



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**Estudio comparativo de la actividad aminoacilasa
de polvos acetónicos de riñón de mamíferos en la
resolución de *N*-acetil-DL-aminoácidos**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

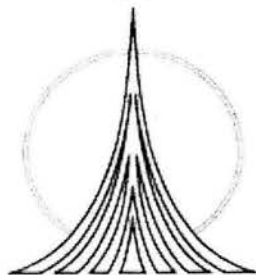
P R E S E N T A:

VÍCTOR JAVIER ZALDÍVAR MACHORRO

Director de Tesis: M. en C. José Ignacio Regla Contreras.
Asesor de Tesis: Dr. Mario L. Calcagno.

MÉXICO, D.F.

Septiembre 2004





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.



Especialmente dedicado a:

Mis padres

Clara y Esteban

A mis hermanos

*Juana, Vero, Noé, Ramón, Ana y
Zully.*

A mis primas: Ana, Eli y Marlen.

A mis sobrinos y tíos.

Por todo el tiempo sacrificado.

Gracias por su apoyo moral, cariño y sobre todo confianza.

Con amor, respeto y admiración.

Víctor Javier Zaldívar Machorro.



Agradecimientos

Al Dr. Mario Calceagno: por todo el apoyo, comentarios y tiempo brindado.

*A la Mtra. Patricia Demare Negrete: a quien admiro y respeto, gracias por el apoyo incondicional
brindado, por su confianza, y sobre todo por brindarme su amistad.*

El más sincero agradecimiento.

*Al Dr. Eusebio Juaristi y al Q.F.B. Roberto C. Melgar Fernández por su ayuda en la realización de los
estudios espectroscópicos de este trabajo.*

*Al Dr. Lainbarry del rastro la La Aurora en Ciudad Nezahualcoyotl, por la aportación de riñones de borrego,
cerdo y res. Al Dr. Fernando Hernández del centro de control canino, Iztapalapa, D.F., por la aportación de
riñones de perro.*

A mis sinodales por los consejos y observaciones.

A mis amigas (os) por los comentarios y apoyo moral.

A mis compañeras (os) del laboratorio:

Facultad de medicina

FES-Zaragoza

Luis Blancas, Martín, Laura J. Álvarez,

Lety Romero, Leonel, Mary I, Mary II, Talía,

Armando L., Mariana, Rodrigo Mora,

Rodrigo Glez., Nallely, e Jo (Napoleón).

Jessica Diaz y Eliza Ramirez.

A Tonatiuh. Gracias.

*Y a los que en este momento no recuerdo, pero que siempre estuvieron conmigo, y que tienen la suficiente Fe para ver su
nombre escrito en esta página.*



Nacho

.... Nunca voy a tener lo suficiente en este mundo para agradecerte todo el apoyo incondicional que me brindaste, la fe que en mi depositaste, tus atinados consejos y la constancia con que me llevaste por el buen camino....

....Por las risas, las horas de trabajo y los logros obtenidos...

Gracias



El presente trabajo se realizó en el laboratorio de síntesis de medicamentos L-329, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza-UNAM y el laboratorio de Físico-química e Ingeniería de Proteínas del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina UNAM, bajo la dirección del C. Dr. José Ignacio Regla Contreras y la asesoría del Dr. Mario L. Calcagno.

El presente trabajo fue presentado en el XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas celebrado del 2 al 6 de Noviembre del 2003 en Cancún, Quintana Roo, México.

De este trabajo se publicó un artículo en la revista científica: Tetrahedron: Asymmetry.

I. Regla, H. Luna, H. I. Pérez, P. Demare, I. Bustos-Jaimes, **V. J. Zaldívar** and M. L. Calcagno, (2004), Enzymatic resolution of *N*-acetyl-homophenylalanine with mammalian kidney acetone powders, *Tetrahedron: Asimetry.*, **15**, 1285–1288



Ningún árbol es fuerte sin continuos vientos; pues con ellos se fortifican sus raíces.

Seneca

Lo que es válido para la bacteria lo es para el elefante.

Jacques Monod

Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un sabio en su laboratorio no es solamente un teórico. Es también un niño colocado ante los fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.

Marie Curie

Mi consejo a los estudiantes de ciencia es que si desean ardientemente investigar, deberían hacerlo por todos los medios. Nada debería interponerse al deseo intenso de dedicar la vida a la Ciencia. Si tienes el anhelo de llevar a cabo investigación científica adquiere el aprendizaje preciso y por todos los medios hazlo. Difícilmente alguna otra cosa te dará tanta satisfacción y, sobre todo, tal sentido de logro

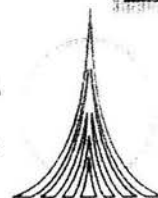
Severo Ochoa



Estudio comparativo de la resolución de la *N*-acetil D,L homofenilalanina por métodos químicos y enzimáticos

Celcagno L. Mario¹, Demare N. Patricia¹, Luna C. Héctor², Pérez Herminia I.², Regla C. Ignacio¹, Zaidívar M. Víctor¹ y Zamudio V. Leonel¹.

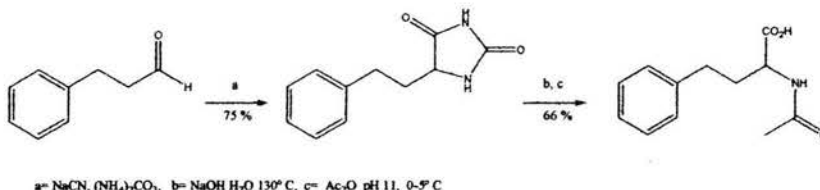
¹Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. ²Departamento de Sistemas Biológicos, UAM Xochimilco
³Laboratorio de fisicoquímica e ingeniería de proteínas Facultad de Medicina UNAM



INTRODUCCIÓN

La mayoría de los fármacos Inhibidores de la Enzima Convertidora de la Angiotensina (IECA) poseen en su estructura un fragmento de L-homofenilalanina, el cual puede ser introducido eficientemente mediante un desplazamiento nucleofílico de la correspondiente amina quiral sobre un éster (*R*)- α -arilsulfonilo, con inversión de configuración. El éster quiral puede ser obtenido eficientemente a partir de la D-homofenilalanina (D-HFA).

Otra estrategia sintética emplea directamente el éster etílico de la L-HFA. Puesto que ambos enantiómeros de la HFA tienen aplicación potencial como IECA, pensamos que una ruta de síntesis que comprenda una resolución sería una buena estrategia, y decidimos evaluar esta resolución tanto por métodos químicos como enzimáticos.

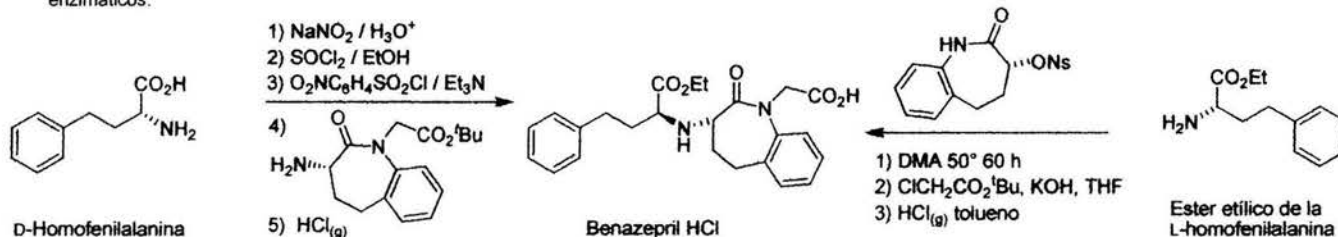


a= NaCN, (NH₄)₂CO₃, b= NaOH H₂O 130° C, c= Ac₂O pH 11, 0-5° C

Aunque se han descrito varios métodos para la preparación de ambos enantiómeros de HFA, la mayoría no tienen aplicación práctica, debido principalmente a factores económicos. El alto costo de las enzimas puede hacer inviable un proceso bioquímico, por lo que el empleo de preparados enzimáticos crudos puede ser una solución, siempre y cuando las otras enzimas presentes en estos preparados no interfieran en la transformación deseada.

OBJETIVO

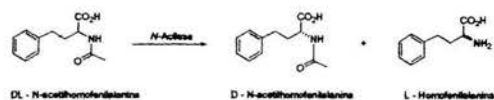
Obtener los enantiómeros de la homofenilalanina (HFA) mediante la síntesis y resolución de la *N*-Ac-DL-HFA, evaluando para su resolución, métodos químicos consistentes en la formación de sales diastereoméricas con diferentes aminas quirales, y enzimáticos, con una tecnología original consistente en el empleo de acilasa I cruda, contenida en polvos acetónicos de riñón de diferentes mamíferos.



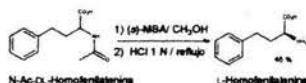
METODOLOGÍA

Método enzimático

La *N*-Ac-DL-HFA fue incubada a 37°C durante 24 horas, a pH 7.5 con los polvos acetónicos de riñón de bovino, de ovino y de porcino ($c = 40$ mg/mL de sustrato y 10mg/mL de polvo). La L-HFA se aisló precipitando a pH = 6.3 y la *N*-Ac-D-HFA se precipitó a pH = 2.3



Método químico



CONCLUSIONES

La resolución enzimática resultó un proceso más eficiente que la resolución química tradicional tanto en costos y tiempo de proceso, como en rendimiento y pureza óptica.

Se eliminó el uso de agentes resolutores quirales como la (*S*)-metilbencilamina, de alto costo y laboriosa recuperación.

De los polvos de riñón de mamífero evaluados, el de bovino resultó ser el más eficiente.

La metodología química y enzimática desarrollada tiene potencial aplicación comercial en la industria farmoquímica.

RESULTADOS

Tabla 1. L-HPA de la resolución enzimática de *N*-DL-AcHFA

Mamífero	Rendimiento %	[α] (c=1, 3N HCl)	p.f. °C	ee %
Ovino	68	+35.29°	> 300	nd
Bovino	80	+45.77°	> 300	nd
Porcino	83	+40.47°	> 300	nd

Tabla 2. D-*N*-Ac-HPA de la resolución enzimática de *N*-DL-AcHFA

Mamífero	Rendimiento %	[α] (c=1, MeOH)	p.f. °C	ee %
Ovine	52	-17.58°	168-170	nd
Bovine	75	-19.54°	177-178	> 99
Porcine	65	-21.29°	177-178	nd

Tabla 3. Resolución química de *N*-DL-AcHFA

	Rendimiento %	[α]	p.f. °C	ee %
D- <i>N</i> -Ac-HFA	53.1	-18.85	176-178	nd
L- <i>N</i> -AcHFA	61.7	+18.68	176-178	nd
D-HFA	77.3	-42.42	>300	nd

Agradecimientos

A la DGAPA de la UNAM por el apoyo otorgado a través del PASPA, a los Drs Jácome y Lainbarry del rastro "La Aurora" por el abastecimiento de riñones de animales recién sacrificados.

Enzymatic resolution of *N*-acetyl-homophenylalanine with mammalian kidney acetone powders

Ignacio Regla,^{a,b,*} Héctor Luna,^a Herminia I. Pérez,^a Patricia Demare,^b
Ismael Bustos-Jaimes,^c Victor Zaldívar^{b,c} and Mario L. Calcagno^c

^aDepto. Sistemas Biológicos, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Apdo. Postal 23-181, México, D.F., Mexico

^bLaboratorio de Síntesis de Fármacos, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 09230, México, D.F., Mexico

^cLaboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), PO Box 70-159, 04510 México, D.F., Mexico

Received 5 January 2004; accepted 24 February 2004

Abstract—Kidney acetone powders (KAP) from beef, dog, hog, rat, and sheep have been evaluated for resolving *N*-acetyl-DL-homophenylalanine. We also propose a simple protocol for the preparation of both enantiomers of homophenylalanine by enzymatic resolution using mammalian KAP. The beef kidney afforded the best results, rendering the highest isolated yields, 37.5% and 41% and enantiomeric excesses of 94% and >99% for both D-*N*-Ac-homophenylalanine and L-homophenylalanine, respectively.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Most of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors, such as Benazepril **1**, Temocapril **2**, Cilazapril **3**, and Enalapril **4** (Fig. 1), contain an L-homophenylalanine ethyl ester moiety in their structure, which can

be efficiently introduced through nucleophilic displacement of the corresponding chiral amine over (*R*)-2-nosyloxy-4-phenylbutyric acid ethyl ester **5**, as shown in Scheme 1 for the synthesis of Benazepril **1**,¹ with a concomitant inversion of configuration. The homochiral α -substituted ester **5** can be obtained from D-homophenylalanine (D-HPA) **6** (Scheme 2).

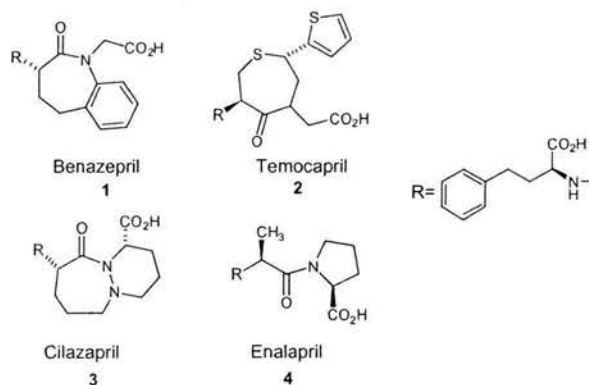
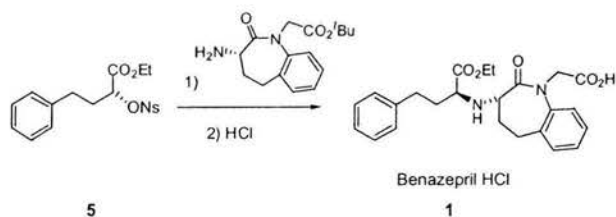
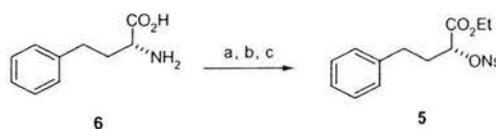


Figure 1. Some ACE inhibitors holding the L-HPA moiety.

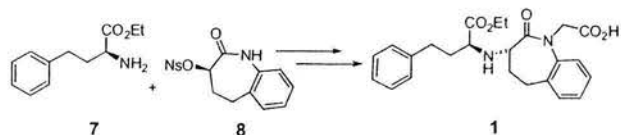


Scheme 1. Synthesis of Benazepril from (*R*)-2-nosyloxy-4-phenylbutyric acid ethyl ester.



Scheme 2. Reagents: (a) NaNO₂, H₂SO₄, H₂O (89%); (b) SOCl₂, ethanol, (65%); (c) NsCl, Et₃N (74%).

* Corresponding author. Tel.: +52-55-5623-0727; fax: +52-55-5642-8977; e-mail: regla@servidor.unam.mx

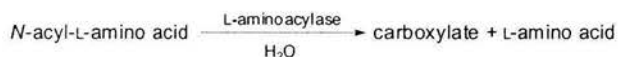


Scheme 3. Synthesis of Benazepril from L-HPA-ethyl ester.

