



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DESARROLLO DE UN PROCESO PARA LA ELABORACIÓN DE SALES
ORGÁNICAS DE VAINILLILAMINA, PRECURSORAS DE AMIDAS**

TESIS EXPERIMENTAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

ALONSO VIDAL RAMOS MARTÍNEZ

DIRECTOR: **DR. JOSÉ IGNACIO REGLA CONTRERAS**

ASESORA: **M. EN C. MARÍA PATRICIA SHIRLEY DEMARE NEGRETE**

MÉXICO D.F., FES ZARAGOZA FEBRERO 2015





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGREDECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, al instituto de Biotecnología UNAM y al Dr. Agustín López-Munguía Canales por el estímulo económico como ayudante de investigador. Expediente Investigador: 998 y Expediente Ayudante: 9717.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá Angélica. Gracias por todo el amor y apoyo que me has dado, no tengo palabras para expresar cuanto te quiero, simplemente eres lo más bonito e importante que la vida me ha regalado.

A mi tía Rosa. Gracias por ser una segunda mamá, por todo el cariño, por consentirme y por todo el esfuerzo que haces por nuestra familia.

A mi Abuela Magdalena. Gracias abue por quererme y preocuparte tanto por mí, por llegar a tus 92 añotes y verme alcanzar esta meta.

A mi tío Fallo. Gracias Padrino por el apoyo y cariño, por enseñarme que la familia siempre está presente sin importar la distancia.

A mi compadre Alfredo. Gracias Alfred por ser un buen amigo, un guía y un maestro a la vez.

A mi madrina Norma y mi Padrino Héctor. Gracias por el apoyo, por siempre alentarme y sentirse orgullosos de mí.

A Roge y Marisol. Gracias por el cariño, por sentirnos cerca a pesar de la distancia.

A la Familia Martínez. Gracias a todos ustedes por permitirme ser parte de ésta pequeña gran familia. Lili, Carlitos y Fallín los quiero mucho.

A los mini-humanos. Gracias a todos los pequeñines que alegran mi vida con sus sonrisas. Banja, Mia, Ian, Kyara, Monse, Aide, Aurorita y Emanuel los quiero mucho.

A la UNAM y a la Fes Zaragoza. Gracias por darme un lugar, una formación y una identidad que siempre llevo con orgullo.

A mi maestra Paty. Gracias por ser mi maestra, asesora y amiga, por apoyarme y entenderme. Es una maravillosa persona y agradezco infinitamente haberla conocido.

Al Doc Nacho. Gracias por apoyarme, por ser mi maestro y amigo, por darme grandes lecciones sobre la responsabilidad y el compromiso. Es un orgullo haber trabajado a su lado.

Al Doctor Agustín. Gracias por apoyarme e impulsarme a cumplir con esta meta.

A mi novia Haydee. Corazone gracias por quererme y aguantarme, luvyuuu! :D

A Manu. Gracias por ser mi sinodal y amigo, por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

A Iván. Gracias por ser mi amigo y por brindarme mi primer acercamiento a la química.

A la maestra Thalia. Gracias por ser mi sinodal y por ser tan amable conmigo.

Al Doctor Adelfo. Gracias por ser mi sinodal y por el apoyo brindado para alcanzar esta meta.

A mis amigos del L-8 y L-9. Gracias por el compañerismo, apoyo y por todos los ratos agradables que pasé a su lado, Señora Estela, Richy, Tere, Alejandro por mencionar algunos, gracias a todos.

Lo escrito aquí, solo es una pequeña parte de lo que siento por todos ustedes, resumir en unas cuantas líneas lo agradecido que me siento es imposible, saben que mi aprecio es infinito.

*"Cada uno da lo que recibe
y luego recibe lo que da,
nada es más simple,
no hay otra norma:
nada se pierde,
todo se transforma".*

Jorge Drexler

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1. Vainillilamina.....	3
3.1.1. Síntesis química de la vainillilamina	3
3.2. Química verde	4
3.3. Capsaicina y capsaicinoides.....	5
3.3.1. Propiedades	5
3.3.1.1. Generalidades, consumo, pungencia y producción	5
3.3.1.2. Receptores TRPV ₁	8
3.3.2. Usos comunes de la capsaicina	8
3.3.2.1. Alimentos.....	8
3.3.2.2. Fuerza no letal.....	9
3.3.2.3. Medicina	9
3.3.3. Síntesis	9
3.3.3.1. Biosíntesis de capsaicinoides.....	10
3.3.3.2. Producción In Vitro.....	10
3.3.3.3. Síntesis química	10
3.3.3.4. Síntesis enzimática.....	14
3.3.3.5. Síntesis químico-enzimática.....	16
3.3.4. Usos terapéuticos de la capsaicina y capsaicinoides.....	18
3.3.4.1. Analgésico.....	18
3.3.4.2. Anticancerígeno.....	18
3.3.4.3. Antiinflamatorio.....	19
3.3.4.4. Antioxidante.....	20
3.3.4.5. Anti-obesidad.....	20
3.3.5. Impacto económico de la capsaicina y capsaicinoides	20
4. PROBLEMA DE ESTUDIO.....	21
5. OBJETIVOS	22
6. HIPÓTESIS	23
7. METODOLOGÍA.....	24
7.1. Materiales.....	24
7.1.1. Reactivos	24
7.1.2. Equipo de laboratorio.....	25
7.1.3. Cristalería y herramientas	25
7.2. Métodos y técnicas generales.....	26

8. DESARROLLO EXPERIMENTAL	27
8.1. Obtención de la oxima de vainillina	29
8.2. Obtención del clorhidrato de vainillilamina	30
8.3. Obtención del caprilato de vainillilamina	31
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
9.1. Oxima de vainillina	32
9.2. Clorhidrato de vainillilamina	34
9.3. Caprilato de vainillilamina	37
10. CONCLUSIONES	42
11. ANEXO	43
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AcOEt: Acetato de etilo.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

CaLB: Lipasa B de la *Candida antarctica*.

CAS: Número de clasificación de los Servicios de Resúmenes Químicos (Chemical Abstracts Services).

CCF: Cromatografía en capa fina.

Eq: Equivalente.

FAR: Fenilacetilrivanil.

FDA: Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos.

g/mol: Gramos por mol.

KCl: Cloruro de potasio.

mmHg: Milímetros de mercurio.

MXP: Pesos mexicanos.

Pd/C: Paladio sobre carbono.

PPAA: Anhídrido propilfosfórico.

RMN ¹H: Resonancia magnética de hidrógeno.

rpm: Revoluciones por minuto.

TLC: Cromatografía en capa fina.

TRPV: Receptores Vainillílicos de Potencial Transitorio, seguido de un número indica el subtipo de receptor.

