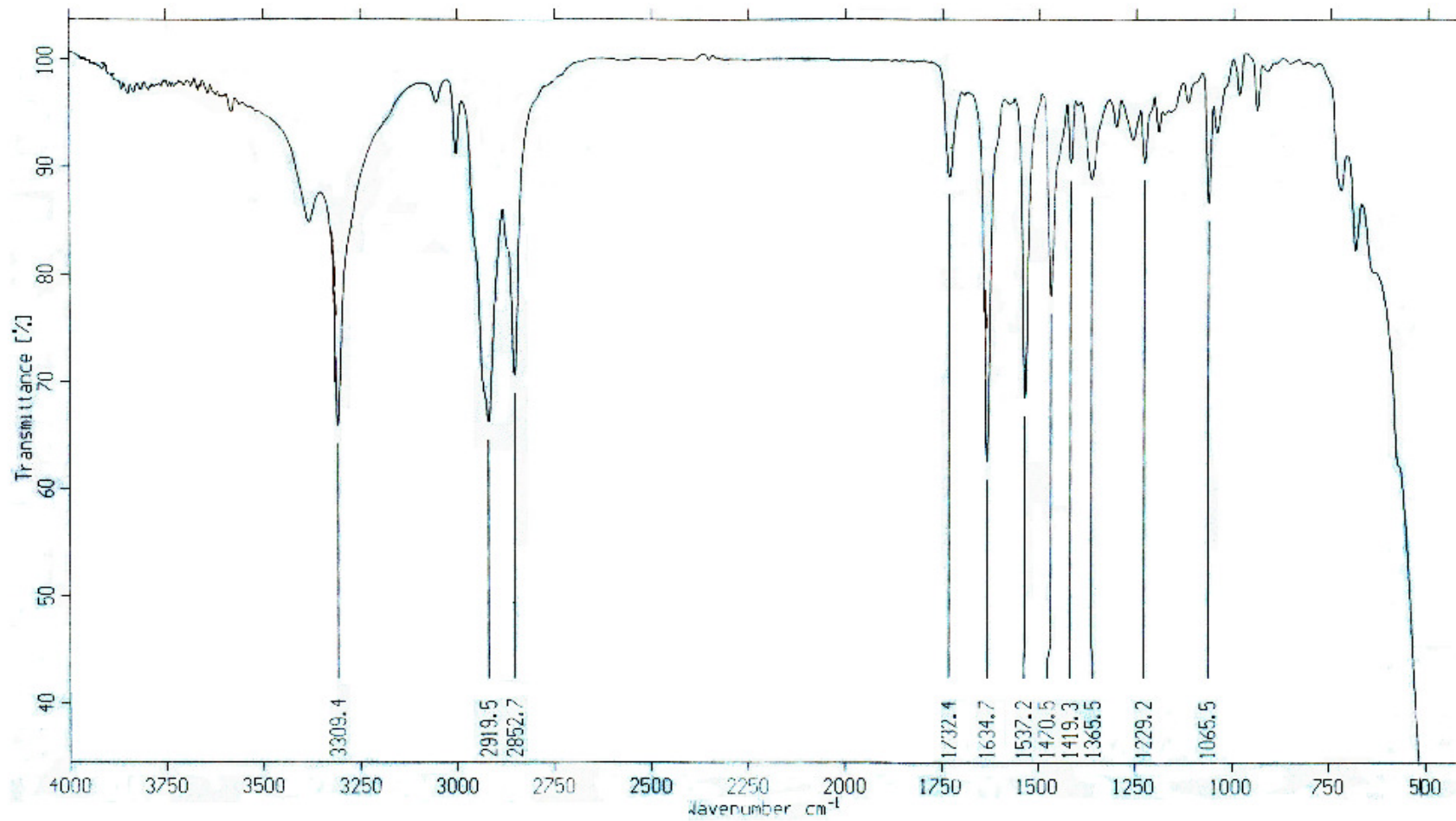
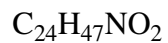
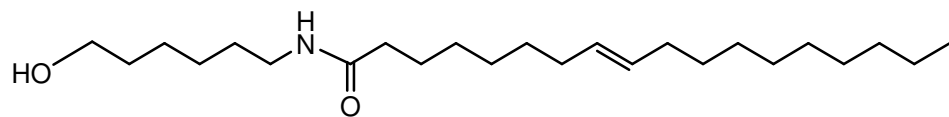