Recently, Chang and Yang² reported a new synthetic strategy for the synthesis of Benazepril **1**, one of the most potent ACE inhibitors, which makes use of L-homophenylalanine ethyl ester **7** for the nucleophilic attack of 4-nitrobenzenesulfonic acid (3*R*)-2-oxo-2,3,4,5-tetrahydro-1*H*-benzo[*b*]azepin-3-yl ester **8**, as shown in Scheme 3. Both enantiomers of homophenylalanine (HPA) have a potential application in the synthesis of ACE inhibitors.

While a great variety of methods for the preparation of both enantiomers of HPA have been reported,^{3a–g} many of them are impractical, mainly due to their cost. Although the enzymatic resolution of HPA ethyl ester by lipases has been described,^{3c} to the best of our knowledge, no report has been made on an enzymatic resolution strategy using aminoacylases.

Enzymatic resolution of amino acid derivatives is usually a simple and efficient method for the preparation of enantiopure amino acids. One of the most widely used enzymes for carrying out the resolution of α -acylamido acids is the pig kidney L-aminoacylase (*N*-acyl-L-amino acid amidohydrolase, EC 3.5.1.14), which is commercially available.⁴ This enzyme catalyzes the following reaction:



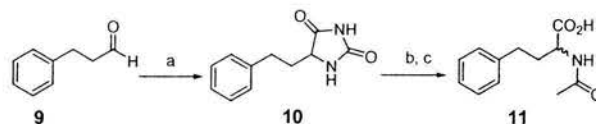
Despite the convenience of chemo-enzymatic methods in synthetic organic chemistry, there still exists some uneasiness amongst some synthetic chemists regarding the handling of enzymes and other biochemical techniques. Furthermore, most commercially available enzymes are expensive and can be unstable, unless kept under specific storage conditions. Most of these drawbacks could be avoided by using crude enzymatic preparations; however, the use of these raw preparations is much less explored than the use of pure enzymes.^{5a–e} Herein, we report results on the evaluation of the kidney acetone powders (KAPs) from different mammalian species such as beef, dog, hog, rat, and sheep for resolving *N*-acetyl-DL-HPA **11**. We also propose a practical and reliable protocol for the preparation of both enantiomers of HPA by enzymatic resolution using mammalian KAP.

2. Results and discussion

As part of our studies toward the synthetic development of precursors for the manufacture of enantiopure ACE

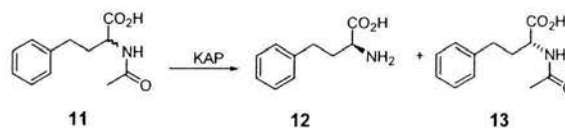
inhibitors, we explored a practical procedure for the synthesis of D-HPA. As a result, a new synthetic approach for the synthesis of Benazepril **1**, involving the use of L-HPA was described;² this procedure is potentially suitable for the synthesis of other ACE inhibitors. As both enantiomers of HPA can be used as precursors to ACE inhibitors,^{2,3a–j} we believe a resolution strategy is an appropriate choice.

Racemic *N*-acetyl-HPA **11** was obtained in a typical α -amino acid synthetic pathway involving hydrolysis of 5-phenethylhydantoin **10**, which was prepared by a Bucherer–Bergs protocol,⁶ with an overall yield of 50% from 3-phenylpropanaldehyde **9** (Scheme 4).



Scheme 4. Reagents and conditions: (a) KCN, (NH₄)₂CO₃ (75%); (b) NaOH, H₂O, 130 °C (74%); (c) Ac₂O, NaOH, 0–5 °C (90%).

The *N*-acyl amino acid **11** was subjected to enzymatic resolution with KAP from different mammalian species with their specific activities being calculated (Scheme 5).



Scheme 5. Enzymatic resolution of *N*-acetyl HPA with mammalian KAP.

In a preliminary test, kidneys from five species were explored: beef, dog, hog, rat, and sheep. Dog and rat KPAs did not produce significant bioconversion after 90 h of reaction, so, they were discarded from this study.

As shown in Tables 1 and 2, beef kidney acetone powder was the most efficient in this biotransformation, giving the highest isolated yields and enantiomeric excesses (ee) for both L-HPA **12** and D-*N*-Ac-HPA **13**.

In order to determinate the ees of **12** and **13** by chiral HPLC, it was necessary to derivatize both compounds into their corresponding methyl esters, using a method reported by Lin et al.⁹

Table 1. L-HPA **12** from enzymatic resolution of **11**

Mammalian	Isolated yield (%)	[α] ^a (<i>c</i> 1, 3 M HCl)	Ee ^b (%)
Sheep	34	+44.8	99.4
Beef	41	+45.2	99.9
Hog	40	+45.1	99.9

^a Lit.⁷ [α] = +47.5 (*c* 1.0, 1 M HCl).

^b Determined as the methyl ester on a CHIRALCEL OD column.

Table 2. D-*N*-Ac-HPA **13** from enzymatic resolution of **11**

Mammalian	Isolated yield (%)	$[\alpha]^a$ (c 1, CH ₃ OH)	Ee ^b (%)
Sheep	26%	-18.9	94
Beef	37.5%	-19.5	>99
Hog	33%	-19.4	96

^a Lit.⁸ $[\alpha] = -19.2$ (c 1.0, CH₃OH).

^b Determined as the methyl ester on a CHIRALCEL OD column.

A series of tubes containing varying substrate (*N*-acetyl-DL-homophenylalanine) concentration were prepared and the reaction started by the addition of the KAP extract. L-HPA was measured colorimetrically by the ninhydrin method modified by Doi et al.¹⁰ Commercial DL-HPA was used as standard.

Samples were taken at different times to follow the time course of the hydrolysis. Linear product concentration versus time was obtained for 360 min under our experimental conditions. From these data, initial reaction rates were calculated for each substrate concentration and the data fitted to hyperbolic kinetics by nonlinear regression analysis with the program Prism 3.0 cx for Macintosh. The fitted curve and parameters are shown in Figure 2.

From the obtained V_{\max} value and the measured protein concentrations in the sample, a specific activity of 3.9 $\mu\text{mole min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ was calculated for beef material.

A simplified estimation of the specific activities of sheep and hog extracts were performed by measuring the HPA produced over a fixed incubation time, at variable *N*-acetyl-DL-HPA concentration. Measured rates were lower than those in Figure 2, so the linearity of the reaction rate at each substrate concentration can be assumed with confidence. The data for all the KAP extracts are shown in Table 3.

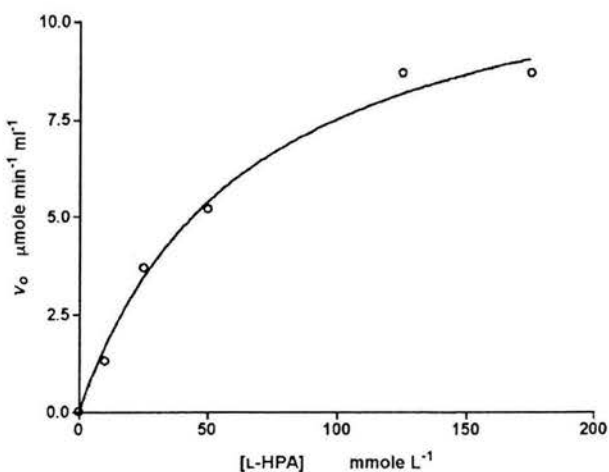


Figure 2. Curve of initial velocity against substrate concentration. Data fitted to Michaelis–Henri kinetics, as detailed in the text. Extract concentration, 3.165 mg mL⁻¹. V_{\max} , 12.4 ± 0.98 $\mu\text{mole min}^{-1} \text{mL}^{-1}$; $K_m = 65.0 \pm 12.7 \text{ mmole L}^{-1}$.

Table 3. Specific activities for the different KAPs

KAP	Specific activity ($\mu\text{mole min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
Beef	3.91
Hog	2.51
Sheep	2.54

3. Experimental

3.1. Preparation of kidney acetone powders

Beef, sheep, and hog kidneys were obtained from recently slaughtered animals from a nearby slaughterhouse. Dog kidneys were supplied by the local dog control center and rat kidneys from the animal breeding facility of our university. Fresh sheep kidneys (142 g) were blended in 420 mL of chilled acetone using a household blender and filtered through a Büchner funnel. The cake was treated twice in the same manner, until the filtrate was colorless. The solid residue was air dried under the hood and sifted on a 20-mesh sieve. The procedure yielded 22.4 g of dry powder, which was kept at -20 °C. A similar procedure was used to obtain beef, dog, hog, and rat KAP. A typical KAP preparation kept its specific activity after six months.

3.2. Chemical synthesis

3.2.1. DL-Homophenylalanine 14. A 1 L stainless steel reactor was charged with 81.73 g (0.402 mol) of DL-5-phenethylhydantoin **10**, 400 mL of water and 48.31 g (1.207 mol) of NaOH. After closing the vessel, the mixture was heated for four hours at 130–132 °C. The reaction mixture was treated with activated charcoal for 5 min, filtered over diatomaceous earth and washed with water. After acidifying to pH 6.3 with 10 M HCl and cooling to 0–5 °C for 1 h, a beige powder crystallized out, which was filtered, washed with water, and dried at 60 °C until a constant weight was seen. The yield of **14** was 56.63 g (74.3%), mp 279–280 °C [lit.¹¹ m.p. 282 °C (dec)].

3.2.2. DL-N-Acetyl-homophenylalanine 11. To a cold solution of 12.5 g (69.7 mmol) of **14** in 115 mL of water, and 2.79 g (69.7 mmol) of NaOH (0–5 °C), were added 9.26 g (90.6 mmol) of acetic anhydride, while the pH was kept in the range 11–11.5 by adding 50% NaOH, at the same temperature. Temperature and pH were maintained for one hour; after acidifying to pH 2.3 with 10 M HCl, the mixture was kept at 0–5 °C for 1 h, filtered and washed with the minimum amount of water. The yield of compound **11** was 13.8 g (89.5%), m.p. 145–147 °C, [lit.¹² m.p. 147–148 °C].

3.3. Enzymatic hydrolysis

A mixture of 2.4 g of **11** and 60 mL of 0.2 M potassium phosphate buffer pH 7.5, containing 10 mg L⁻¹ of CoCl₂ was adjusted to pH 7.5 with 6 M NaOH. The solution

was divided into three 20 mL fractions; to each one, 200 mg of kidney acetone powders of beef, hog, and sheep, were added, respectively, and then incubated at 37 °C for 24 h in an orbital shaker at 250 rpm. After cooling to 5 °C, the pH was adjusted to 11.0 with 1 M NaOH under vigorous stirring and the reaction mixtures were centrifuged separately at 3200g and 5 °C for 15 min. Each supernatant was acidified to pH 6.3 with 6 M HCl and cooled to 0–5 °C for half an hour. The L-HPA **12** precipitate was filtered and the mother liquors saved. The solid was dissolved in 1 M HCl, treated with activated charcoal, filtered over diatomaceous earth and its pH again adjusted to 6.3, then filtered, washed with water and dried at 60 °C until constant weight. The yields of L-HPA **12** obtained for different KAPs are shown in Table 1. The filtrate from each of the above samples, containing unreacted D-N-Ac-HPA **13**, was adjusted to pH 2.3 with 10 M HCl, cooled to 0 °C for 2 h, vacuum filtered, washed with chilled water until the pH of the washing was between 3 and 4 and dried at 60 °C until constant weight. The yields of D-N-Ac-HPA **13** are shown in Table 2.

3.4. Determination of ee of **12** and **13**

3.4.1. L-Homophenylalanine methyl ester. L-HPA **12** (300 mg, 1.67 mmol) was suspended in anhydrous methanol (6 mL) and cooled to –10 °C in an ice-salt bath. Then, 156 µL (260 mg, 2.18 mmol) of thionyl chloride were added dropwise and the reaction mixture kept for 1 h at –5 to –10 °C and then at 40–45 °C until TLC monitoring (7:3 isopropanol–ammonium hydroxide; developed with 0.2% ninhydrine reagent spray) indicated the L-HPA had disappeared. The solution was then evaporated in a rotatory evaporator. The solid was dissolved in the minimum amount of cold water, made alkaline with sodium bicarbonate and extracted with ethyl acetate (3 × 5 mL), dried, and evaporated to dryness. The L-HPA methyl ester was submitted to chiral HPLC analysis, on a CHIRALCEL OD column; hexane–isopropanol (90:10). N-Acetyl-D-HPA **13** was treated as above to give the corresponding methyl ester, which was submitted to chiral HPLC analysis under the same conditions.

3.5. Enzyme assays and specific activity of L-aminoacylase in beef KAP

To measure L-aminoacylase activity in KAP, a soluble preparation was made by suspending 200 mg of each KAP in 10 mL of 0.2 M potassium phosphate buffer pH 7.5, at 5 °C. The suspension was centrifuged and the supernatant kept in an ice bath. Protein concentration was determined with the bicinchoninate method.¹³

Acknowledgements

The authors acknowledge Dr. Lainbarry from the slaughterhouse *La Aurora* in Ciudad Neza, who supplied the beef, hog, and sheep kidneys, and Dr. Fernando Hernández of the Dog Control Center, Iztapalapa, D.F., for supplying the dog kidneys. I. Regla also acknowledges the support received from DGAPA-PASPA, National Autonomous University of Mexico (UNAM).

References and notes

1. Boyer, S. K.; Pfund, R. A.; Portmann, R. E.; Sedelmeier, G. H.; Wetter, H. F. *Helv. Chim. Acta* **1988**, *71*, 337–343.
2. Chang, C.; Yang, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14*, 2239–2245.
3. (a) Hu, Q.; Wang, G.; Wang, X.; Wu, T.; Pan, X.; Chan, A. S.; Yang, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, *11*, 2309; (b) Williams, R. M.; Sinclair, P. J.; Zhai, D. G.; Chen, D. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1547–1557; (c) Houng, J.-Y.; Chung-L. US Patent 5552317, 1995; (d) Ben-Ishal, D.; Moshenberg, R. *Tetrahedron* **1977**, *33*, 1533–1542; (e) Pulley, S. R.; Hegedus, L. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9037–9047; (f) Corey, E. J.; Link, J. O. *J. Org. Chem.* **1992**, *114*, 1906–1908; (g) Hashimoto, C.; Potier, P. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6062–6069; (h) Houng, J.-Y.; Wu, M.-L.; Chen, S.-T. *Chirality* **1996**, *8*, 418–422; (i) Christine, M.; Serreqi, A. N.; Huang, Q.; Kazlauskas, R. J. *J. Org. Chem.* **1994**, *59*, 2075–2081; (j) Chen, S.-T.; Huang, W.-H.; Wang, K.-T. *Chirality* **1994**, *6*, 572–576.
4. Kiss, A.; Boross, L. *Acta Biochim. Biophys Acta Sci. Hung* **1980**, *15*, 29.
5. (a) Sánchez, R.; Luna, H.; Pérez, H. I.; Manjarrez, N.; Solís, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, *12*, 1399–1401; (b) Basavaiah, D. *Arkiuoc* **2001**, 70–82; (c) Kazlauskas, R. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4953; (d) Whitesell, J. K.; Lawrence, R. M. *Chimia* **1986**, *40*, 318; (e) Adachi, K.; Kobayashi, S.; Ohno, M. *Chimia* **1986**, *40*, 311.
6. Ware, E. *Chem. Rev.* **1950**, *46*, 403–470.
7. Kubota, H.; Nunami, K.; Hayashi, K.; Hashimoto, Y.; Ogiku, N.; Matsuoka, Y.; Ishida, R. *Chem. Pharm. Bull. Jpn.* **1992**, *40*, 1619–1623.
8. Giannis, A.; Henk, T. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**, *8*, 789–793.
9. Lin, W.; He, Z.; Zhang, H.; Zhang, X.; Mi, A.; Jiang, Y. *Synthesis* **2001**, *7*, 1007–1009.
10. Doi, E.; Shibata, D.; Matoba, T. *Anal. Biochem.* **1981**, *118*, 173–184.
11. *Aldrich Catalog Handbook of Fine Chemicals*, Aldrich Chemical Co.: Milwaukee, 2003–2004; p 1004.
12. Andracco, J.; Smith, D.; Hartung, W. H. *J. Pharm. Sci.* **1961**, *50*, 337–340.
13. Walker, J. M. In *Methods in Molecular Biology*; Walker, J. M., Ed.; Humana: New Jersey, 1994; Vol. 32, pp 5–8.