2. INTRODUCCIÓN

Los capsaicinoides poseen variados efectos potencialmente benéficos para la salud. Se ha reportado, por ejemplo, actividad antiinflamatoria, analgésica, anticancerígena, antitumoral, antioxidante y promotora del metabolismo de las grasas.^{18,32,45,46,49,50,51,54,55,56} Por lo anterior, los capsaicinoides tienen una posible aplicación en la clínica para el alivio del dolor, la prevención del cáncer y la pérdida de peso. Además, los capsaicinoides muestran efectos en el sistema cardiovascular y gastrointestinal.^{31,32}

La vainillilamina es el precursor sintético de los capsaicinoides. Los altos precios del clorhidrato de vainillilamina dan como resultado elevados costos de obtención de capsaicinoides, por lo que es de gran interés desarrollar un proceso económico y eficiente para la síntesis de sales de vainillilamina a partir de la oxima de vainillina, la cual se obtiene desde vainillina comercial.

En este proyecto se desarrolló un proceso eficiente para la elaboración de la oxima de vainillina, que posee las características de la química verde. Posteriormente, se desarrolló el procedimiento para obtener el clorhidrato de vainillilamina por reducción de la oxima, y finalmente se transformó el clorhidrato en caprilato de vainillilamina, el cual es utilizado en el Instituto de Biotecnología para la obtención de capsaicinoides sintéticos mediante técnicas biocatalíticas. El desarrollo tecnológico que surgió de este proyecto será transferido a una empresa productiva interesada en el mismo.

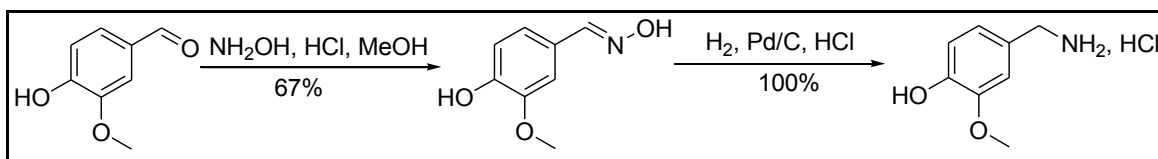
3. ANTECEDENTES

3.1. Vainillilamina

La vainillilamina (4-hidroxi-3-metoxi-bencilamina) [CAS 7149-10-2] es la materia prima en la síntesis de capsaicinoides. Es un compuesto inestable, por lo que se almacena y comercializa como el clorhidrato, este es un producto intermediario en la preparación de vainillilamida de ácido pelargónico que es utilizado como sustancia activa para inducir hiperemia, por ejemplo en ungüentos para aliviar el dolor muscular y la artritis o como aditivo alimentario de sabor picante en condimentos y saborizantes.¹

3.1.1. Síntesis química de la vainillilamina

La estrategia sintética reportada en la literatura para la síntesis del clorhidrato de vainillilamina parte de la vainillina. La oxima de vainillina [CAS 2874-33-1] se prepara a partir de vainillina por reacción con hidroxilamina. Posteriormente, la hidrogenación de la oxima catalizada con Pd/C genera vainillilamina (esquema 1).^{1,2}



Esquema 1. Síntesis de 4-hidroxi-3-metoxi-bencilamina (vainillilamina) en dos pasos.

Como se verá más adelante, los procesos reportados en la literatura para la síntesis de clorhidrato de vainillilamina tienen algunas desventajas desde el punto de vista ambiental.

3.2. Química verde

La química verde se define como el diseño de productos y procesos químicos para reducir o eliminar el uso y generación de sustancias peligrosas. Esta definición y el concepto de química verde se formuló por primera vez en el año 1990, hace más de 20 años. En los años posteriores, se ha generado una aceptación internacional que resultó en la creación de cientos de iniciativas en programas gubernamentales en química verde en todo el mundo, principalmente en los EE.UU., Reino Unido e Italia.³

Un aspecto importante de la química verde es la reducción de residuos peligrosos provocados por la industria química, además del desarrollo de procesos con ahorro económico, de energía y con optimización estequiométrica de reactivos.³

La aplicación de procesos catalíticos proporciona no sólo una solución para el problema de los residuos, también hace más eficiente el gasto de energía y la economía de materias primas (figura 1).⁴ Particularmente, el uso de biocatalizadores se considera como una alternativa prometedora.

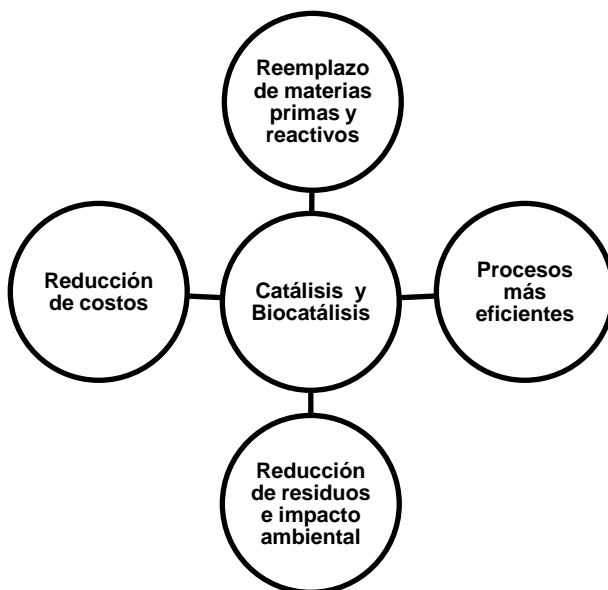


Figura 1. Ventajas de la catálisis y biocatálisis en química verde.

El uso de biocatalizadores se remonta a tiempos antiguos. Conscientemente son utilizados desde el comienzo del siglo XX; en 1930, las enzimas ya estaban siendo utilizadas en la producción industrial. Las principales fuerzas impulsoras para la aplicación de la biotecnología a escala industrial son la mayor necesidad de quiralidad y el uso de las moléculas en la industria farmacéutica, otros aspectos importantes son el elevado rendimiento de productos con alta pureza, la operación en condiciones de reacción moderadas y la utilización de medios de reacción acuosos no tóxicos.³

Siguiendo los principios de la química verde⁵, cuando son empleados disolventes orgánicos, su uso debe ser minimizado y optimizado de manera que se facilite la reacción con el mínimo de afectaciones ambientales y operaciones realizadas.