**RMN  $^1H$  en  $CDCl_3$  a 200 MHz,  $\delta$  (ppm)=0.88 (t,  $J$ = 6.2 Hz, 3H,  $-CH_3$ ), 1.54 (m,  $-CH_2-$  del 6-amino-1-hexanol), 2.0 (m, 4H,  $-CH_2-CH=CH-CH_2-$ ), 2.15 (t,  $J$ = 7.7 Hz, 2H,  $-CH_2-CO-NH-$ ), 3.25 (dd,  $J$ = 6.6 Hz, 2H,  $-CH_2-NH-$ ), 3.63 (t,  $J$ = 6.2 Hz, 2H,  $HO-CH_2-$ ), 5.34 (m, 2H,  $-CH=CH-$ ), 5.49 (señal ancha, 1H,  $-NH-$ ).**



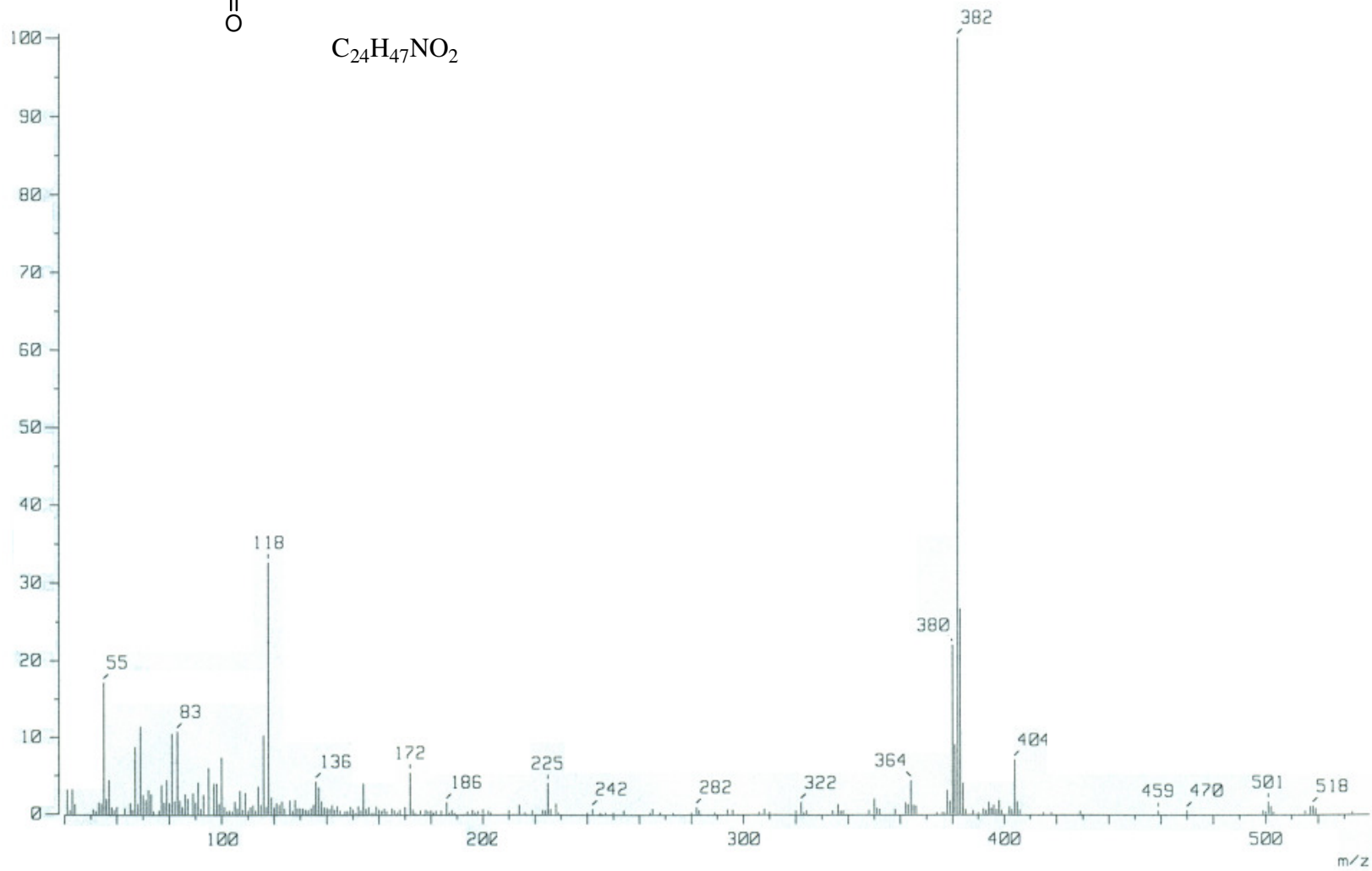
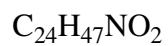
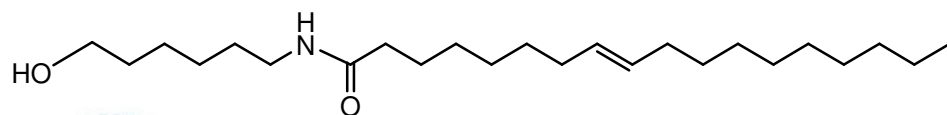
# N-oleilaminohexanol