Contenido

página

1. Introducción	1
2. Fundamentación teórica	3
3. Antecedentes	16
4. Planteamiento del problema	24
5. Objetivos	25
6. Hipótesis	26
7. Material, reactivos y equipo	27
8. Parte experimental	30
8.1. Procedimiento general para la preparación de los polvos acetónicos de riñón	30
8.2. Hidrólisis enzimática de <i>N</i> -acetil-DL-homofenilalanina, con polvos acetónicos de los riñones de mamíferos	30
8.3. Cuantificación de proteínas solubles de los polvos acetónicos de riñón de bovino, ovino y porcino	33
8.4. Determinación de la actividad específica de la aminoacilasa contenida en polvos acetónicos de riñón de bovino	34
8.5. Estudio preeliminar de la resolución enzimática de otros <i>N</i> -acetil-DL-aminoácidos	37
9. Resultados y discusión	39
10. Conclusiones	45
11. Anexos	47
12. Abreviaturas	51
13. Referencias	53



1. Introducción

Los compuestos orgánicos de origen natural que contienen en su estructura por lo menos un centro estereogénico, son ópticamente activos debido a que los organismos vivos tienden a producir un solo enantiómero. La asimetría de estas moléculas proviene de la quiralidad inherente a las enzimas responsables de su síntesis.

Los sitios receptores de los sistemas biológicos, que son también ópticamente activos, tienen la capacidad de diferenciar entre los dos enantiómeros de un compuesto específico. Aunque las aparentes diferencias físicas entre los dos enantiómeros parezcan insignificantes, la orientación espacial de un grupo funcional afecta drásticamente las propiedades farmacológicas de un compuesto.

Convincentes efectos diferenciales de interacciones farmacológicas de enantiómeros han llevado a un incremento en la importancia del diseño de fármacos enantioselectivos. Cerca del 66% de los nuevos fármacos introducidos en el año 2000 fueron enantiómeros puros, comparado con 21% en 1991.¹ La expectativa en relación con la pureza enantiomérica de nuevos fármacos se ha incrementado, lo que incide en una mayor trascendencia de los procesos de síntesis asimétrica o en de resolución de enantiómeros, así como en la tarea analítica de cuantificar el exceso enantiomérico.

Ambos enantiómeros de la homofenilalanina (ácido 2-amino-4-fenilbutanoico) tienen aplicación comercial en la manufactura de fármacos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), administrados para el tratamiento de la hipertensión arterial; entre ellos, un ejemplo importante es el benazepril, el cual puede ser preparado ya sea a partir de la D-homofenilalanina o a partir del éster etílico de la L-homofenilalanina (figura 1).

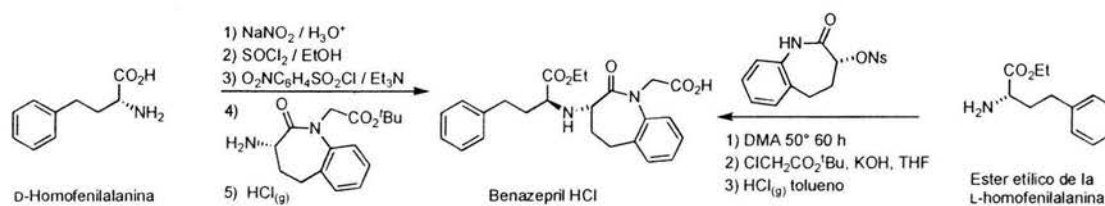


Figura 1. Síntesis convergente del Benazepril a partir de ambos enantiómeros de la homofenilalanina.¹⁵

En el presente trabajo se desarrolló un método biocatalítico para la resolución de la *N*-acetil-DL-homofenilalanina (figura 2), un aminoácido no natural, empleando polvos acetónicos de riñón de diferentes mamíferos como fuente de aminoacilasa, con potencial aplicación en la resolución de otros *N*-acetil-DL-aminoácidos.



Figura 2. Resolución enzimática de la *N*-acetil-DL-homofenilalanina.



2. Fundamentación teórica

Las proteínas son macromoléculas extremadamente complejas, que tienen múltiples funciones en el organismo; controlan las condiciones fisicoquímicas dentro de la célula, forman parte de las estructuras celulares y sobre todo catalizan una enorme variedad de reacciones que conducen el metabolismo en rutas esenciales que tienen lugar en la célula, a estas proteínas se les denomina **enzimas**. Para cumplir esta diversidad de funciones, cada tipo de célula en cada organismo posee varios miles de clases de proteínas. Para dar una idea de la complejidad de éstas, en la figura 3 se muestra la representación, en forma de bastones, de la estructura tridimensional de una proteína.



Figura 3. Estructura de la mioglobina de cachalote obtenida por difracción de rayos X. Irving Geis[©]



Las unidades estructurales de las proteínas son los α -**aminoácidos**. Todas las proteínas están construidas a partir de un conjunto de 20 α -aminoácidos. Como se observa en la figura 4, el carbono *alfa* de todos los aminoácidos proteinogénicos (a excepción de la glicina que contiene dos hidrógenos unidos al carbono alfa), sostiene un grupo amino, un grupo carboxilo, un átomo de hidrógeno y el residuo —R característico de cada aminoácido.

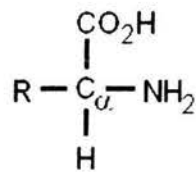


Figura 4. Representación de un α aminoácido.

Los enlaces alrededor del carbono alfa son tetraédricos, por lo que la representación tridimensional de un α -aminoácido sería como se muestra en la figura 5.

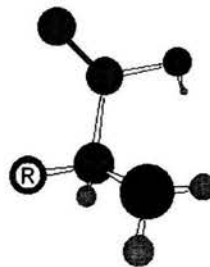


Figura 5. Representación tridimensional de un α aminoácido.

Si una molécula contiene un centro estereogénico, se dice que es quiral y existen dos estereoisómeros distinguibles; se trata de imágenes especulares que no se pueden superponer una sobre otra, o **enantiómeros**, como se muestra en la figura 6.

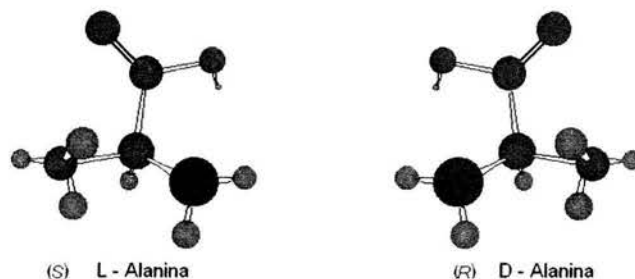


Figura 6. Representación tridimensional de los enantiómeros del aminoácido alanina.

Los enantiómeros pueden distinguirse entre sí experimentalmente debido a que sus soluciones desvían el plano de la luz polarizada en direcciones opuestas, por esta razón, los enantiómeros se llaman también **isómeros ópticos**. Todos los α -aminoácidos proteinogénicos, excepto la glicina, pueden existir en sus formas L y D, ya que en todos los casos el carbono α es quiral.

En la naturaleza también se encuentran aminoácidos con importancia biológica que no se encuentran en las proteínas, algunos de ellos son: β -aminoácidos como la β -alanina, que forma parte de algunos péptidos naturales y en el ácido pantoténico; D-aminoácidos como la D-alanina y D-glutámico que forman parte de los polipéptidos de la pared celular en algunas bacterias; la L-ornitina que se encuentra en muchos tejidos y es intermediario en la síntesis de L-arginina, la L-homoserina y L-sarcosina, que se encuentran en tejidos y son intermediarios en el metabolismo de los aminoácidos; al ácido γ -aminoabutiérico que se encuentra en el cerebro y otros tejidos animales y actúa como neurotransmisor y la L-tiroxina que se encuentra en la glándula tiroides y es un factor del crecimiento

Desde ya hace algunos años, los aminoácidos enantioméricamente puros de origen natural o sintético, juegan un papel importante en la industria agrícola, farmacéutica, cosmética y de alimentos.² Representan una valiosa y versátil herramienta en la síntesis asimétrica, que permite planear rutas sintéticas de cualquiera de los enantiómeros de un compuesto específico. También se



utilizan como materiales de partida en la preparación de auxiliares quirales, inductores, ligandos y catalizadores en síntesis asimétrica. Consecuentemente, se han desarrollado una gran variedad de diferentes síntesis, métodos y procesos para producir estos compuestos.³

Entre los procesos para la obtención de aminoácidos enantioméricamente puros destacan:

- Hidrólisis de proteínas y separación de aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico.

Este tipo de tecnología se ha desarrollado y perfeccionado en grandes compañías como Degussa-REMIX (Francia), las cuales obtienen aminoácidos y sus derivados para aplicaciones nutricionales y farmacéuticas; los hidrolizados de proteínas naturales se someten a cromatografía de intercambio iónico para su separación (figura 7).

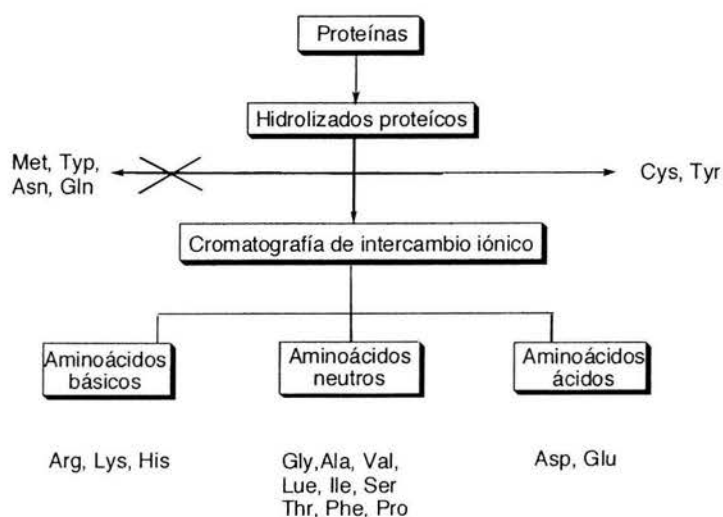


Figura 7. Obtención de aminoácidos proteínogénicos a partir de hidrólisis de proteínas.



➤ Fermentación

Esta técnica es útil en la producción de grandes cantidades de un solo aminoácido, por ejemplo, la producción de L-treonina, L-valina y L-isoleucina se produce en *REMIX and Chinese company* a gran escala y con precios accesibles.

➤ Procesos enzimáticos

1 Procesos de resolución empleando hidrolasas.

- a. L-aminoacilasa-1, utilizada en la resolución enzimática de N-acetil-DL-aminoácidos y (D) aminoacilasa-1, utilizada en la producción de D-aminoácidos no naturales (figura 8).

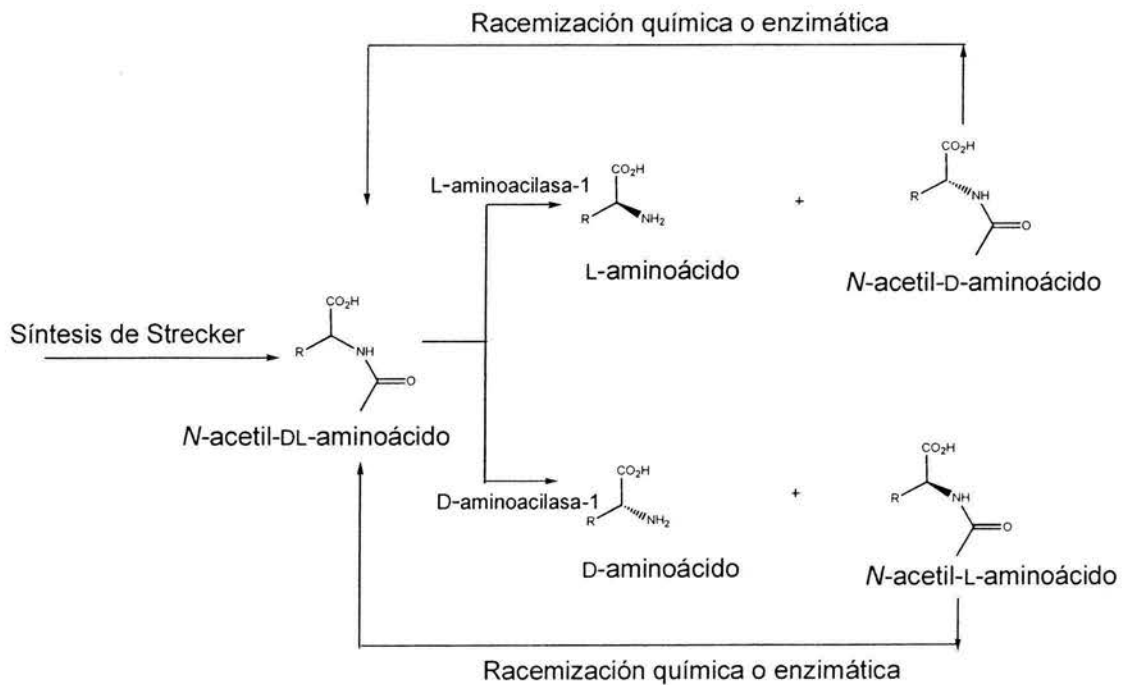


Figura 8. Proceso de obtención de L y D aminoácidos empleando L y D aminoacilasa-1.



b. L y D Hidantoinasas y Carbamoilasas. Empleadas en la producción de L y D aminoácidos por hidrólisis enzimática de mezclas racémicas de DL-hidantoinas y DL-carbamoilos, sintetizados por reacción de Bucherer–Bergs, amidocarbonilación de aldehidos con urea y condensación de hidantoinas con aldehídos, seguida de hidrogenación catalítica (figura 9). Las enzimas utilizadas son mutantes expresadas en *Escherichia coli*, a excepción de la D-Hidantoinasa obtenida de *Agrobacterium radiobacter*.⁴