3.3. Capsaicina y capsaicinoides

3.3.1. Propiedades

3.3.1.1. Generalidades, consumo, pungencia y producción

Los chiles, pimientos o ajís, son los frutos de las plantas del género *Capsicum sp.* Han sido por muchos años parte importante de la dieta de poblaciones en varios lugares, consumiéndose frescos o secos como condimento. Son apreciados por su característica pungencia. Su consumo es muy importante en varios países en desarrollo de América Latina, de Asia y África, aunque en los últimos años se ha incrementado el consumo en países industrializados como Estados Unidos, probablemente originado por los flujos migratorios.⁶

Según las estadísticas de producción agrícola de la FAO de 2009, China es el primer productor de chile verde en el mundo. México ocupa el segundo lugar, seguido de Turquía, Indonesia y España. En cuanto a la producción de chiles secos, India es el primer productor a nivel mundial y México se encuentra en el lugar 11. En México el chile es el décimo cultivo más importante.⁷

La capsaicina (*trans*-8-metil-*N*-vainillil-6-nonenamida) [CAS 404-86-4] es la sustancia responsable del picor de los chiles. Además, en los frutos de las plantas del género *Capsicum sp.* se pueden encontrar compuestos análogos con diferentes grados de pungencia. Entre los principales compuestos capsaicinoides presentes en estas plantas están los siguientes: nornorcapsaicina, norcapsaicina, homocapsaicina, nornordihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, dihidrocapsaicina y homodihidrocapsaicina (figura 2). Sin embargo, aproximadamente el 90 % del picor es debido a la capsaicina y la dihidrocapsaicina. Estos compuestos se sintetizan y almacenan principalmente alrededor de las semillas, en la placenta que las recubre, y la cantidad acumulada depende de varios factores, entre ellos el genotipo de la planta y las condiciones de cultivo.⁸ La síntesis de capsaicinoides en la placenta de las semillas se lleva a cabo por condensación de ácidos grasos con vainillilamina. Estos compuestos son estables en disolventes orgánicos y no orgánicos y producen sensación de quemazón al contacto con piel y algunas mucosas.⁹

Se ha descrito otro grupo de análogos de la capsaicina, que son los capsinoides. Entre ellos se encuentra el capsiato, el dihidrocapsiato y el nordihidrocapsiato.¹⁰ Su estructura es similar a las de los capsaicinoides, pero poseen un grupo éster en lugar de la amida presente en los capsaicinoides (figura 2). Esta diferencia tiene como resultado una menor pungencia que en los capsaicinoides.⁹ El capsiato se describió por primera vez en 1998, cuando fue aislado de una variedad de chiles dulces no picantes.¹¹

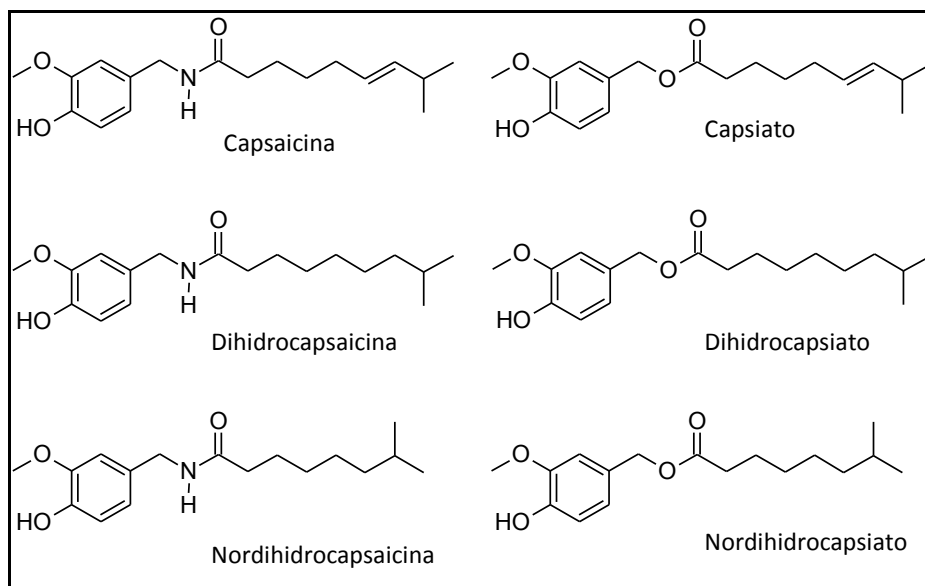


Figura 2. Algunos de los principales capsaicinoides (izquierda) y capsinoides (derecha) encontrados en los frutos de plantas del género *Capsicum* sp.

Desde hace muchos años han sido descritas varias aplicaciones farmacéuticas de la capsaicina y algunos análogos. Esto, sumado a su interés gastronómico, ha impulsado a varios investigadores a buscar formas de obtener mayores rendimientos en su producción.

La capsaicina fue cristalizada por primera vez en 1876 por Tresh y en 1919 fue descrita su estructura por Nelson y Dawson.¹² Es un producto cristalino blanco sin olor, con fórmula $C_{18}H_{27}NO_3$ y peso molecular de 305.40 g/mol, soluble en alcohol, en grasas y ácidos grasos e insoluble en agua. Presenta isomerismo *cis-trans*, encontrándose en la naturaleza como el isómero *trans*.¹³

De acuerdo a su relación estructura-actividad se puede dividir a la molécula de los capsaicinoides en tres regiones (figura 3), la del anillo vainilloide, la del enlace central (amida) y la de la cadena terminal hidrofóbica. Se sabe que los sustituyentes en las posiciones 3 y 4 del anillo son importantes para la potencia pungente. Así mismo, un grupo hidrofóbico es necesario para una alta potencia; los capsaicinoides con una cadena de entre 8 y 9 carbonos presentan la mayor actividad.¹³

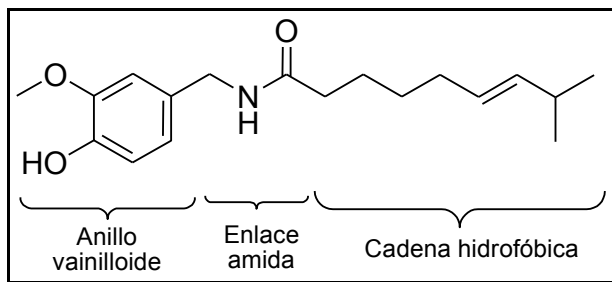


Figura 3. División de la molécula de la capsaicina en relación con su estructura-actividad. La primera región de izquierda a derecha corresponde a la del anillo vainilloide, la segunda a la del enlace amida y la tercera a la porción de la cadena terminal hidrofóbica.

3.3.1.2. Receptores TRPV₁

La capsaicina actúa sobre los Receptores Vainillílicos de Potencial Transitorio 1 (TRPV₁) como un potente y selectivo agonista. Estos receptores son canales iónicos puerta-ligando que se encuentran en nervios sensores y responden a estímulos químicos como la capsaicina y sus análogos, calentamiento nocivo y ácidos.¹⁴ Teóricamente deberían emplearse antagonistas de los receptores TRPV₁ para bloquear las sensaciones de dolor; sin embargo estos agonistas (como la capsaicina) promueven una inicial excitación de neuronas sensoras, seguida de un estado persistente de insensibilidad, provocando diversos efectos fisiológicos en el organismo.