Espectro IR

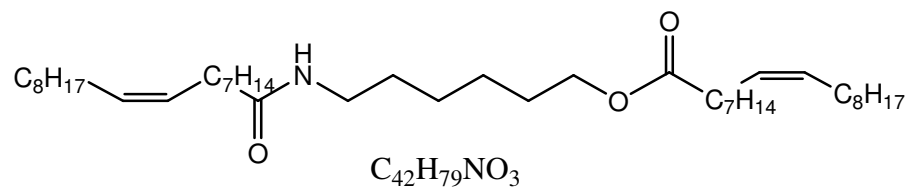


# N-oleilaminohexanol

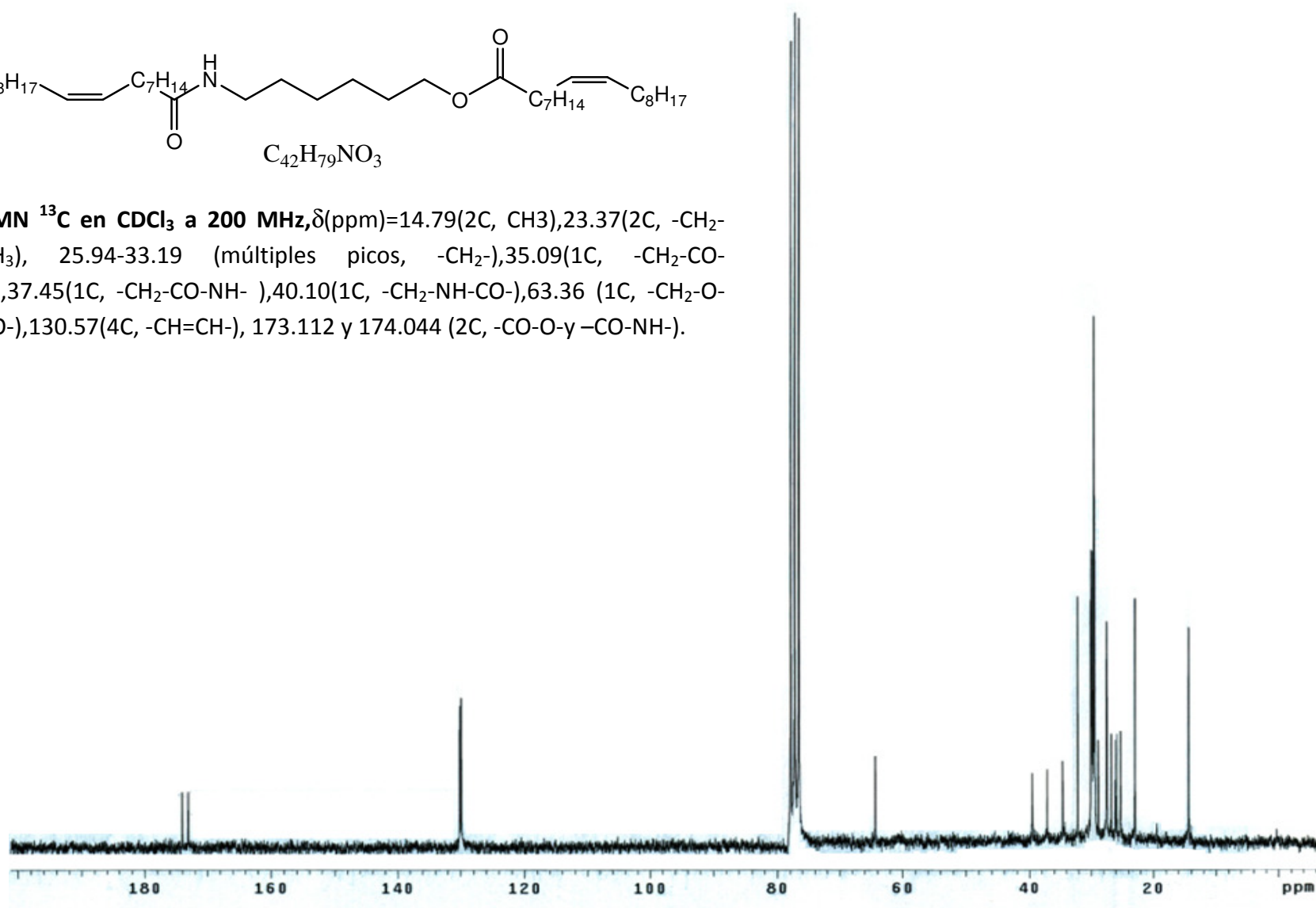
Espectro MS



## N,O-dioleilaminohexanol

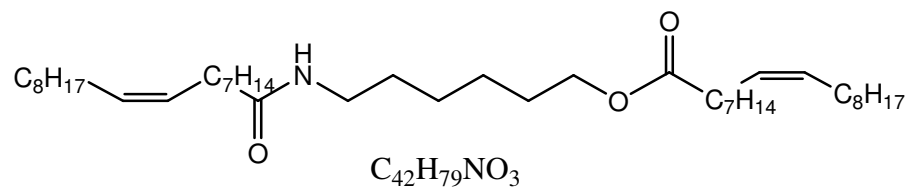


RMN <sup>13</sup>C en CDCl<sub>3</sub> a 200 MHz, δ(ppm)=14.79(2C, CH<sub>3</sub>), 23.37(2C, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 25.94-33.19 (múltiples picos, -CH<sub>2</sub>-), 35.09(1C, -CH<sub>2</sub>-CO-O), 37.45(1C, -CH<sub>2</sub>-CO-NH-), 40.10(1C, -CH<sub>2</sub>-NH-CO-), 63.36 (1C, -CH<sub>2</sub>-O-CO-), 130.57(4C, -CH=CH-), 173.112 y 174.044 (2C, -CO-O-y -CO-NH-).