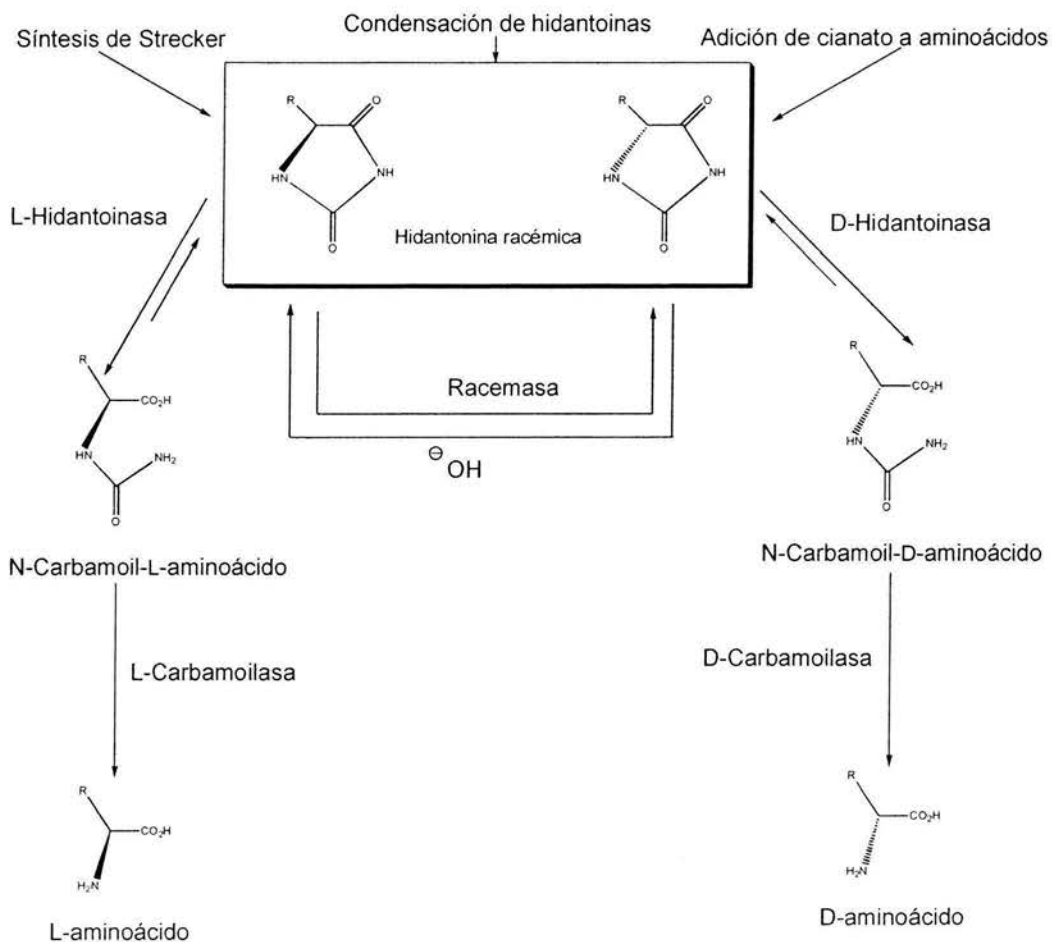


Figura 9. Uso de L- y D-carbamoilasa/hidantoinasa en el proceso de producción de L y D-aminoácidos.



La resolución de la DL-prolina se logra por cristalización de la sal de la D-prolina con el ácido D-tartárico y se libera en una columna con resina de intercambio iónico (figura 14).

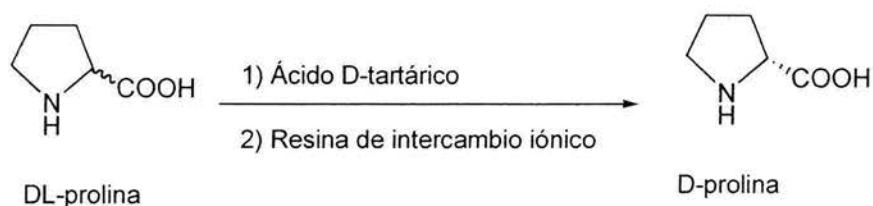


Figura 14. Resolución química de la prolina utilizando un compuesto quiral.

Otro ejemplo es el ácido (S)-piperazin-2-carboxílico (Pip), un importante constituyente de productos farmacéuticos. La resolución de la mezcla racémica ha sido desarrollada empleando el ácido (S)-canforsulfónico (ACS) formando una sal que se libera por columna de intercambio iónico¹⁰ (figura 15).

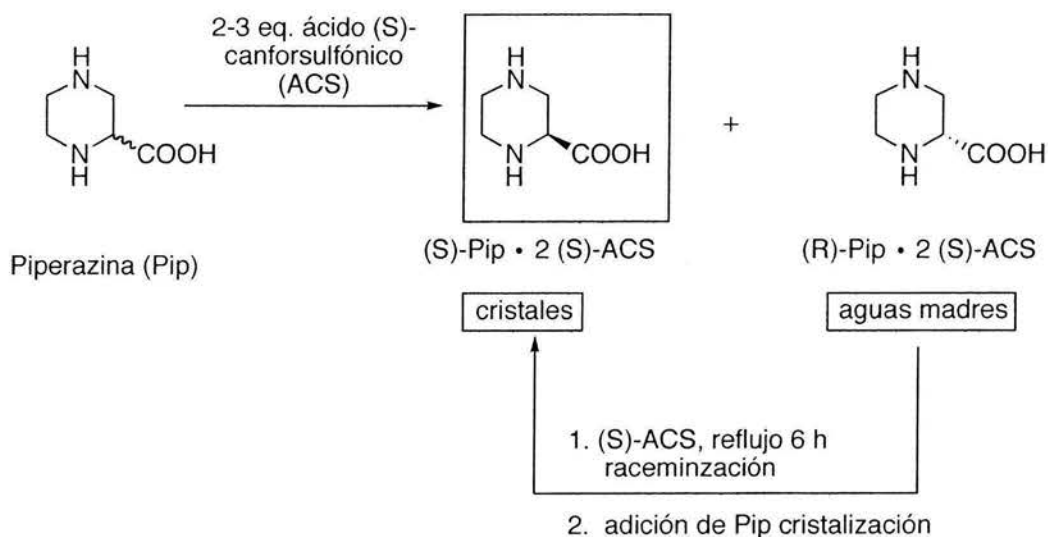


Figura 15. Obtención de ácido (S)-piperazin-2-carboxílico por resolución química.



Entre los compuestos producidos biológicamente, algunos contienen en su estructura al menos un centro estereogénico, este tipo de compuestos presentan actividad óptica, debido a que la mayoría de las veces los organismos tienden a producir un solo enantiómero. La asimetría de estas moléculas proviene de la quiralidad inherente a las enzimas responsables de su elaboración.

Los sitios receptores de los sistemas biológicos, que son también ópticamente activos, tienen la capacidad de diferenciar entre los dos enantiómeros de un compuesto específico. Aunque las aparentes diferencias físicas entre los dos enantiómeros parezcan insignificantes, la orientación espacial de un grupo funcional afecta drásticamente las propiedades farmacológicas de un compuesto. Los ejemplos son numerosos. Así, el enantiómero D del aminoácido Penicilamina es un agente quelante de metales pesados empleado para tratar a individuos intoxicados con plomo, oro o mercurio; su toxicidad es baja y es particularmente útil en el tratamiento de la enfermedad de Wilson y de cirrosis biliar, en donde las concentraciones hepáticas de cobre son excesivamente altas; en contraste, el enantiómero L provoca atrofia óptica, la cual puede conducir a ceguera.²¹

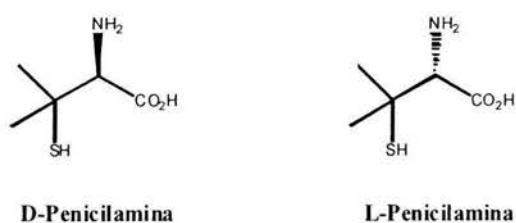


Figura 16. Enantiómeros de la penicilamina, los cuales tienen actividades farmacológicas diferentes.

La *biotecnología* es una ciencia interdisciplinaria con aplicaciones en muchos campos, como son alimentos, industria farmacéutica, medicina, agronomía etc. Una de las definiciones de la biotecnología es el uso de células o partes de ellas para obtener un producto.



Las enzimas son catalizadores de origen biológico que parecen cumplir muchos de los requisitos necesarios para impulsar una nueva área de la química: la *Biocatálisis*, con la cual, la humanidad tendrá acceso a nuevos y mejores fármacos de bajo costo, a alimentos mejores y más abundantes, a una agricultura mucho más eficiente, a nuevas fuentes energéticas, etc.

Es indudable la interacción entre la biotecnología y la química, dándose lo que se conoce como “biotransformaciones”, que pueden ser realizadas con microorganismos vivos, partes de ellos o con enzimas. En México, este es un campo poco explotado tanto a nivel investigación como de producción. Una biotransformación puede describirse como el dar a un microorganismo un sustrato que no es el natural, pero con el que tiene suficiente semejanza es estructurales, para que lo incluya en una parte de su metabolismo y lo transforme, si se tiene suerte en el producto que se necesita.

En el campo de las biotransformaciones, al inicio de la década de los años ochenta, se despertó el entusiasmo entre los biotecnólogos y se pensó que llegaría a desplazar a la química orgánica tradicional. Sin embargo en los últimos cinco años el interés por esta metodología, se ha enfocado a utilizar las biotransformaciones como una herramienta que puede jugar un papel más bien de apoyo a la síntesis orgánica; se intenta su aplicación cuando algún paso clave en la síntesis no puede realizarse por métodos tradicionales, por razones de costo o ambientales.

Las biotransformaciones pueden realizarse haciendo uso de microorganismos o de enzimas aisladas, y tienen ciertas ventajas como son:

- a) Las enzimas son catalizadores muy específicos: pueden modificar un único sustrato en una mezcla de sustratos muy similares e incluso pueden



discernir entre los enantiómeros de una **mezcla racémica** de un compuesto quiral.

- b) Son catalizadores muy selectivos, pueden modificar un único enlace o un único grupo funcional en una molécula que tenga varias posiciones modificables.
- c) Disponibilidad de gran variedad de organismos y posibilidad de modificación de las propiedades catalíticas por manipulación genética.
- d) Seguridad (evita el uso de reactivos tóxicos).
- e) Condiciones suaves de transformación (temperatura, presión y pH)
- f) Los biocatalizadores son capaces de realizar una gran variedad de reacciones orgánicas.

Sin embargo, también tienen desventajas:

- a) No es siempre posible tener acceso al enantiómero deseado.
- b) Frecuentemente se utilizan altas diluciones.
- c) Con microorganismos se tiene el riesgo de reacciones laterales no deseadas.
- d) Cuando se emplean enzimas aisladas, en algunos casos se requiere la adición de cofactores que son sumamente costosos.
- e) Los biocatalizadores suelen ser térmicamente inestables.
- f) Los biocatalizadores suelen ser incompatibles con algunos disolventes orgánicos.
- g) Las reacciones son generalmente lentas y con alto riesgo de inhibición.
- h) El aislamiento de las enzimas es tedioso y grandes volúmenes de efluentes en lotes industriales.

El empleo de enzimas aisladas implica un alto costo comparado con el uso de microorganismos vivos, pero tiene ventajas que en muchas ocasiones compensan a este alto costo, como son un mejor rendimiento (se evitan productos laterales que serían producidos por otras enzimas del



microorganismo), menores volúmenes y un aislamiento más fácil del producto. En algunos casos se ha logrado superar el problema del costo utilizando las enzimas inmovilizadas en un soporte inerte.

La biomasa, subproducto de una biotransformación con células enteras, puede tener utilidad como fuente de proteína para consumo animal.

Hay muchos factores que influyen en la competitividad de los procesos químicos y enzimáticos; por ejemplo, el costo de las materias primas, de la producción, aislamiento y purificación de los productos, purificación e inmovilización de enzimas.

Para el desarrollo de un proceso de resolución enzimática es necesario disponer de una fuente enzima. Las enzimas, obtenidas de fuentes naturales, como pueden ser microorganismos, vegetales o tejidos animales, suelen tener altos costos, debido a las operaciones requeridas para su purificación.

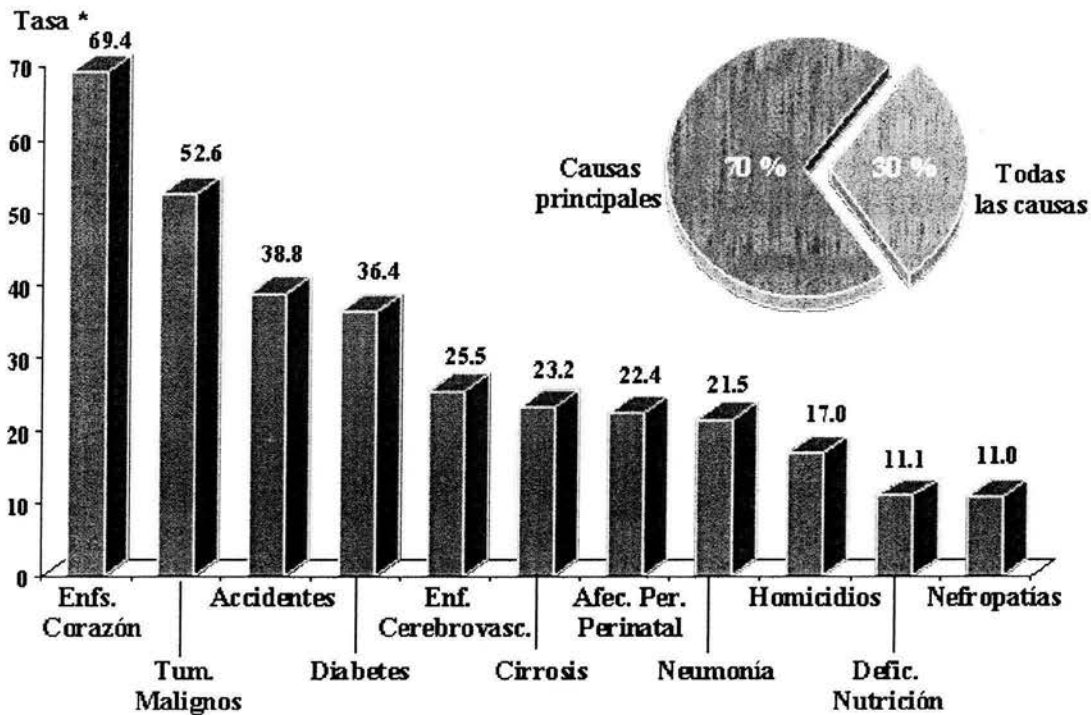
Un método económico es utilizar preparados crudos del tejido que contenga la enzima. Por ejemplo, J. Kazlauskas (1989) utilizó la Colesterol esterasa (EC 3.1.1.13), una enzima empleada como polvo acetónico obtenido de páncreas de bovino, que cataliza la hidrólisis enantioespecífica del éster binaftol y del éster espirobiindanol, para resolver estos compuestos.⁴⁶



3. Antecedentes

El uso de enantiómeros puros es visto en la actualidad como una manera de incrementar la eficacia de muchos fármacos racémicos. Los innovadores farmacéuticos incluyen ahora la evaluación de los méritos relativos de los enantiómeros puros de los compuestos quirales desde fases tempranas del proceso de desarrollo. De esta manera, se han diseñado fármacos enantioméricamente puros que inhiben enzimas tales como la proteasa de HIV,²² las COX-1, COX-2²³ o la enzima convertidora de la angiotensina (ECA).²⁴

La hipertensión, enfermedad que afecta a más de 15 millones de personas en México, es uno de los factores de riesgo más significativos en el desarrollo y progresión de las enfermedades cardiovasculares. En numerosos estudios se ha demostrado la estrecha asociación entre la hipertensión no tratada y la hipertrofia ventricular o la insuficiencia cardiaca congestiva, los accidentes cerebrovasculares, las retinopatías, los aneurismas disecantes, insuficiencia renal progresiva, enfermedad coronaria, enfermedades vasculares periféricas y sus complicaciones



Fuente: Dirección General de Estadística e Informática / SSA.
* Tasa por 100,000 habitantes.