3.3.2. Usos comunes de la capsaicina

3.3.2.1. Alimentos

Debido a la sensación de “picazón” causada por la capsaicina cuando entra en contacto con las membranas mucosas, ésta se utiliza comúnmente en los productos alimenticios para darles una sazón picante y/o sensación de “calor” al contacto con las mucosas. Hay muchos tipos de productos alimenticios que contienen capsaicina, por ejemplo, salsas picantes, sazonadores, golosinas, bebidas, entre otros.¹⁵

En México se conocen más de 35 variedades de chile, los cuales son consumidos tanto frescos como secos, dando a la comida mexicana su sazón característica. Algunas variedades, como el guajillo y el de árbol, se utilizan en la industria alimentaria como

materia prima en la extracción de oleorresinas de chile, que son empleadas como colorantes y saborizantes (BioquimexReka S.A. de C.V., por ejemplo). Los principales capsaicinoides que se encuentran en la oleorresina del chile de árbol son la capsaicina o *N*-vainillin-8-metil-6-nonenamida (70 %), la dihidrocapsaicina (22 %) y otros tres en menor cantidad, la nordihidrocapsaicina (7 %), la homocapsaicina (1 %) y la homodihidrocapsaicina (1 %). De todos estos compuestos, la capsaicina es el más pungente.¹⁶

3.3.2.2. Fuerza no letal

La capsaicina es también el ingrediente activo en los agentes químicos para el control de disturbios y defensa personal, como lo es el llamado “spray de pimienta”. Cuando el aerosol entra en contacto con la piel, especialmente en los ojos o las mucosas, es muy doloroso; respirar pequeñas partículas del aerosol puede causar dificultad para respirar, lo cual sirve para disuadir a los agresores.¹⁷

La capsaicina también se utiliza para repeler plagas de mamíferos. Los objetivos específicos de los repelentes de capsaicina son los ratones de campo, ciervos, conejos, ardillas, perros de ataque y algunos insectos.¹⁷

3.3.2.3. Medicina

La capsaicina se usa como un analgésico en pomadas tópicas, aerosoles nasales y parches dérmicos para aliviar el dolor. Se puede aplicar en forma de crema para el alivio temporal de dolores menores, dolores musculares y de articulaciones asociados con la artritis, dolor de espalda, torceduras y esguinces.¹⁸ También se utiliza para reducir los síntomas de la neuropatía periférica, como la neuralgia post-herpética causada por el virus del herpes zóster.¹⁹

3.3.3. Síntesis

Se han descrito varias rutas para la producción de capsaicina y capsaicinoides:

3.3.3.1. Biosíntesis de capsaicinoides.

Se efectúa por la acción de la capsainasintetasa sobre una cadena de ácido graso y vainillilamina; requiere la presencia de iones magnesio Mg^{2+} , ATP y Coenzima A.¹³ La vainillilamina es un intermediario de la vía de síntesis de los fenilpropanoides que forma compuestos derivados del esqueleto de la fenilalanina, requeridos en la biosíntesis de la lignina, y que sirven como precursores para muchos otros compuestos como cumarinas, lignanos y flavonoides, involucrados en la defensa, soporte estructural y supervivencia de muchas plantas.²⁰ La modificación en las condiciones de cultivo del chile puede alterar la concentración de capsaicina y análogos. El cultivo en condiciones de poca humedad puede generar una mayor producción de capsaicina en los frutos. El estado nutricional y las condiciones físicas de los chiles pueden también influir en la concentración.²¹ El aislamiento de capsaicina proveniente de frutos requiere necesariamente de un proceso de extracción y purificación que se enfrenta a dificultades inherentes a los escasos rendimientos (30 a 40 % del total de capsaicina en el fruto) y a las características organolépticas del compuesto, que hacen difícil su manejo.

3.3.3.2. Producción *In Vitro*.

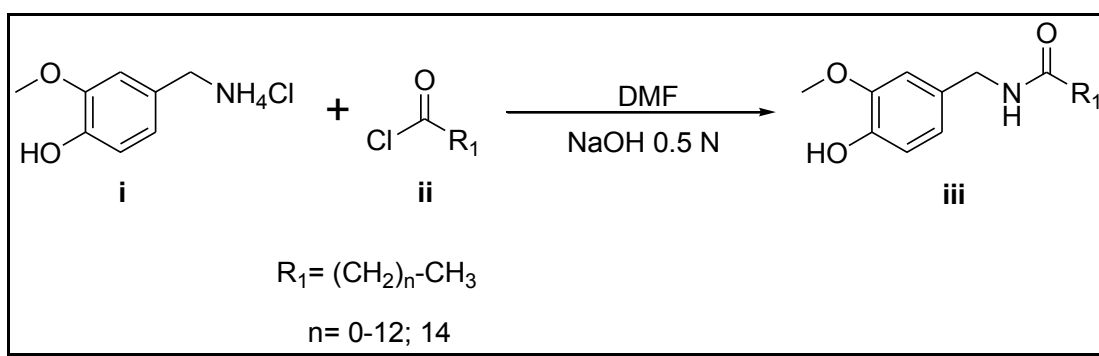
Se ha logrado la obtención de capsaicina y sus análogos cultivando diferentes células de chile. Los cultivos pueden hacerse en suspensión o con células inmovilizadas, presentando estos últimos mayores rendimientos. Se puede modificar la acumulación de capsaicinoides inhibiendo la producción de biomasa o con la adición de precursores en el cultivo.^{13,21}

3.3.3.3. Síntesis química

Las aplicaciones médicas de los capsaicinoides han estimulado la búsqueda de rutas sintéticas para su producción. Sin embargo, la pungencia que estos compuestos poseen, puede limitar sus aplicaciones, por lo que se ha buscado obtener compuestos que mantengan las propiedades deseadas de los capsaicinoides, pero sin el picor que podría limitar su uso.¹³ Entre las síntesis descritas, la combinación de estrategias químicas y enzimáticas puede representar ventajas en relación con seguridad, selectividad e impacto ambiental.²²

Tras el interés que se ha generado en los capsaicinoides y capsinoides y sus posibles aplicaciones, distintos grupos de trabajo han tratado de obtener nuevos compuestos análogos de la capsaicina que posean mejores características que permitan su aplicación.