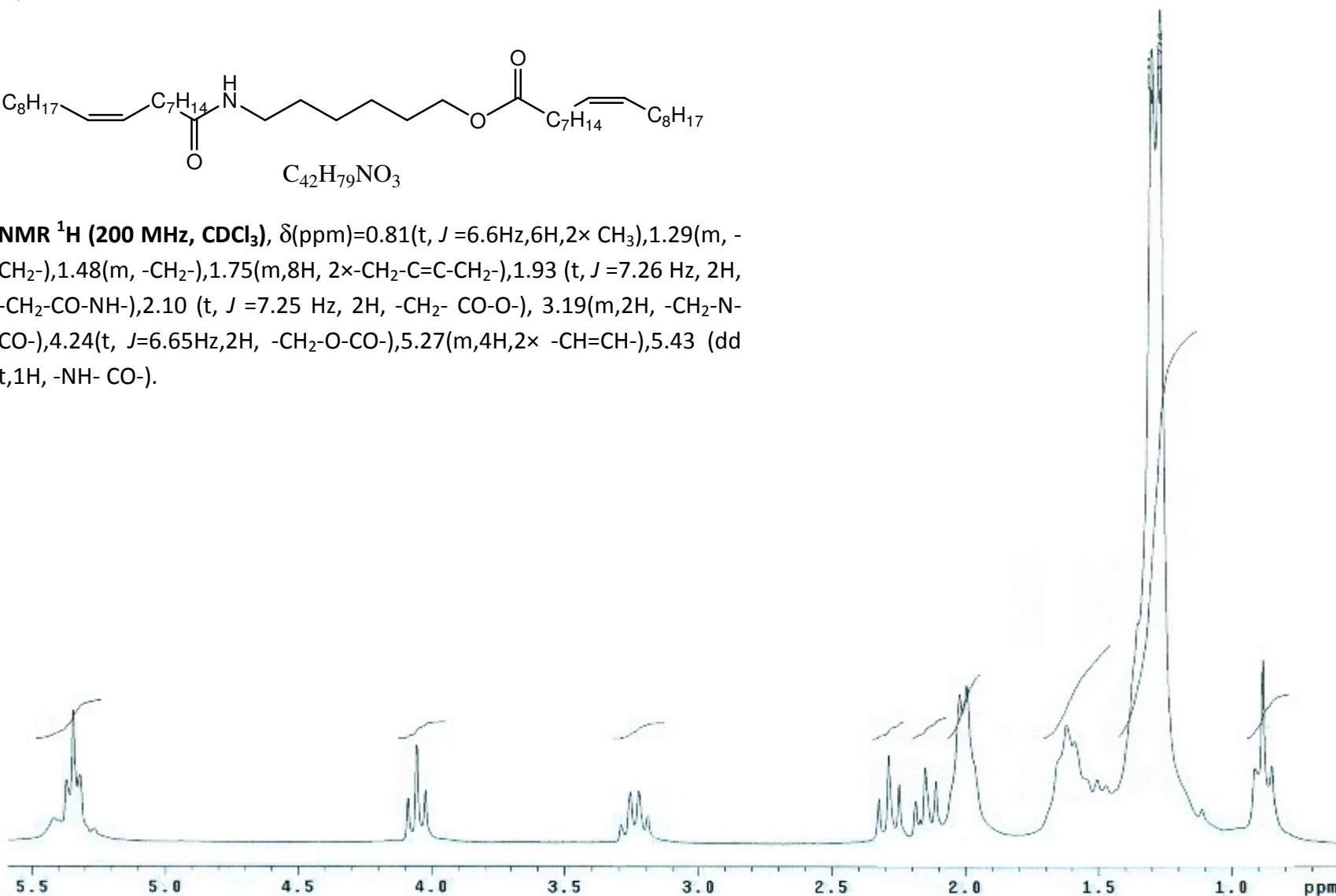




## N,O-dioleilaminohexanol

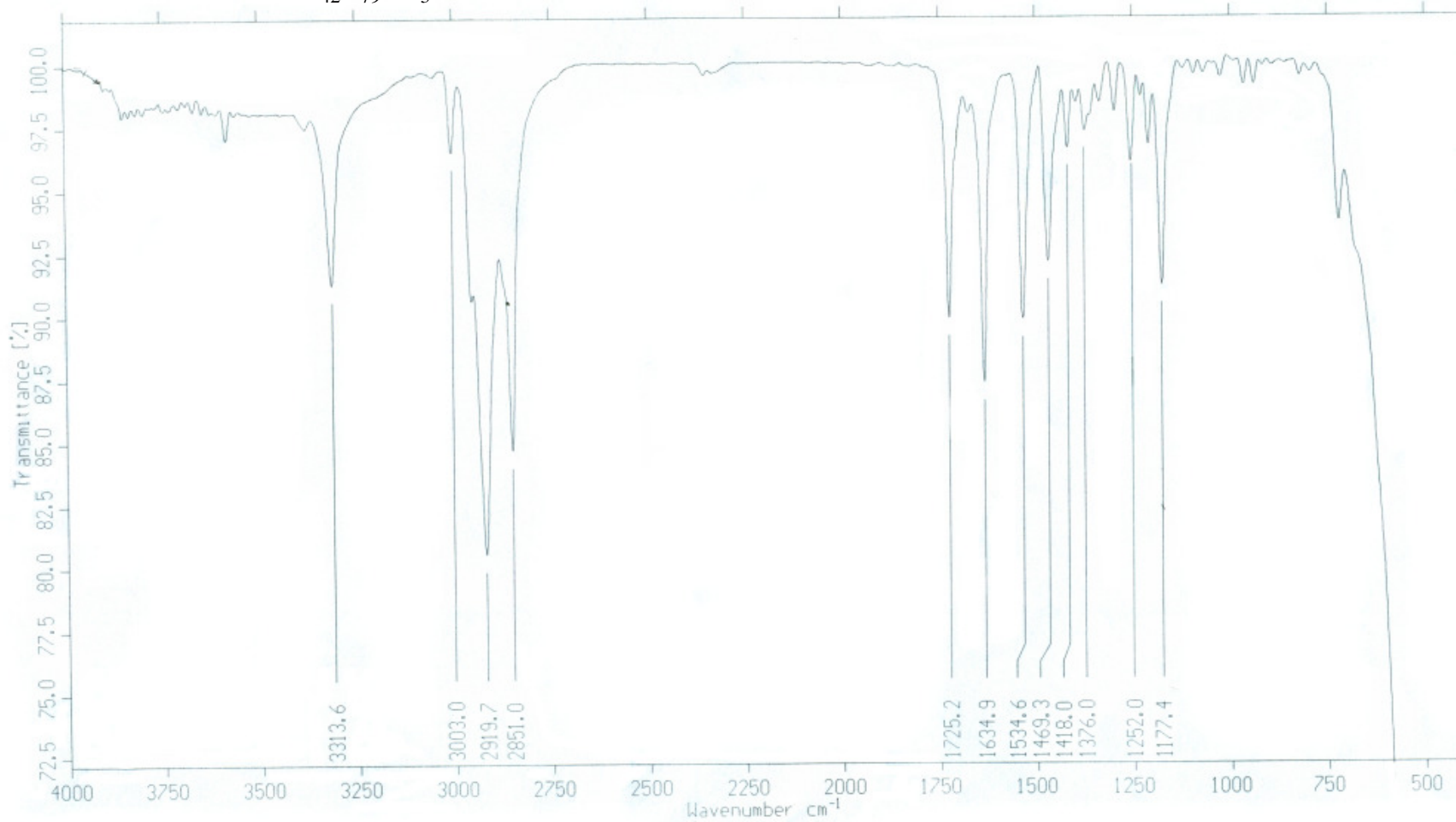
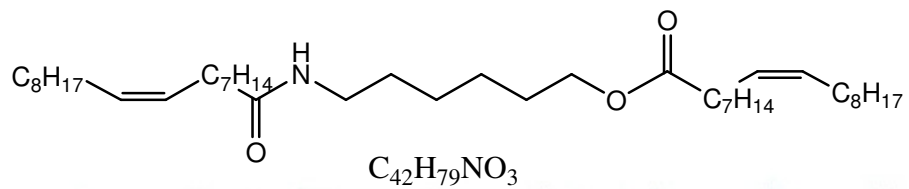


**NMR <sup>1</sup>H (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ(ppm)**=0.81(t, *J* =6.6Hz,6H,2× CH<sub>3</sub>),1.29(m, -CH<sub>2</sub>-),1.48(m, -CH<sub>2</sub>-),1.75(m,8H, 2×-CH<sub>2</sub>-C=C-CH<sub>2</sub>-),1.93 (t, *J* =7.26 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>-CO-NH-),2.10 (t, *J* =7.25 Hz, 2H, -CH<sub>2</sub>- CO-O-), 3.19(m,2H, -CH<sub>2</sub>-N-CO-),4.24(t, *J*=6.65Hz,2H, -CH<sub>2</sub>-O-CO-),5.27(m,4H,2× -CH=CH-),5.43 (dd t,1H, -NH- CO-).



# N,O-dioleilaminohexanol

Espectro IR



# N,O-dioleilaminohexanol

Espectro MS