Gráfica 1. Principales causas de mortalidad en México (1995)²⁵

Una de las terapias más exitosas para el tratamiento de la hipertensión emplea inhibidores de la ECA, enzima que interviene en la conversión del decapeptido angiotensina I a la potente sustancia vasoconstrictora, angiotensina II.

Los inhibidores de la ECA son dipéptidos modificados, y por tanto requieren, para su fabricación, de aminoácidos con quiralidad definida, los cuales pueden ser obtenidos por procesos que involucran estrategias de síntesis asimétrica o de procesos biotecnológicos. La mayoría de ellos contienen en su estructura un fragmento derivado de la L-homofenilalanina, que sintéticamente puede ser introducido a partir de la D-homofenilalanina, un aminoácido no natural (figura 17).

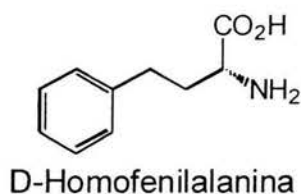


Figura 17. D-homofenilalanina (ácido *R*-2-amino-4-fenilbutanoico).



Figura 18. Resolución enzimática de la *N*-acetil-DL-homofenilalanina.

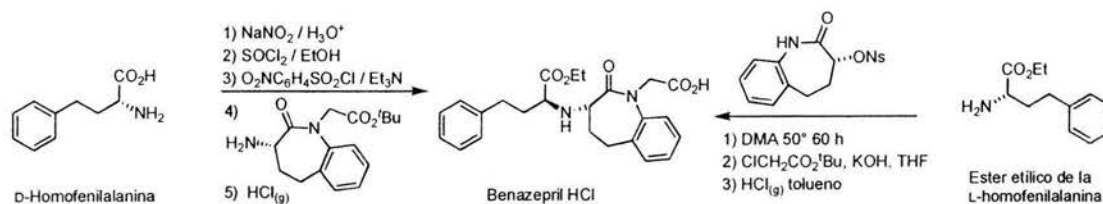


Figura 19. Síntesis convergente del Benazepril a partir de ambos enantiómeros de la homofenilalanina.¹⁵

Entre las estrategias sintéticas más comunes para la síntesis de los aminoácidos está la hidrólisis química de hidantoínas, las cuales son obtenidas desde los aldehídos correspondientes, vía la reacción de Bücherer-Bergs.²⁶

La resolución de los *N*-acetil-DL-aminoácidos obtenidos se logra eficientemente por la acción de la aminoacilasa (figura 23) para producir los L-aminoácidos libres junto con sus correspondientes enantiómeros *N*-acetilados.³



El primer fármaco empleado como inhibidor de la ECA para el tratamiento de la hipertensión arterial fue el Captopril, introducido en 1977.¹¹ Posteriormente, Patchett y col.^{12,13} desarrollaron una nueva clase de potentes inhibidores de esta enzima, tales como el Enalapril y su análogo Lisinopril, los cuales son inhibidores no sulfhidrúlicos que tienen una mayor potencia inhibidora que el Captopril, además de menos efectos secundarios.

Debido a la gran eficacia como inhibidores de la ECA que presentaron el Enalapril y el Lisinopril, muchas compañías farmacéuticas diseñaron e introdujeron al mercado una serie de análogos que contienen en su estructura un fragmento del éster etílico de la L-homofenilalanina, unido directamente a un fragmento dipeptídico, tal como se muestra en la figura 20.

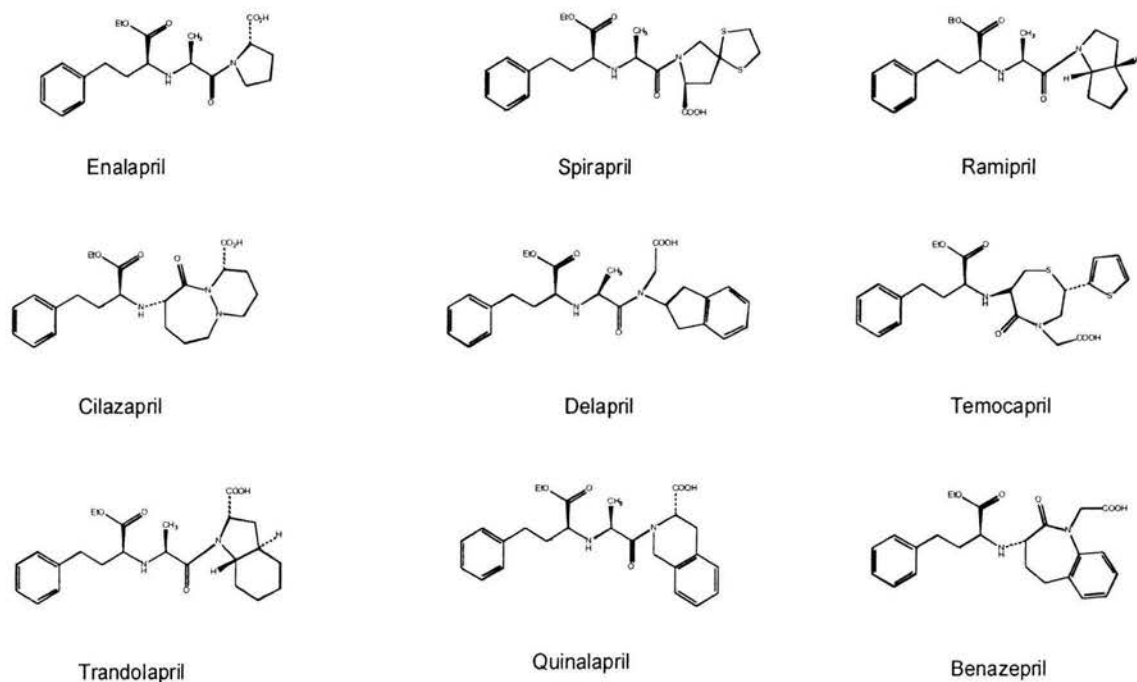


Figura 20. Fármacos inhibidores de la ECA que contienen en su estructura el éster etílico de la L-homofenilalanina como amino terminal de un fragmento dipeptídico.



Este tipo de fármacos pueden ser obtenidos por diferentes estrategias de síntesis.¹⁴ Una de las más eficientes consiste en el tratamiento del nosilato del (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo con la amina quiral apropiada, con la resultante inversión de la configuración, produciendo el fármaco esperado con la configuración (*S*)¹⁵ (figura 21).

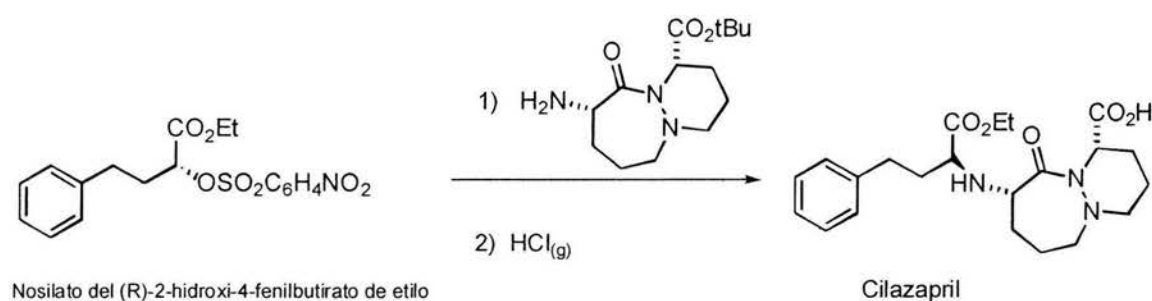


Figura 21. Preparación del Cilazapril empleando como precursor al nosilato del (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo y la amina quiral correspondiente.¹⁶

El nosilato del (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo puede ser obtenido a partir de la *D*-homofenilalanina por tratamiento con nitrito de sodio y ácido sulfúrico diluido, seguido de esterificación y reacción con el cloruro de *p*-nitro-bencensulfonilo (figura 22).¹⁷

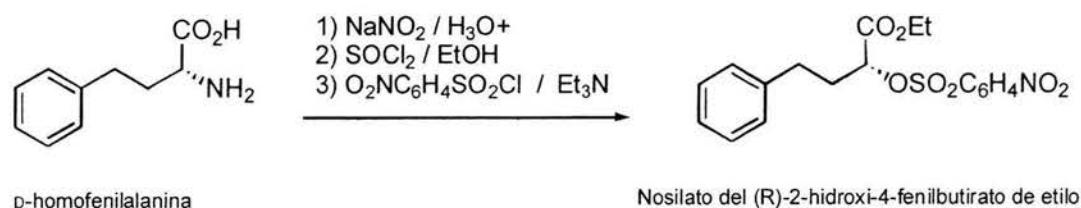


Figura 22. Preparación del nosilato del (*R*)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo a partir de la *D*-homofenilalanina

Desde principios de los años 80, se ha utilizado la actividad biológica de la *L*-aminoacilasa-1 de *Aspergillus sp.* en la producción de aminoácidos



enantioméricamente puros. La reacción enzimática de la L-aminoacilasa-1 se utiliza en la resolución de *N*-acetil-DL-aminácidos por hidrólisis enantioselectiva del *N*-acetil-L-aminácido en el L-aminácido libre. El enantiómero no deseado puede ser racemizado y reciclado (figura 23).

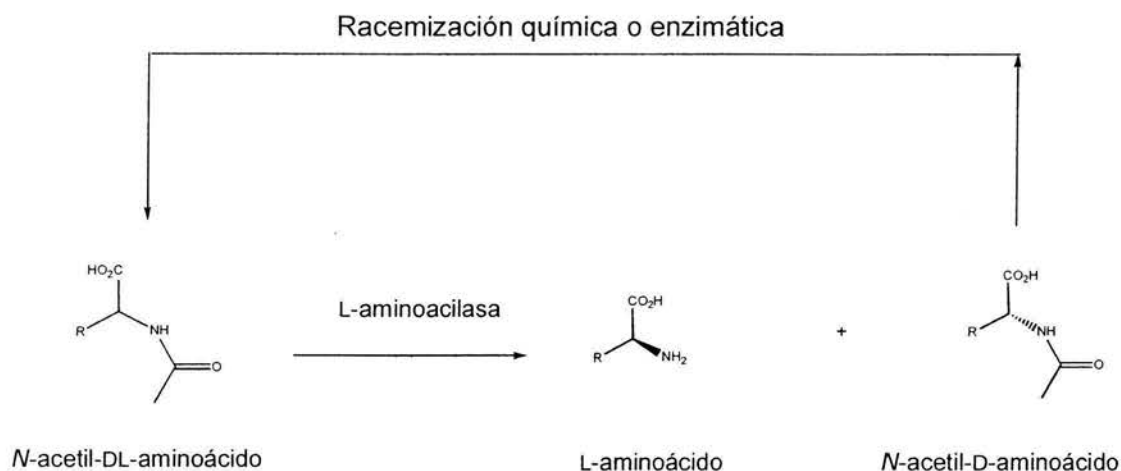


Figura 23. Utilización de la L-aminoacilasa-1 en la resolución de *N*-acetil-DL-aminácidos.

La L-aminoacilasa-1 de *Aspergillus sp.* hidroliza el grupo acilo de una amplia variedad de *N*-acetil-L-aminácidos,^{18,19} mostrando una actividad estable bajo condiciones de producción continua en procesos a gran escala. Por ejemplo la empresa alemana Degussa ha establecido una producción rutinaria de hasta 100 toneladas de L-metionina y L-valina aplicando la L-aminoacilasa-1 en un reactor de membrana.²⁰ La solución de *N*-acetil-DL-aminácidos se adiciona al reactor, el cual contiene la enzima; después de terminada la reacción, los productos salen del reactor a través de un sistema de ultrafiltración. Los poros de este sistema permeable están diseñados para permitir el paso de pequeñas moléculas (agua, aminoácidos y sales); las moléculas de enzima son retenidas en el reactor debido a su gran tamaño. Este tipo de sistemas permite la producción continua de L-aminácidos con un bajo consumo de enzima.



Características de la aminoacilasa

La aminoacilasa-1 EC 3.5.1.14²⁷⁻³³ del grupo de las hidrolasas (cuadro 1). Es una enzima que tiene acción sobre el enlace carbono-nitrógeno y otros enlaces peptídicos que sean amidas lineales. Cataliza la hidrólisis enantioespecífica de una gran variedad de L-aminoácidos *N*-acilados, produciendo el L-aminoácido y la sal del ácido correspondiente, participa en el metabolismo de los aminoácidos.

EC 3.5.1.14	Aminoacilasa-1	ACY-1	<i>N</i> -acil-L-aminoácido-amidohidrolasa
EC 3.5.1.15	Aminoacilasa-2	ACY-2	L-Aspartoacilasa
EC 3.5.1.16	Acetilornitinasasa	AO	Acetil-ornitina-desacetilasa
EC 3.5.1.17	Amidohidrolasa- ϵ		ϵ -Lisina-amidohidrolasa
EC 3.5.1.18	Diaminohidrolasa SDAP		Succinildiaminopimelato-desuccinilasa
EC 3.5.1.21	Acetil- β -amidohidrolasa		<i>N</i> -acetil- β -alaninadesacetilasa

Cuadro 1. Algunas enzimas pertenecientes al grupo de las hidrolasas, que tienen acción acilasa.



Figura 24. Estructura tridimensional de la aminoacilasa-1 humana, obtenida por difracción de rayos-X.



La aminoacilasa-1 es una metaloenzima homodímera dependiente de Zn y Co,³⁴ En la figura 24 se observa la unión de las subunidades monoméricas mediante 4 átomos de Zinc (esferas grises), es una proteína de 408 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 45,882 Da.³⁵⁻³⁶ Se localiza en el citosol de las células y esta distribuida en una amplia variedad de tejidos de mamíferos donde participa en el metabolismo de los aminoácidos.³⁷⁻⁴¹ En los seres humanos ésta enzima es codificada por un gen que se encuentra en el cromosoma 3, en la banda 3p21.1.⁴³⁻⁴⁴ y se le asocia con el cáncer por leucodistrofia progresiva.⁴²

Se han detectado diferentes proporciones de aminoacilasa en hígado y riñón de mamíferos, siendo la más abundante la aminoacilasa-I; por ejemplo, la corteza de riñón de porcino contiene hasta 1.5 mg de la enzima por gramo de tejido fresco y 0.4 mg en el hígado.⁴⁵ Una relación similar entre hígado y riñón se ha observado en otros mamíferos.



4. Planteamiento del problema

Las patentes de la mayoría de los antihipertensivos inhibidores de la ECA utilizados en la actualidad, han perdido su vigencia y algunos lo harán próximamente, de donde surge la necesidad, para la industria nacional, de tener acceso a la D-homofenilalanina o al éster etílico de la L-homofenilalanina, que es un precursor del (R)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo, intermedio común a estos fármacos.