McIlvain y col. describen la acilación del clorhidrato de 4-hidroxi-3-metoxibencilamina (i) (clorhidrato de vainillilamina) con diferentes cloruros de acilo (ii) para obtener diversos capsaicinoides (iii), como se ilustra en el esquema 2.²³



Esquema 2. Acilación del clorhidrato de vainillilamina (i) con diversos cloruros de acilo (ii)

En 1996, Appendino reportó la síntesis de nuevos y potentes capsaicinoides, que demostraron tener una gran afinidad por receptores vainillílicos.²⁴ En 2001 Lee y su grupo reportaron las síntesis de potentes antagonistas, análogos de benzacepina y de tetrahydroisoquinoleina.²⁵ Posteriormente en 2002, este mismo grupo presentó un trabajo en el que se compara la actividad como antagonistas TRPV1 de dos compuestos análogos de la capsazepina, uno de los cuales se encuentra fluorado.²⁶ Basado en estos estudios, en 2003, Appendino reportó la síntesis de compuestos halogenados (Cl, Br e I) análogos de la nordihidrocapsaicina (figura 4). La halogenación se llevó a cabo en las posiciones 5 o 6 del anillo vainillílico. Los compuestos obtenidos resultaron ejercer efectos antagonistas sobre TRPV1, efectos contrarios a los que por sí mismo tiene el compuesto no halogenado. Los antagonistas más potentes fueron los que se encontraban halogenados en la posición 6, y el compuesto de yodo presentó la mayor potencia de todos.²⁷

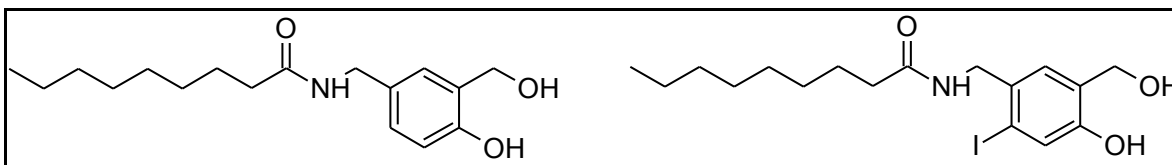
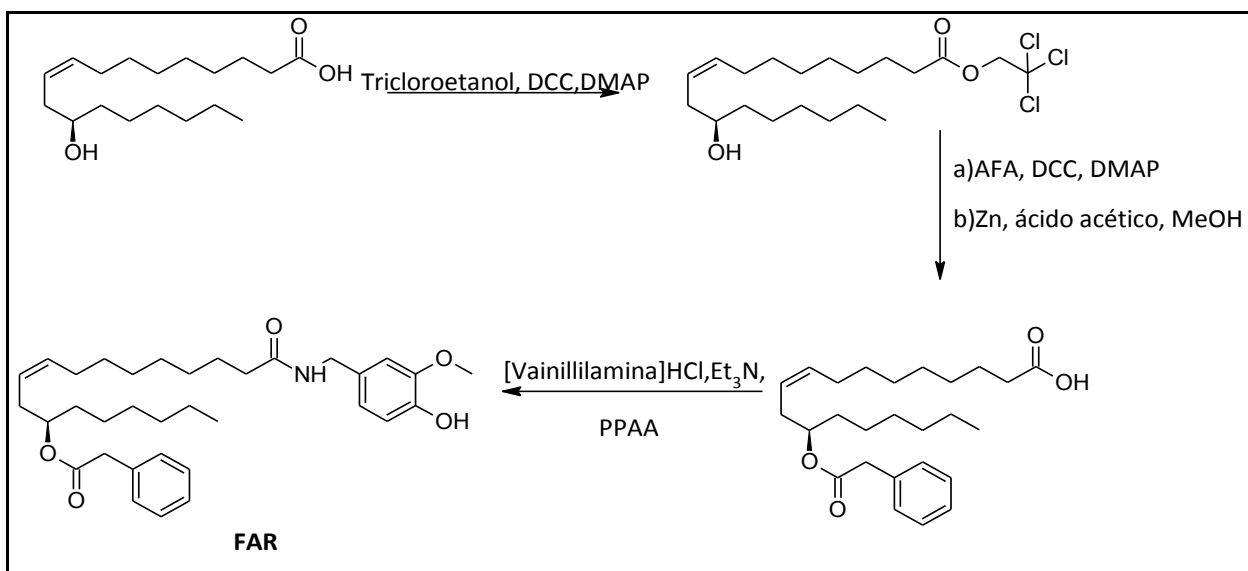


Figura 4. Izquierda, nordihidrocapsaicina empleada por Appendino para la síntesis de compuestos halogenados. Derecha, compuesto iodado en posición 6 del anillo vainillílico obtenido por Appendino.²⁷

En 2002, el mismo Appendino²⁸ reportó la síntesis de nuevos análogos de la capsaicina, como rinvanil a partir de olvanil. Observó que las insaturaciones y/o la presencia de grupos polares podían mantener o incluso mejorar la actividad del compuesto. El olvanil es un capsaicinoide similar a la capsaicina, pero con un mínimo de pungencia;²⁹ por eso se ha extendido el interés en desarrollar análogos no pungentes.

En 2005, Appendino,³⁰ reportó la síntesis de fenilacetilrinvanil (FAR) a partir de ácido ricinoleico. Primero protegió el ácido carboxílico usando tricloroetanol, para así poder realizar una fenilacetilación sobre el alcohol de la posición 12 y posteriormente desproteger al ácido y transformar en la amida empleando clorhidrato de vainillilamina, trietilamina y anhídrido propilfosfónico (PPAA) (esquema 3). Evaluó la actividad de varios análogos con diferentes cadenas de ácidos grasos, pero se obtuvieron los mejores resultados con el FAR, que demostró ser un muy potente agonista de los TRPV₁, con una actividad similar al agonista más potente descrito (resiniferatoxina; 20 veces más potente que la capsaicina).



Esquema 3. Ruta de síntesis descrita por Appendino³⁰ para la obtención de Fenilacetilrinvanil.

Diferentes capsaicinoides han sido aislados de distintas variedades de chile por medio de técnicas de CCF o HPLC. Sin embargo, el contenido relativo de los componentes depende del género y especie y las concentraciones totales pueden ser muy bajas. Por ejemplo, se ha reportado que existen análogos de capsaicina con cadenas laterales largas de alquilo (C₁₄-C₂₀) que no tienen ningún sabor picante, pero aun así estimulan la liberación de adrenalina y aumentan el metabolismo de las grasas.^{31,32} Desafortunadamente, estos análogos de capsaicina de cadena larga no picantes son componentes menores en chiles y son difíciles de separar de la capsaicina natural. Por lo tanto, la síntesis química de análogos de la capsaicina ha sido motivada por la búsqueda de sustitutos picantes de capsaicina natural y el desarrollo de fármacos no irritantes, con propiedades antioxidantes y con otros tipos de actividad.