Sin embargo, la mayoría de los métodos de obtención de D-homofenilalanina descritos en la literatura, no tienen aplicación en escala industrial por distintas razones, particularmente de orden económico y ambiental, por lo que este intermedio no está disponible comercialmente en escalas productivas. Así, por ejemplo, el método enzimático descrito por Iwasaki,⁴⁷ que utiliza células enteras de *Pseudomonas putida* ofrece la ventaja de transformar, con rendimiento cuantitativo, la 5-feniletihidantoína racémica en N-carbamoil-D-homofenilalanina, este último, precursor del aminoácido D-homofenilalanina. Este proceso, sin embargo, emplea una enorme cantidad de células desecadas (200% del peso de la hidantoína), lo cual hace a este proceso, a todas luces inviable para escala industrial.

Por lo anterior, se ve la necesidad de desarrollar un proceso enzimático optimizado, con potencial aplicación industrial, para la obtención de D-homofenilalanina.



5. Objetivos

Objetivo general:

Comparar la actividad aminoacilasa de diferentes mamíferos en la resolución enzimática de la *N*-acetil-DL-homofenilalanina.

Objetivos particulares:

1. Buscar actividad aminoacilasa en polvos acetónicos de riñón de diferentes mamíferos y evaluar su actividad con la *N*-acetil-DL-homofenilalanina como modelo de estudio.
2. Desarrollar un método analítico para la cuantificación de la actividad aminoacilasa de riñón de mamíferos.
3. Cuantificar la cantidad de proteínas solubles en los diferentes polvos acetónicos de riñón de mamíferos.
4. Explorar la aplicación de la actividad aminoacilasa de los polvos de riñón de especies de mamíferos en la resolución de: ácido *N*-acetil-DL- α -aminobutírico, *N*-acetil-DL-fenilalanina, *N*-acetil-DL-fenilglicina, *N*-acetil-DL-triptófano, *N*-acetil-DL-metionina, *N*-acetil-DL-valina.
5. Determinar la pureza óptica de los correspondientes aminoácidos obtenidos.



6. Hipótesis

Es factible emplear la actividad de la enzima aminoacilasa contenida en los polvos acetónicos de riñón de mamíferos para efectuar la resolución de aminoácidos *N*-acetilados, evitando el aislamiento y purificación de la enzima.



7. Material, reactivos y equipo

Material biológico

Riñones de mamíferos de entre 30 y 45 minutos después de su sacrificio.

Bovino	<i>Bos taurus</i>
Rata	<i>Rattus norvegicus</i>
Canino	<i>Canis familiaris</i>
Ovino	<i>Ovis ammon aries</i>
Porcino	<i>Sus scrofa</i>

Reactivos, material y equipo

Acetato de etilo	grado técnico destilado
Acetona	grado técnico destilada
Ácido bicinconínico	Aldrich
Ácido clorhídrico	J. T. Backer
Ácido tricloroacético	Aldrich
Agua destilada	
Anhídrido acético	J. T. Backer
Bicarbonato de sodio anhidro	J. T. Backer
Carbón activado	J. T. Backer
Carbonato de sodio anhidro	J. T. Backer
Celita	J. T. Backer
Cloruro de colbalto	J. T. Backer
Etanol	grado técnico destilado
Fosfato monobásico de potasio	J. T. Backer
Hexano	grado técnico destilado
Hidróxido de amonio	J. T. Backer
Hidróxido de sodio sólido	J. T. Backer
Isopropanol	grado técnico destilado
Metanol	grado técnico destilado
N-acetil-DL-butirina	Aldrich



<i>N</i> -acetil-DL-fenilalanina	Aldrich
<i>N</i> -acetil-DL-fenilglicina	Aldrich
<i>N</i> -acetil-DL-homofenilalanina	Aldrich
Sulfato cúprico pentahidratado	J. T. Backer
Ninhidrina	J. T. Backer
Tartrato dibásico dihidratado	J. T. Backer

Embudos de separación

Embudos Büchner

Embudos de filtración

Matraz Erlenmeyer

Matraz Kitasato

Matraz volumétrico

Papel filtro Watman

Pipetas graduadas

Pipetas Pasteur

Probetas

Termómetros

Tubos para centrifuga con tapa

Vasos de precipitados

Vidrios de reloj

Aparato de puntos de fusión *Fisher Johns*

Balanza analítica SARTORIUS® BP22IS

Balanza semianalítica OHAUS® S200

Baño de agitación orbital Lab Line®

Baño de agua Precision®

Centrifuga clínica Cole Parmer 17250-00

Espectrofotómetro *UV/Visible* Pharmacia Biotech Ultrospec® 2000

Estufa de vacío Precision®

HPLC Waters®

Micropipetas Gilson® capacidades 100 – 1000 µL

Placas de calentamiento con agitación *Corning*®

Polarímetro *Perkin Helmer* 341

Potenciómetro Methrom Brinkmann 713



Rotavapor IKA-Werke 7813

Sonicador Ultrasonic Processor GEX600

Triturador Ultra-Turrax IKA-Werk TP18/10S50

Ultracentrifuga BECKMAN Avanti™ J-25I

Ultracentrifuga Eppendorf 5417R



8. Parte experimental

8.1. Procedimiento general para la preparación de los polvos acetónicos de riñón

Cada uno de los riñones de ovino, porcino, canino, bovino y rata recién sacrificados, se transportaron en hielo desde el punto de recolección al laboratorio, se cortaron en trozos pequeños eliminando la mayor cantidad posible de tejido adiposo y se colocaron en un vaso de licuadora. Se cubrió con 3 volúmenes de acetona a 5 °C y se licuó durante 5 minutos, se filtró al vacío, se escurrió bien y el tejido molido se licuó dos veces más con la misma proporción de acetona fría, se secó en corriente de aire en campana, se tamizó sobre un tamiz de 20 mallas y se guardó a – 20 °C en frascos de tapa hermética.

8.2 Hidrólisis enzimática de *N*-acetil-DL-homofenilalanina, con polvos acetónicos de los riñones de mamíferos.

Para cada uno de los polvos acetónicos de las especies de mamíferos en estudio, se siguió el siguiente protocolo:

A 2 g de *N*-acetil-DL-homofenilalanina, contenidos en un matraz erlenmeyer de 250 mL se adicionaron 50 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.2 molar pH 7.5 conteniendo 10 mg/L de CoCl_2 y se ajustó el pH de la mezcla nuevamente a 7.5 con NaOH al 20%. A la solución se agregaron 500 mg de polvo acetónico de riñón de mamífero y se incubó a 37°C con agitación de 250 rpm.

A las 24 horas, los matraces que contenían los polvos acetónicos de bovino, ovino y porcino presentaban un precipitado correspondiente al aminoácido libre,



por lo que se enfriaron a 5 °C, se les ajustó el pH a 11 con NaOH al 20% y se centrifugaron a 6,000 rpm durante 15 minutos. Los sobrenadantes se filtraron sobre celita, a los filtrados se les ajustó el pH a 6.3 con HCl al 10 N, con lo que precipitó la L- homofenilalanina, se filtró, se lavó con la mínima cantidad de agua helada y se secó a 60 °C hasta peso constante. Las aguas madres de cada experimento se ajustaron a pH 2.3 con HCl 10 N, se enfriaron en baño de hielo durante 2 horas, se filtró la N-acetil-D-homofenilalanina, se lavó con la mínima cantidad de agua helada y se secó a 60 °C hasta peso constante.

A los matraces correspondientes a canino y rata, se les dejó en incubación hasta 90 horas sin observar precipitación, por lo que se descartaron éstos mamíferos.

La L-homofenilalanina obtenida de cada uno de los mamíferos en estudio, se suspendió en 10 volúmenes de agua, se le adicionó HCl 10 N hasta pH 1.2, se trató con carbón activado y se filtró sobre celita. Cada filtrado se ajustó a pH 6.3 con NaOH 10 N, se filtró la L-homofenilalanina reprecipitada y se secó a 60 °C hasta peso constante. Los resultados se muestran en la tabla 1.

La N-acetil-D-homofenilalanina cruda obtenida en cada experimento, se suspendió en 30 volúmenes de acetato de etilo, se calentó a reflujo hasta completa disolución, se trató con carbón activado, se filtró en caliente sobre celita, el filtrado se enfrió a 5 °C, se filtró y se secó a 60 °C hasta peso constante. Los resultados se muestran en la tabla 2.



Determinación del exceso enantiomérico de los productos de la hidrólisis enzimática.

Preparación del éster metílico de la L-homofenilalanina de bovino, ovino y porcino.

Se suspendieron 300 mg, (1.67 mmol) de L-homofenilalanina en 6 mL de metanol anhidro, se enfrió a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, se adicionaron lentamente 156 μL de SOCl_2 (2.18 mmol). La mezcla de reacción se dejó 1 hora entre -5 y $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, se calentó entre 40 y $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora. El curso de la reacción se monitoreó por CCF (isopropanol – hidróxido de amonio 7:3, revelando color por aspersion de ninhidrina al 0.2 % en metanol), hasta completo consumo de la materia prima, la mezcla de reacción se concentró con vacío hasta sequedad en un rotavapor, el clorhidrato del éster metílico de la L-homofenilalanina se disolvió en la mínima cantidad de agua fría, se alcalinizó con bicarbonato de sodio, se extrajo con acetato de etilo ($3 \times 5\text{ mL}$) y se evaporó a sequedad.

El éster metílico de la L-HFA se analizó por HPLC quiral, en una columna CHIRALCEL OD; hexano– isopropanol 90:10. Los resultados se muestran en la tabla 1, los cromatogramas se incluyen en los anexos.

Preparación del éster metílico de la N-acetil-D-homofenilalanina de bovino, ovino y porcino.

Se suspendieron 360 mg, (1.63 mmol) de N-acetil-D-homofenilalanina en 6 mL de metanol anhidro, se enfrió a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, se adicionaron lentamente por goteo 156 μL de SOCl_2 (260 mg, 2.18 mmol). La mezcla de reacción se dejó 1 hora entre -5 y $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, luego se calentó entre 40 y $45\text{ }^{\circ}\text{C}$. La reacción se monitoreó por CCF (hexano – acetato de etilo 7:3, revelando con yodo), hasta que desapareció la N-Ac-D-HFA. La mezcla de reacción se evaporó a temperatura media en un



rotavapor, el sólido fue disuelto en la mínima cantidad de agua fría, se alcalinizó con bicarbonato de sodio, se extrajo con acetato de etilo (3×5 mL) y se evaporó a sequedad. El éster metílico de la *N*-Ac-D-HFA se analizó por HPLC quiral, en una columna CHIRALCEL OD; hexano – isopropanol 90:10. Los resultados se muestran en la tabla 2; el cromatograma se incluye en el anexo.

8.3 Cuantificación de proteínas solubles de los polvos acetónicos de riñón de bovino, ovino y porcino.

Obtención de las proteínas solubles de los polvos acetónicos de riñón de bovino, ovino y porcino.

Se dispersaron 300 mg de polvos acetónicos en 15 mL de solución amortiguadora; la dispersión se sonicó a 30 % (8 pulsos de 20 s). El sonicado se centrifugó a 15,000 rpm durante 30 minutos a 4° C. Se separó el sobrenadante y se tomó una muestra para la cuantificación de proteínas; el resto se guardó a -20 °C en frascos tapados herméticamente.

Determinación de proteínas por el método del ácido biscinconínico (BCA)*

Para cada una de las muestras de extracto proteico obtenidas en el paso anterior, se realizó el siguiente procedimiento: Se tomaron 100 μ L de muestra diluida 1:6 con agua destilada y se adicionó 1 mL de la solución AB; se incubó a 37 °C durante 30 minutos y se enfrió con agua helada. Se leyeron las absorbancias a 562 nm y se determinó la concentración de proteínas por extrapolación en una curva patrón de albúmina de bovino.

* Preparación de los reactivos en el anexo.

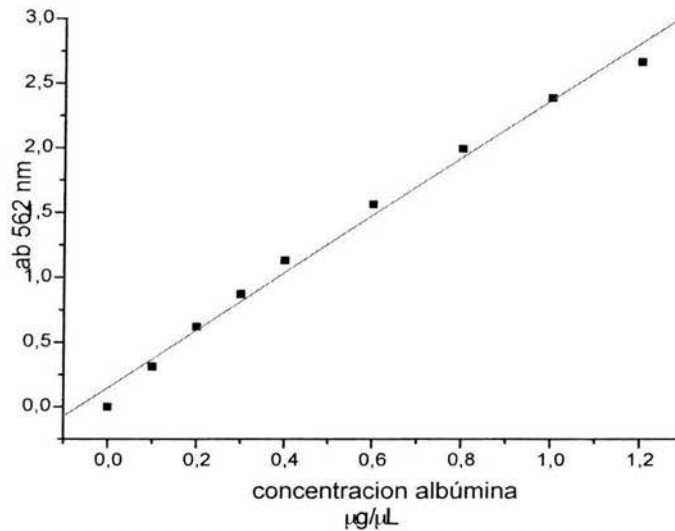


Gráfico 2. Determinación de proteínas por el método del ácido bicinónico (BCA)* Curva patrón: absorbancia contra concentración de albúmina.

De la curva anterior se obtuvo la siguiente ecuación:

$$[C] (\mu\text{g}/\mu\text{L})_{\text{prot.}} = [(\text{Abs M} - 0.14654)/2.22677] \times \text{dilución.}$$

Los resultados de la cuantificación de proteínas totales solubles de los polvos acetónicos de las especies de mamíferos en estudio se muestran en la tabla 3

8.4 Determinación de la actividad específica de la aminoacilasa contenida en polvos acetónicos de riñón de bovino.

Se realizó un transcurso en el tiempo del sustrato *N*-acetil-DL-homofenilalanina con el extracto enzimático de los polvos acetónicos de riñón de bovino ya que éstos generaron los mejores rendimientos y purezas ópticas de los productos esperados.

* Preparación de los reactivos en el anexo.



Preparación de polvos acetónicos de corteza de riñón de bovino (método 2).

Se siguió el mismo protocolo del punto 8.1, con algunas modificaciones:

Se disecó la corteza del riñón, se colocó en un vaso de precipitados, se cubrió con 3 volúmenes de acetona a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ y trozos de hielo seco; se molió en un triturador *Ultra-turrax* durante 3 minutos, se centrifugó a 15,000 rpm durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se decantó el sobrenadante. El tejido molido se trató como se describe en el punto 8.1.

Preparación del extracto enzimático (EZ) de corteza de riñón de bovino

Para 800 mg de polvo acetónico de corteza de riñón de bovino, se obtuvo el extracto enzimático como se describe en el punto 8.3; se tomó una muestra para la cuantificación de proteínas de la cual dio una concentración de 6,33 mg/mL, el resto se reservó para la incubación con el sustrato *N*-acetil-DL-homofenilalanina.

Preparación del sustrato *N*-acetil-DL-homofenilalanina

Se prepararon 25 mL de una solución 200 mM de *N*-acetil-DL-homofenilalanina, pH a 7.5

De la solución anterior, se hicieron diluciones a las siguientes concentraciones de sustrato:

Concentración (mM) de *N*-acetil-DL-homofenilalanina

A	B	C	D	E	F	G	H	I
10	25	50	75	100	125	150	175	200

Medición de la reacción enzimática.

Para la concentración de sustrato 10mM (**A**)

Se rotuló una serie de tubos desde **A**₁ hasta **A**₆, se colocaron en baño de hielo y se les adicionó a cada uno 200 μ L de la solución **A** previamente enfriada a 5 °C, y 200 μ L del extracto enzimático **EZ** previamente enfriado a 5 °C, los tubos se mezclaron en un vortex, se temporizaron y se incubaron a 30 °C.

Al tiempo de 1 hora, al tubo **A**₁ se le adicionaron 200 μ L de ácido tricloroacético al 50 % para detener la reacción, a las 2 horas para el tubo **A**₂ se repitió el paso anterior y así sucesivamente cada hora hasta **A**₆.

Las muestras **A**₁ – **A**₆ se centrifugaron a 14 000 rpm, 4 °C, durante 10 minutos; se pasaron 350 μ L del sobrenadante a tubos limpios y se les adicionaron 750 μ L de reactivo de ninhidrina,* se incubaron a 82 °C durante 5 minutos, se enfriaron a 4 °C, se pasó cada muestra a celdas de espectrofotometría para leer las absorbancias a 507 nm. Las absorbancias se transformaron en unidades de concentración de L-HFA por extrapolación en una curva estándar y se graficaron contra el tiempo (horas). Se determinó por regresión lineal la pendiente V_0 (velocidad inicial).

Todo el procedimiento anterior se repitió para cada una de las concentraciones de *N*-acetil-DL-homofenilalanina, desde la concentración **B** hasta la concentración **I**.

Las velocidades iniciales se graficaron contra la concentración de L-HFA y por ajuste de la ecuación de Michaelis-Menten por regresión no lineal, se obtuvo la

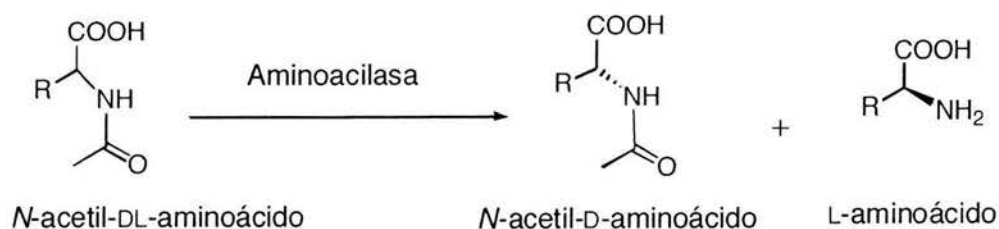
* método para preparar el reactivo de ninhidrina en el anexo.



velocidad máxima de reacción catalizada por la aminoacilasa y su actividad específica. Los resultados se muestra en el gráfico 3.

8.5 Estudio preliminar de la resolución enzimática de otros *N*-acetil-DL-aminoácidos.

El estudio de la aminoacilasa contenida en los polvos acetónicos de riñones de bovino, ovino y porcino, se extendió a la resolución de otros DL- α -aminoácidos *N*-acetilados.



Los aminoácidos empleados fueron: ácido DL- α -aminobutírico, DL-fenilalanina, DL-fenilglicina, DL-metionina, DL-valina y DL-triptófano.

Cada uno de estos aminoácidos se acetiló siguiendo el procedimiento que se describe para la homofenilalanina:

A una solución fría de homofenilalanina 12.5 g (69.7 mmol) en 115 mL de agua, y 2.79 g (69.7 mmol) de NaOH, (0 - 5 °C), se adicionaron 9.26 g (90.6 mmol) de anhídrido acético, manteniendo el pH entre 11 y 11.5, por adición de NaOH al 50 %. Después de la adición se mantuvo la temperatura y pH durante una hora. Después de acidificar con HCl 10N a pH de 2.3, la mezcla se enfrió (0 - 5 °C) por



una hora, se filtró, se lavó con la mínima cantidad de agua fría y se secó hasta peso constante.

Los *N*-acetil-DL-aminoácidos obtenidos (*N*-acetil-DL-butilina, *N*-acetil-DL-fenilalanina, *N*-acetil-DL-fenilglicina, *N*-acetil-DL-metionina, *N*-acetil-DL-valina y *N*-acetil-DL-triptófano) fueron sometidos a resolución con la aminoacilasa de polvos acetónicos siguiendo el procedimiento descrito en el punto 8.2.



9. Resultados y discusión

Para el logro de los objetivos de este proyecto se requirió de una fuente accesible y viable de aminoacilasa. Por esta razón se decidió evaluar la posibilidad de emplear un preparado enzimático crudo proveniente de riñones de mamíferos. Los mamíferos elegidos por su disponibilidad fueron: bovino, canino, ovino, porcino y rata.

Un preparado enzimático crudo, tiene grandes ventajas económicas, ya que el proceso de purificación de una enzima a partir de una fuente natural, suele ser un proceso laborioso, por lo que los costos de las enzimas purificadas suelen ser altos.

Debido a la presencia de proteasas en los riñones, que degradan a las enzimas en general, fue necesario conseguir los riñones de animales recién sacrificados, transportarlos en hielo y procesarlos con la mayor rapidez posible.

El proceso de obtención del preparado enzimático crudo, que aquí nombramos *polvos acetónicos de riñón*, consiste en la trituración del tejido, desengrasado y conservación.

Por otro lado, debido al interés en desarrollar un proceso para obtener ambos enantiómeros de la homofenilalanina, se decidió realizar este estudio empleando como modelo la *N*-acetil-DL-homofenilalanina.

Como se puede observar en las Tablas 1 y 2, los mejores resultados en la resolución enzimática de la *N*-acetil-DL-homofenilalanina se obtuvieron con los polvos acetónicos de riñón de bovino. Con los polvos acetónicos de riñón de canino y rata no se observó biotransformación, aún después de 90 horas, por lo que estas especies se descartaron del estudio.



Tabla 1. L-homofenilalanina.

Especie	Rendimiento % ^c	$[\alpha]$ ^a (c=1, HCl 3N)	ee % ^b
Ovino	34.0	+ 44.80°	99.4
Bovino	41.0	+ 45.19°	99.9
Porcino	40.0	+ 45.12°	99.9

^a Lit. $[\alpha] = +47.5^\circ$ (c= 1.0, 3N HCl)

^b Determinado como el éster metílico sobre una columna CHIRALCEL OD.

^c Los rendimientos se reportan en base al 100% del total del sustrato racémico.

Tabla 2. N-acetil-D-homofenilalanina.

Especie	Rendimiento % ^c	$[\alpha]$ ^a (c=1, CH ₃ OH)	ee % ^b
Ovino	26.0	-18.93°	94.0
Bovino	37.5	-19.54°	>99.0
Porcino	33.0	-19.43°	96.0

^a Lit. $[\alpha] = - 19.2^\circ$ (c= 1.0, CH₃OH)

^b Determinado como el éster metílico sobre una columna CHIRALCEL OD.

^c Los rendimientos se reportan en base al 100% del total del sustrato racémico.

En vista de la similitud de los resultados anteriores, se cuantificó la concentración de proteínas totales del extracto de los polvos acetónicos de riñón de cada mamífero, observándose también contenidos semejantes de proteínas en los extractos de bovino, ovino y porcino (Tabla 3).



Tabla 3. Concentración de proteínas de los extractos de los polvos acetónicos de riñón de bovino, ovino y porcino.

Extracto protéico	Concentración mg / mL
Bovino	4.81
Ovino	4.56
Porcino	4.12

Se decidió entonces comparar el contenido proteico de los polvos acetónicos de riñón entero y de corteza de riñón de bovino, encontrándose que la concentración de proteínas solubles de los polvos acetónicos de la corteza, es más alta (**6.33 mg** de proteínas por mL de extracto).

Ahora bien, para determinar la actividad de la enzima se realizó una cinética enzimática con el extracto de proteínas solubles del polvo acetónico de la corteza de bovino. El gráfico 3 describe una cinética micaliana de la cual se puede concluir que la aminoacilasa-1 de riñón de bovino trabaja con una V_{max} , de $12.4 \pm 0.98 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}$ y una constante de afinidad por el sustrato $K_m = 65.0 \pm 12.7 \text{mmol L}^{-1}$.

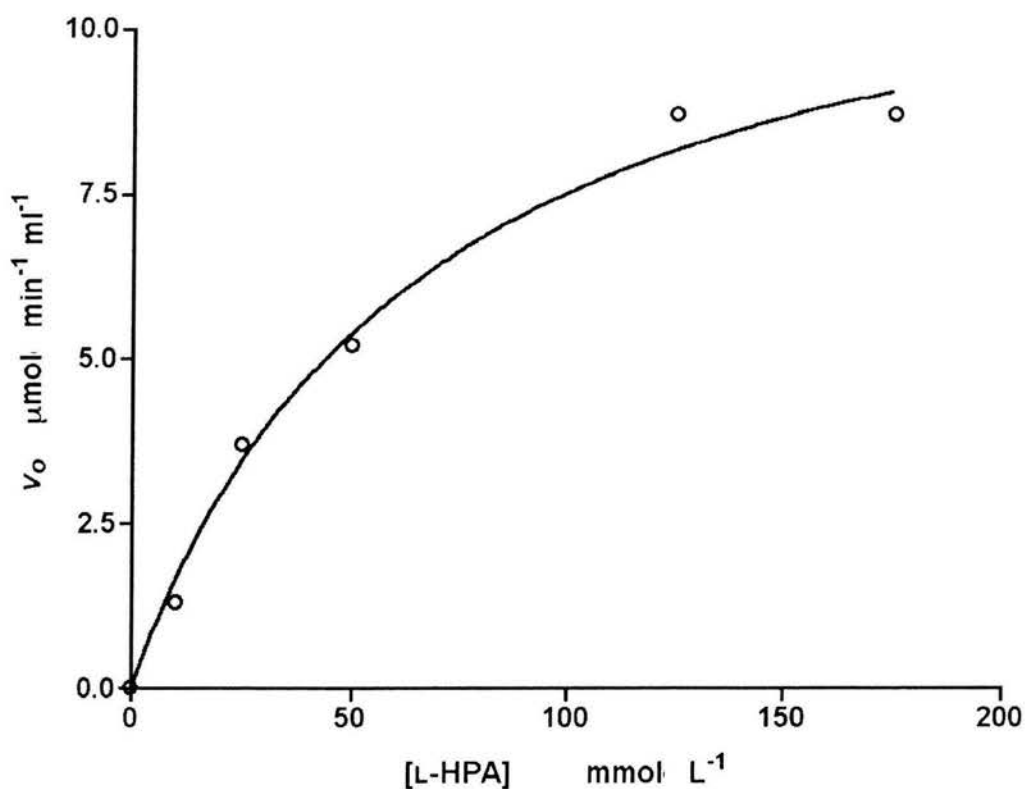


Gráfico 3. Velocidad inicial contra la concentración de L-homofenilalanina, con ajuste a la cinética de Michaelis-Menten.

La actividad específica de la enzima se determinó como actividad, específica, ya que aunque se conoce la concentración total de proteínas en el medio de reacción (3.165 mg mL^{-1}), no se conoce la concentración de la L-aminoacilasa presente al no ser una enzima purificada. Así, bajo las condiciones descritas en el procedimiento la actividad específica fue de $3.9 \text{ mmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Este dato permite predecir el tiempo en el cual la reacción será completa a la concentración de sustrato empleada por unidad de enzima.



Con la intención de extender el estudio de la aplicación de los polvos acetónicos de riñón para la resolución de otros *N*-acetil-DL-aminoácidos, se realizaron pruebas preliminares con la metodología que se empleó para la resolución de la homofenilalanina.

En las tablas 4-6, se muestran los resultados obtenidos del aislamiento de los *N*-acetil-D-aminoácidos recuperados de la resolución.

Tabla 4. Ácido *N*-acetil-D-aminobutírico.

Especie	Rendimiento % ^c	$[\alpha]$ ^a (c=2, H ₂ O)	Intervalo de fusión ^b °C
Ovino	45.2	+36.2°	125-127
Bovino	25.5	+35.4°	128-129
Porcino	32.1	+38.5°	129-130

^a Lit. $[\alpha] = +40.0^\circ$ (c= 2.0, H₂O)

^b Ref. 124-127 °C

^c Los rendimientos se reportan en base al 100% del total del sustrato racémico.

Tabla 5. *N*-acetil-D-fenilalanina.

Especie	Rendimiento % ^c	$[\alpha]$ ^a (c=1.7, EtOH)	Intervalo de fusión ^b °C
Ovino	36.1	- 35.6°	163-165
Bovino	36.9	- 36.4°	168-170
Porcino	36.6	- 36.1°	163-165

^a Lit. $[\alpha] = -49.3^\circ$ (c= 1.7, EtOH)

^b Ref. 170-171 °C

^c Los rendimientos se reportan en base al 100% del total del sustrato racémico.

Tabla 6. *N*-acetil-D-fenilglicina.

Especie	Rendimiento % ^c	$[\alpha]$ ^a (c=1.3, EtOH)	Intervalo de fusión ^b °C
Ovino	37.0	-179.0 °	190-195
Bovino	21.5	-183.4 °	190-195
Porcino	35.0	-167.0 °	187-190

^a Lit. $[\alpha] = -215.0^\circ$ (c= 1.3, EtOH)

^b Ref. 190-191 °C

^c Los rendimientos se reportan en base al 100% del total del sustrato racémico.

Para los *N*-acetil-aminoácidos de la tabla 7, no se cuantificaron los rendimientos de los productos de la biotransformación, debido a los problemas implícitos en el aislamiento de los mismos. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, la prueba se consideró positiva cuando se observó el aminoácido libre por CCF.

Tabla 7	<i>N</i> -acetil-DL-aminoácido	Actividad aminoacilasa ^a
	<i>N</i> -acetil-DL-triptófano	-
	<i>N</i> -acetil-DL-metionina	+
	<i>N</i> -acetil-DL-valina	+

^a El aminoácido se detectó por CCF, revelado con sol. de ninhidrina al 2% en EtOH.

Para poder llevar a cabo un aislamiento efectivo de los productos deseados, es necesario realizar numerosos ensayos para mejorar su rendimiento y pureza, considerando para cada aminoácido en particular, sus propiedades físico-químicas de modo que puedan separarse los enantiómeros resueltos por acción de la enzima aminoacilasa.



10. Conclusiones

Se encontró actividad de aminoacilasa en polvos acetónicos de riñones de bovino, ovino y porcino; esta actividad no se observó en los polvos acetónicos de los riñones de canino y rata.

Se demostró la actividad enzimática de los polvos acetónicos conservados a temperatura de -20°C hasta 6 meses.

La mayor actividad específica se presentó en los polvos acetónicos de riñón de bovino. Se logró una resolución eficiente de la *N*-acetil-DL-homofenilalanina empleando una proporción del 25 % de polvo acetónico de bovino en relación al peso del sustrato en un tiempo de 24 horas.

De los resultados obtenidos en la resolución de la *N*-acetil-DL-homofenilalanina, se concluye que este método se puede escalar a nivel industrial, ya que se realizó el escalamiento de la resolución de la *N*-acetil-DL-homofenilalanina hasta un lote de 20 g.

Se desarrolló un método analítico para medir la actividad aminoacilasa de riñón de bovino en la resolución de la *N*-acetil-DL-homofenilalanina.

Las pruebas preliminares realizadas nos permitieron confirmar que es posible extender la aplicación de la metodología desarrollada para la resolución



enzimática de la *N*-acetil-homofenilalanina con la aminoacilasa contenida en polvos acetónicos a la resolución de otros aminoácidos *N*-acetilados con resultados alentadores; sin embargo, hay que considerar que los procedimientos no están optimizados en la parte de biotransformación ni en la del aislamiento.