El éxito limitado en la producción química de análogos de capsaicina a partir de vainillilamina y donadores de acilo se debe, entre otros factores, a la toxicidad de los agentes catalíticos y condensantes, la formación de productos no deseados y los procesos engorrosos de protección y desprotección del hidroxilo fenólico. El uso de enzimas para las transformaciones novedosas y eficientes de compuestos orgánicos es uno de los resultados más impresionantes de la interacción entre la química orgánica y la

enzimología. Como consecuencia, la síntesis enzimática de análogos de capsaicina se ha convertido en una alternativa interesante a la síntesis química tradicional.

3.3.3.4. Síntesis enzimática

El empleo de enzimas en la síntesis orgánica tiene una gran importancia, derivada de las ventajas que presenta sobre los métodos convencionales de síntesis química. Las enzimas son compuestos de naturaleza proteica, sintetizados por organismos vivos, como catalizadores naturales involucrados en un sinnúmero de reacciones llevadas a cabo como parte de sus procesos biológicos.

Las enzimas usadas en la catálisis de reacciones orgánicas pueden ser de tipo salvaje cuando son usadas tal cual las ha producido el organismo en cuestión, recombinadas cuando se emplean técnicas de intercambio de genes para obtener enzimas con mejores características y genéticamente modificadas cuando se ha manipulado genéticamente al organismo para producir enzimas con características deseadas (por ejemplo, hacerlas resistentes y funcionales en distintos rangos de temperatura o pH). Durante la reacción, las enzimas pueden encontrarse disueltas, suspendidas o inmovilizadas, y algunas pueden emplearse en disolventes orgánicos, acuosos o mezclas bifásicas. Regularmente cuando se emplean de forma inmovilizada, se pueden recuperar y ser recicladas varias veces sin pérdida importante de su actividad. También pueden emplearse microorganismos vivos que produzcan la enzima catalítica.³³

La biocatálisis de reacciones orgánicas tiene grandes ventajas sobre la catálisis química común. El empleo de catalizadores enzimáticos ofrece una mayor regio, quimio y estereo selectividad, convirtiéndolos en el medio perfecto para la obtención de compuestos enantiopuros, al ser la quiralidad un factor importante en la actividad de los fármacos enantioméricos. Sin embargo, el empleo de enzimas no se reduce a la síntesis de compuestos quirales, sino que también es empleada en la obtención de algunos compuestos que por medios químicos convencionales sería muy complicado o imposible sintetizar, presentando como ventajas el poder catalizar reacciones a temperatura ambiente y reducir la generación de productos indeseados como resultado de reacciones de isomerización, racemización, epimerización o transposición favorecidas por condiciones de reacción más extremas.³⁴

Adicionalmente a las ya citadas ventajas de la biocatálisis, se suman ventajas en los aspectos económicos y ambientales. Al ser altamente selectivas se puede reducir el número de pasos de una reacción e incrementar los rendimientos, lo que a su vez repercute positivamente, favoreciendo una disminución en el consumo de recursos y disminuyendo el impacto ambiental que significa el empleo de algunos disolventes o fuentes de energía altamente contaminantes, a veces requeridas en reacciones de síntesis por métodos comunes. Por otro lado, el empleo de métodos enzimáticos para la producción de perfumes, saborizantes o fragancias, puede permitir su comercialización como “productos naturales” ayudando a su aceptación en el mercado.³⁵

Existen diferentes enzimas que son empleadas en la síntesis de compuestos orgánicos, dependiendo del tipo de reacción que catalicen. Dentro de estas enzimas, las lipasas son empleadas principalmente para catalizar hidrólisis, alcoholólisis, aminólisis, esterificaciones y transesterificaciones sobre triglicéridos y análogos, y tienen actividad sobre ácidos grasos de cadenas saturadas cortas a largas, desde 4 hasta 16 átomos de carbono.³⁶

La lipasa B de *Candida antarctica* (CaLB) tiene como sustratos una gran variedad de alcoholes primarios y secundarios. Sin embargo, su actividad sobre ácidos carboxílicos se reduce principalmente a ácidos de cadenas no ramificadas.³⁴ La CaLB es empleada para catalizar hidrólisis en medios acuosos y esterificaciones en disolventes orgánicos; tiene varias aplicaciones industriales gracias a su alta estereoselectividad, amplio rango de sustratos y su estabilidad térmica y en disolventes orgánicos. La CaLB pertenece a la familia de las alfa-beta hidrolasas.³⁷ Todas estas características han servido de incentivo para el estudio y modificación de la enzima en busca de obtener mejores características, incrementar el número de sustratos, el rango térmico, incrementar la expresión en los microorganismos productores, etc.³⁸

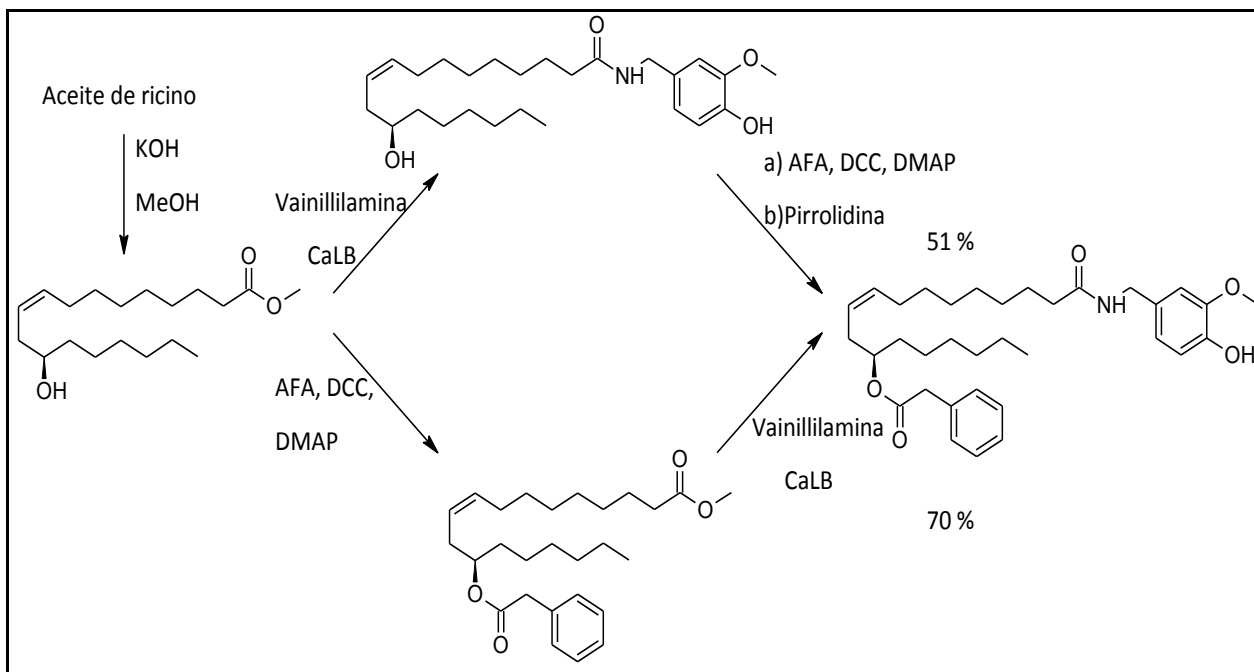
Kobata y col. reportaron conversiones de 40-59 % después de 72 h en la síntesis catalizada por lipasa de análogos de capsaicina por amidación de vainillilamina con diferentes donantes de acilo en un medio tampón de borato.³⁹ En informes más recientes, los mismos autores llevaron a cabo la síntesis de análogos de la capsaicina por