Anexo 1

Análisis por HPLC quiral del éster metílico de la L-homofenilalanina obtenida de la resolución con polvos acetónicos de bovino, ovino y porcino.

Condiciones:

Flujo: 1 mL/min

Fase: Hexano-Isopropanol (90:10)

Longitud de onda (λ): 210 nm

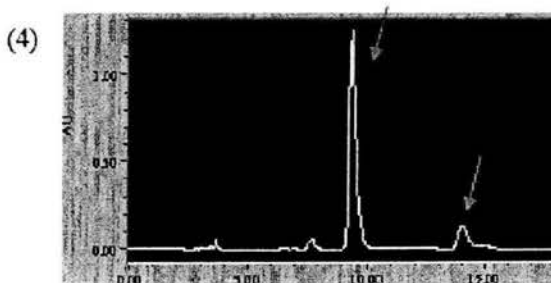
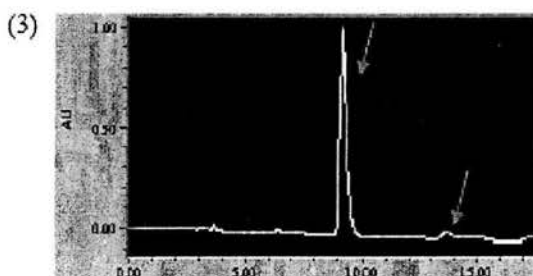
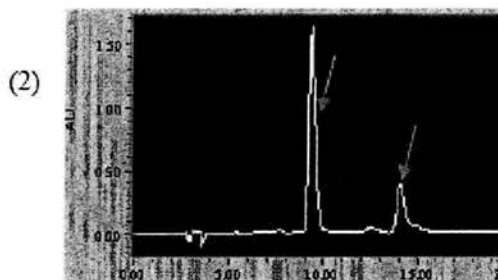
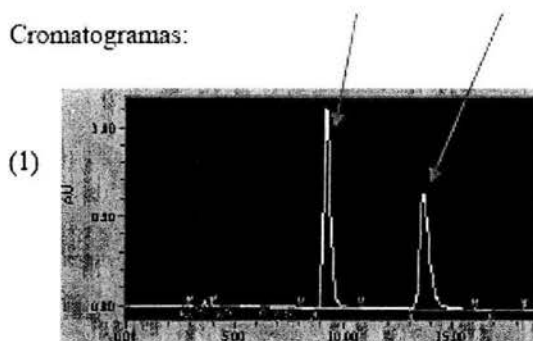
Columna: Chiralcel OD

Temp: 20 °C

Tiempos de retención: (L) = 9.35 min (D) = 14.10 min

(L) = 9.35 min (D) = 14.10 min

Cromatogramas:





Anexo 2

Análisis por HPLC quiral del éster metílico de la *N*-acetil-DL-homofenilalanina obtenida de la resolución con polvos acetónicos de bovino, ovino y porcino.

Condiciones:

Flujo: 1 mL/min

Fase: Hexano-Isopropanol (90:10)

Longitud de onda (λ): 210 nm

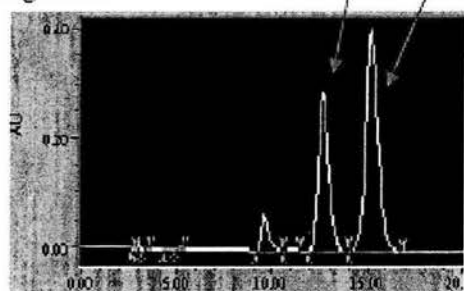
Columna: Chiralcel OD

Temp: 20 °C

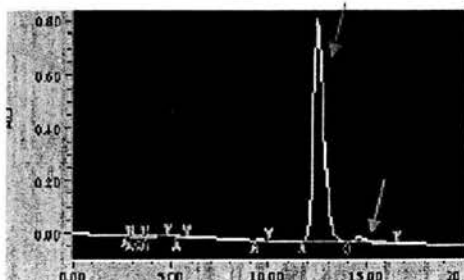
Tiempos de retención: (L) 14.8 = min (D) = 12.5 min

Cromatogramas:
(D) = 12.5 min (L) = 14.8 min

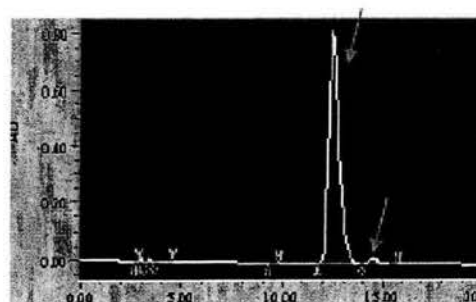
(5)



(6)



(7)





Anexo 3

Preparación de los reactivos A y B para la determinación de proteínas por el método del ácido bicinconínico (BCA)⁴⁸

Reactivo A (BCA)

BCA	5.00g
Na ₂ CO ₃ anhidro	8.55g
Tartrato dibásico dihidratado	0.80g
NaOH lentejas	2.00g
NaHCO ₃ anhidro	4.73g
H ₂ O destilada	c.b.p. 500 mL

Se disolvieron las sales en agua destilada, se ajustó el pH a 11.3 con NaOH 10N, se aforó la solución a 500 mL con agua destilada.

Esta solución es estable hasta por 6 meses en refrigeración.

Reactivo B

CuSO₄ • 5 H₂O 4 g/100 mL

Esta solución es estable hasta por 6 meses a temperatura ambiente.

Solución de trabajo **AB**: se mezcla 1 volumen de reactivo **B** + 49 volúmenes de reactivo **A**

Esta solución es estable a temperatura ambiente hasta por 2 horas, solo debe prepararse el volumen necesario.



Anexo 4

Preparación del reactivo de ninhidrina para el desarrollo de color de aminoácidos.⁴⁹

CdCO ₃	0.940 g
HCl	0.87 mL
Etanol puro	80.0 mL
Ácido acético glacial	10.0 mL
Ninhidrina	0.8 g

En un vaso de precipitados, se adicionó el carbonato de cadmio y se solubilizó con el ácido clorhídrico adicionado lentamente por goteo y con agitación, se adicionaron los demás reactivos y se guardó la solución en un frasco de polietileno en refrigeración.

Esta solución es estable hasta por 3 meses en refrigeración.



12. Abreviaturas

Abs _M	absorbancia de la muestra
Afec.	afecciones
BCA	ácido bicinconínico
CCF	cromatografía en capa fina
col.	colaboradores
Conc., [C]	concentración
COX-1	ciclooxigenasa 1
COX-2	ciclooxigenasa 2
D	dextrógiro
Da	dalton
ECA	enzima convertidora de la angiotensina
ee	exceso enantiomérico
Enfs.	enfermedades
HIV	virus de inmunodeficiencia humana
HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución
L	levógiro
L-HFA	L-homofenilalanina
M	mol/L
mM	milimolar
Mtdo.	método
N	eq/L
N-Ac-D-HFA	N-acetil-D-homofenilalanina
N-Ac-DL-HFA	N-acetil-DL-homofenilalanina
nm	nanómetros
Per.	perinatal
pH.	potencial hidrógeno
prot.	proteínas
R	Rectus (giro en el sentido de las manecillas del reloj)
rpm	revoluciones por minuto
sp	sin especie
S	Sinister (giro en sentido opuesto de las manecillas del reloj)
SSA	Secretaría de Salud
St Alb.	solución estándar de albúmina
THF	tetrahidrofurano



Tum.
Vo
[α]

tumores
velocidad inicial
rotación específica



13. Referencias bibliográficas

- 1 David Filmore, M. D. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, 35 – 39.
- 2 A. Kleemann, W. Leuchtenberger, B. Hoppe, H. Tanner; in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5th Edn.; VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1985, p.57
- 3 R. O. Duthaler (1994) *Tetrahedron* **50** 1539
- 4 K. Drauz, M. Kottenhahn, K. Makryaleas, H. Klenk, M. Bernd (1991), *Angew. Chem.* **103** 704
- 5 A. S. Bommarius, K. Makryaleas, K. Drauz (1991), *Biomed. Biochim. Acta* **50** 249
- 6 A. S. Bommarius, K. Drauz (1994), *Bioorg. Med. Chem.* **2** 617
- 7 A. S. Bommarius, K. Drauz, K. Huthmacher, M. Kottenhahn, M. Schwarm, K. Stingl (1995), *Tetrahedron Asym.* **6** 2851
- 8 G. Krix, A.S. Bommarius, K. Drauz, M. Kottenhahn, M. Schwarm (1997), *J. Biotech.* **53**. 29
- 9 W. M. Weigert, H. Offermanns, P. Scherberich (1972), *Angew. Chem.* **87** 372
- 10 M. Kottenhahn, K. Stingl, K. Drauz (1997), *Tetrahedron: Asym.* **8** 979
- 11 Ondetti, M. A., Rubin, B. y Cushman, W. (1977), *Science*, **196**, 441.
- 12 Patchett, A. y col., (1980), *Nature London*, 288, 280.
- 13 Wyratt, M. J. y col., (1984) *J. Org. Chem.*, **49**, 2816.
- 14 Herold, P., Indolese, F., Studer, M., Jalett, H. P., Siegrist, U. y Blazer, H. U., (2000) *Tetrahedron*, **56**, 6497.
- 15 M.R. Atwood, C.H. Hassall, A Krohn, G Lawton, S. Redshaw, (1986) *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* **1**, 1011.
- 16 Boyer S. K., Pfund R. A., y Portman R. (1988), *Helv. Chim. Acta*, **71** 337
- 17 Boyer, S. K.; Pfund, R. A.; Portmann, R. E.; Sedelmeier, G. H.; Wetter, H. F. (1988), *Helv. Chim. Acta* **71**, 337–343.
- 18 a). K. Chenault, J. Dahmer, G. M. Whitesides, (1989), *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 6354
b). A. S. Bommarius, K. Drauz, K. Günther, G. Knaup, M. Schwarm, (1997), *Tetrahedron Asym.* **8**, 3197
- 19 Y. E. Miller, J. D. Minna, and A. F. Gazdar, (1989), *J. of C. Inv. Inc.* **83**, 2120-2124.
- 20 A. S. Bommarius, K. Drauz, M. Schwarm, (1996), *Chimica Oggi*. **14**, 10, 61
- 21 Osol, A. (Ed), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th ed., Merck Publishing. Eaton, PA, 1980, 1170.
- 22 DeMilton, R. C.; Milton, S.C.F.; Kent, S.B.M. (1992), *Science*, **256**, 1445.
- 23 Vane, J. R.; Bakhle, Y. S.; Botting, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. (1998) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, 97



- 24 a). Ramanathan Natesh, Sylva L. U. Schwager, Edward D. Sturrock & K. Ravi Acharya, (2003), *Letters to Nature*, **421**, 551-554.
- b). Angiotensin-converting enzyme: zinc- and inhibitor-binding stoichiometries of the somatic and testis isozymes, (1991) *J. I. Biochem.* 30 **29**, 7118-7126
- c). Pfeffer, M.A., et al., (1992), Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.*, **327**(10): 669-77.
- 25 Secretaría de salud, 2002, Dirección General de Información y Evaluación del Desempeño, <http://www.salud.gob.mx>, Mortalidad 2001 ISBN 970-721-123-7
- 26 Ken-ichi T.; Hiroyuki S. (1995), *Tetrahedron asymmetry* **6**, 1641.
- 27 *Chimica Oggi/Chemistry Today*, January/February 2002 and October 2002
- 28 <http://www.ebi.ac.uk/> , <http://www.rcsb.org/pdb/>
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?dmb=Retrieve&db=OMIM&dopt=Detailed&impl=dispomimTemplate&list_uids=104620
<http://www.rcsb.org/pdb/>
Human Protein Reference Database, help@ibioinformatics.org, www.ibioinformatics.org
Copyright © 2002-03 Johns Hopkins University and the Institute of Bioinformatics.
- 29 Kraulis P. J., (1991), MolScript: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures., *J. Appl. Crystallogr.*, **24**, 946-950,
- 30 Merritt, Ethan A. and Bacon, David J. (1997), *Methods in Enzymology "Raster3D: Photorealistic Molecular Graphics"* **277**, 505-524,
- 31 Robert M. Cook, Brian J. Burke, Dorothy L. Buchhagenll, John D. Minna, and York E. Miller, (1993), *J. Biol. Chem.* **268**, 23, 17010-17017,
- 32 H. Lindner, S. Höpfner, M. Täfler-Naumann, M. Miko, L. Konrad, Klaus-Heinrich Röhm, (2000), *Biochimie* **82**, 129 –137.
- 33 <http://us.expasy.org/cgi-bin/nicedoc.pl?PDOC00613>
<http://www.isb-sib.ch/announce/> license@isb-sib.ch
- 34 R. Marshall, S.M. Birnbaum, J.P. Greenstein, (1956), *J. Biol. Chem.*, **78**, 4636,
- 35 Gade, W., and Brown, J. L. (1981), *Biochim. Biophys. Acta*, **662**, 86-93.
- 36 Heese, D., Löffler, H. G., and Rohm, K. H., (1988), *Biol. Chem. Hoppe- Seykr* **369**, 559-566.
- 37 N-Acetyl-L-methionine for use in foods for special medical purposes the EFSA, (2003), *Journal* **22**, 1-10.
- 38 Baxter, J., Kim ,Y. and Snowden, M., (2002), Hydrolysis of N-acetyl-L-glutamine by acylase, *I. J. Food Sci.* **66**, 1428-1433.
- 39 Endo, Y. (1980), In vivo deacylation of N-acetyl amino acids by kidney acylases in mice and rats. *Bioch. Biophys. Acta* **628**, 13-18.
- 40 Rotruck, J.T. and Boggs, R. W., (1975), Comparative metabolism of L-methionine and N-acetylated derivatives of methionine. *J. Nutr.* **105**, 331-337.
- 41 Francis, K.T. and Smith, R. C., (1975), *Experientia* **31**, 890-891.



- 42 Matalon, R., Michals, K., Sebesta, D., Deanching, M., Gashkoff, P., and Casanova J., (1988), *Am. J. Med. Genet.* **29**,463-471.
- 43 W. M. Jones, A. Scaloni, F. Bossa, A. M. Popowicz, O. Schneewind and J. M. Manning, (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 2194-2198.
- 44 Mitta, M., Ohnogi, H., Yamamoto, A., Kato, I., Sakiyama, F. and Tsunasawa S., (1992), *J. Biochem. (Tokio)* **112**, 737-742.
- 45 Löffler H.G., Schneider F., Aumüller G., Unsicker K., (1982), *Acta Histochem. (Supplement)* **25**, 57-60.
- 46 a) Romas J. Kazlauskas, (1989), *J. Am. Chem. SOC.*, **111**, 4953-4959.
b) M.G. Shoreibah, O. Hindsgaul and M. Pierce, (1992), *J. Biol. Chem.*, **267**, 2920-2927.
- 47 Genji Iwasaki, Rieko Kimura, Naganori Numao and Kiyosi Kondo, (1989), *Chem. Pharm. Bull.* **37(2)**, 280-283.
- 48 John M. Walker, *Basic Proteins and Peptides Protocols*, (1994), Ed. *Humana Press*, **32**, 5-8.
- 49 Etsushiro Doi, Daisuke Shibata, & Teruyoshi Matoba, (1981) *Analitical Biochem.* **118**, 173-184.