transacilación de la capsaicina con ácidos grasos libres o aceites naturales, empleando CaLB en hexano o CO₂ supercrítico. En este último caso, se obtuvo 54 % de las amidas en CO₂ supercrítico después de 72 h a 19 MPa. Para la síntesis de vainilliltetradecanamida se informaron conversiones de 85 % a 70 ° C en condiciones similares.^{38,40}

Reyes-Duarte y colaboradores en 2002,⁴¹ sintetizaron olvanil a partir de ácido oleico y clorhidrato de vainillilamina mediante una reacción enzimática catalizada por CaLB, explorando diferentes medios orgánicos. Ya antes⁴² se había intentado este tipo de síntesis en un sistema bifásico (orgánico-acuoso) pero con un rendimiento muy bajo, quizá por la competencia entre la aminólisis y la hidrólisis catalizada por la misma enzima. Castillo, miembro del mismo grupo de trabajo, reportó también la síntesis de capsiato, promovida por CaLB, a partir de capsaicina.

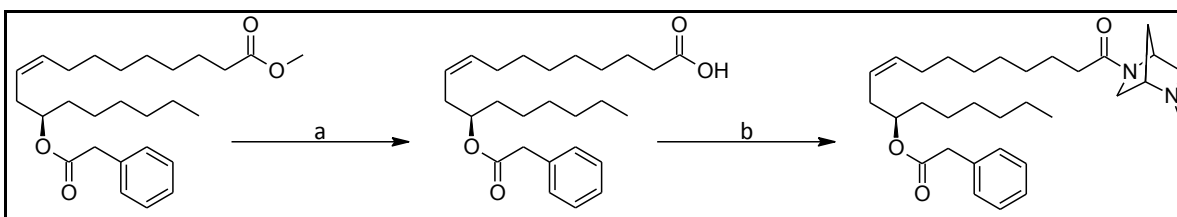
3.3.3.5. Síntesis químico-enzimática

Castillo y colaboradores, reportaron en 2008⁴³ la obtención de FAR partiendo de aceite de ricino, que por metanólisis generó ricinoleato de metilo. Se exploraron dos posibilidades a partir de aquí, con vainillilamina y CaLB. La primera consistió en la aminólisis enzimática del ricinoleato con vainillilamina y su posterior fenilacetilación. La segunda estrategia fue realizar primeramente la fenilacetilación de ricinoleato de metilo y después la aminólisis selectiva catalizada por la enzima, con posterior desacilación regioselectiva con pirrolidina. La innovación de este método es el empleo de catalizadores enzimáticos (CaLB) que incrementan el rendimiento global de estas reacciones (esquema 4).



Esquema 4. Las dos estrategias de síntesis de FAR reportadas por Castillo y colaboradores.⁴³

Recientemente, López-Ortiz y col.⁴⁴ reportaron la síntesis de nuevos análogos del FAR, en donde se ha sustituido la vainillilamina por *N*-metil-(2,5)-diazabicycloheptano (esquema 5). Estos autores describieron también la actividad de estos compuestos sobre los receptores canabinoides 1 (CB₁).



Esquema 5. Síntesis del análogo de FAR reportada por López-Ortiz.⁴⁴ Condiciones de reacción: a) Novozym 435 (CaLB), acetona/agua 6:4, buffer de fosfatos 100 mM pH 7,5, 37 ° C, 1 hora; b) 1. Cloruro de pivaloilo, diclorometano; 2. *N*-metildiazabicyclo heptano.

3.3.4. Usos terapéuticos de la capsaicina y capsaicinoides

Se han descrito múltiples efectos farmacológicos y fisiológicos para los capsaicinoides, incluyendo actividad analgésica, antiinflamatoria, anticancerígena, antitumoral, antioxidante y anti-obesidad. Por lo tanto, tienen un alto valor potencial en la clínica para el alivio del dolor, la prevención del cáncer y la pérdida de peso. Además, los capsaicinoides también muestran beneficios en el sistema cardiovascular y gastrointestinal.⁴⁵

3.3.4.1. Analgésico.

Formulaciones tópicas con distintas concentraciones de capsaicina (regularmente de entre 0,025 a 0.1 %) son empleadas en el tratamiento del dolor. En 1850 se generó el primer reporte formal de su uso en el tratamiento del dolor. En este reporte se recomienda la aplicación de un extracto alcohólico en el tratamiento de la sensación de quemazón y picazón de piernas.⁴⁶ La capsaicina es el principal capsaicinoide empleado en el tratamiento del dolor. Se usa de forma tópica y local en el tratamiento de la inflamación por calentamiento y la hiperalgesia por contacto con químicos nocivos. También se emplea en el tratamiento del dolor por artritis reumatoide o la fibromialgia y hay un estudio clínico en fase 2 donde se prueba como tratamiento a largo plazo en el dolor postquirúrgico y de la osteoartritis. Las cremas de uso tópico en general tienen una actividad de media a pobre en el tratamiento del dolor crónico.¹⁸

El capsiato es más lipofílico y menos estable en las condiciones acuosas fisiológicas. Es probable que debido a esta inestabilidad no presente efectos analgésicos.¹⁸

3.3.4.2. Anticancerígeno

El cáncer es un conjunto de más de 100 enfermedades que se caracterizan por el crecimiento anormal de un grupo de células en el cuerpo.⁴⁷

Se estima que en países industrializados, el cáncer es la primera causa de muerte, mientras que en países en desarrollo ocupa la segunda después de las enfermedades cardiovasculares. Según la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, durante 2008 se presentaron 12.7 millones de casos nuevos y 7.6 millones de personas murieron por algún proceso canceroso.⁴⁸

Desde hace ya años ha sido demostrado que capsaicina y dihidrocapsaicina poseen actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*. En cultivos celulares la capsaicina puede bloquear la migración de células cancerosas de mama y matar células cancerosas de próstata.⁴⁹ En animales, la capsaicina ha logrado reducir en 50 % el tamaño de tumores de cáncer de mama así como reducir en 80 % lesiones pre-neoplásicas y la inyección directa de capsaicina puede reducir hasta 80 % el tamaño del tumor.⁵⁰ La capsaicina también ha demostrado inducir la apoptosis de células humanas de cáncer de lengua.⁵¹

Los capsaicinoides previenen la proliferación, la migración e inducen la apoptosis de células malignas. La proliferación juega un papel principal en el desarrollo del cáncer en cualquier estadio. Se ha reportado la represión del crecimiento de células inmortalizadas o de ciertos tipos de líneas celulares cancerosas empleando capsaicina o dihidrocapsaicina por la vía del arresto de ciclo celular, la apoptosis, la autofagia y/o por la vía de la activación metabólica celular.

Aunque la actividad anticancerígena de capsaicinoides es bien reconocida, hay datos contradictorios sobre sus efectos contra el cáncer y su prevención. Hay reportes de que los extractos de capsaicina del chile pueden también actuar como co-cancerígenos o promotores de tumores.⁵² Además, se ha propuesto que los metabolitos de la capsaicina (tales como los radicales fenoxireactivos) pueden atacar el ADN y activar la mutagenicidad y transformación maligna.⁵³

3.3.4.3. Antiinflamatorio

Las propiedades antiinflamatorias que posee la capsaicina están relacionadas con su capacidad para inhibir la expresión del microRNACiclooxigenasa 2 (COX-2) inducible, involucrado en procesos dolorosos y la respuesta inflamatoria.⁵⁴

3.3.4.4. Antioxidante

En 2012, Si y colaboradores,⁵⁵ estudiaron las propiedades antioxidantes de la capsaicina, buscando el grado de oxidación de los ácidos grasos presentes en muestras de aceite de canola, sometidas a diferentes condiciones de temperatura, encontrando que el grado de oxidación disminuía en relación directa a la cantidad de capsaicina que se adicionó a cada muestra.

3.3.4.5. Anti-obesidad

En 2013, en un estudio de revisión, Stephen Whiting y colaboradores⁵⁶ reportan que la pérdida de peso relacionada con el consumo de capsaicina se produce por el incremento del gasto energético, el incremento en la oxidación de lípidos y la reducción de apetito, y aunque no se entiende bien el mecanismo, se acepta que estos efectos están relacionados con la función de los TRPV₁.

3.3.5. Impacto económico de la capsaicina y capsaicinoides

Para la síntesis química de los capsaicinoides, la vainillilamina es el compuesto precursor. Este compuesto tiene un precio comercial de \$556.00 MXP el gramo y sólo es distribuido por Laboratorios SIGMA-ALDRICH en dicha presentación, mientras que un gramo de vainillina (la materia prima de la vainillilamina) se puede adquirir por \$2.40/g MXP en presentación de dos kilogramos en la misma distribuidora. Por otra parte, el precio de un gramo de capsaicina de SIGMA-ALDRICH es de \$12,050.00 MXP (precios consultados el 20-enero-2015).

4. PROBLEMA DE ESTUDIO

Las variadas aplicaciones de la capsaicina, así como de diferentes análogos capsaicinoides, en los campos alimenticio, farmacéutico, de defensa personal y de control de plagas promueven el desarrollo de métodos eficientes de obtención de estos compuestos. Es, por tanto, de gran interés explorar la síntesis y el empleo de diferentes sales orgánicas obtenidas a partir de vainillilamina y ácidos carboxílicos de cadena larga como precursores para la síntesis de capsaicinoides, en un proceso eficiente, ambiental y económicamente viable.

5. OBJETIVOS

I. General:

- Desarrollar un proceso eficiente y económico para la elaboración de sales orgánicas precursoras de capsaicinoides sintéticos.

I.I. Específicos:

- Desarrollar condiciones eficientes de reacción para la obtención de la oxima de vainillina, a partir de vainillina comercial.

- Desarrollar condiciones de reacción eficientes, seguras y económicamente viables para la obtención de vainillilamina a partir de la oxima de vainillina.

- Desarrollar un proceso de síntesis eficiente y económicamente viable para la obtención de sales orgánicas de vainillilamina con ácidos carboxílicos de 8 a “n” carbonos.

- Escalar hasta 100 g del producto final el proceso que haya demostrado tener los mejores resultados en cuanto a alto rendimiento del producto, condiciones de seguridad y bajo daño ambiental.

6. HIPÓTESIS

Es posible desarrollar un proceso seguro, así como económica y ambientalmente viable para la obtención de sales de vainillilamina con ácidos grasos, como precursores en la síntesis de capsaicinoides.

7. METODOLOGÍA

7.1. Materiales

7.1.1. Reactivos

Los materiales químicos que se emplearon en este trabajo pertenecen al inventario de reactivos del Laboratorio 9 planta alta de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza. Los reactivos empleados fueron adquiridos en Aldrich®, a menos que se especifique lo contrario, y los disolventes fueron purificados por destilación fraccionada.

- 2-Metil-2-butanol (2M-2B)
- Acetato de etilo (AcOEt)
- Acetato de sodio (AcONa)
- Acetona ($\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$)
- Ácido acético ($\text{CH}_3\text{-COOH}$ ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$))
- Ácido caprílico ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_6\text{-COOH}$)
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Ácido metansulfónico ($\text{CH}_3\text{-SO}_3\text{H}$)
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
- Buffer de fosfatos pH 7,5
- Celita
- Clorhidrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH HCl}$)
- Diclorometano (DCM)
- Heptano ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)
- Hexano ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)
- Hidrógeno gas (INFRA)
- Hidróxido de amonio (NH_4OH)
- Hidróxido de potasio (KOH)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym® 435)
- Metanol (MeOH)
- Metil-ter-butiléter (MTBE)
- Nitrógeno molecular (N_2 gas)
- Paladio sobre carbón al 5 % (Pd/C 5%)
- Potasa metanólica 1.1 M (KOH/MeOH 1.1 M)
- Soluciones buffer pH 7 y pH 4
- Sulfato de sodio (Na_2SO_4)
- Tolueno ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$)

- Trietilamina (Et₃N)
- Vainillina comercial

7.1.2. Equipo de laboratorio

- Agitadores magnéticos
- Aparato de hidrogenación Parr Instrument Company
- Aparato de puntos de fusión Fisher Johns
- Balanza analítica Ohaus mod EP64C
- Bomba de vacío Vacuubrand mod MZ2CNT
- Canastillas de calentamiento
- Incubadora con agitación orbital Heidolph Unimax 1010
- Lámpara de UV UVGL-58
- Micro-pipetas Gilson EK91997
- Potenciómetro Metrom
- Reóstatos Estaco-Energy 3PN1010B
- Rotavapor Büchi mod R-205
- Sonificador Aquasonic 150D

7.1.3. Cristalería y herramientas

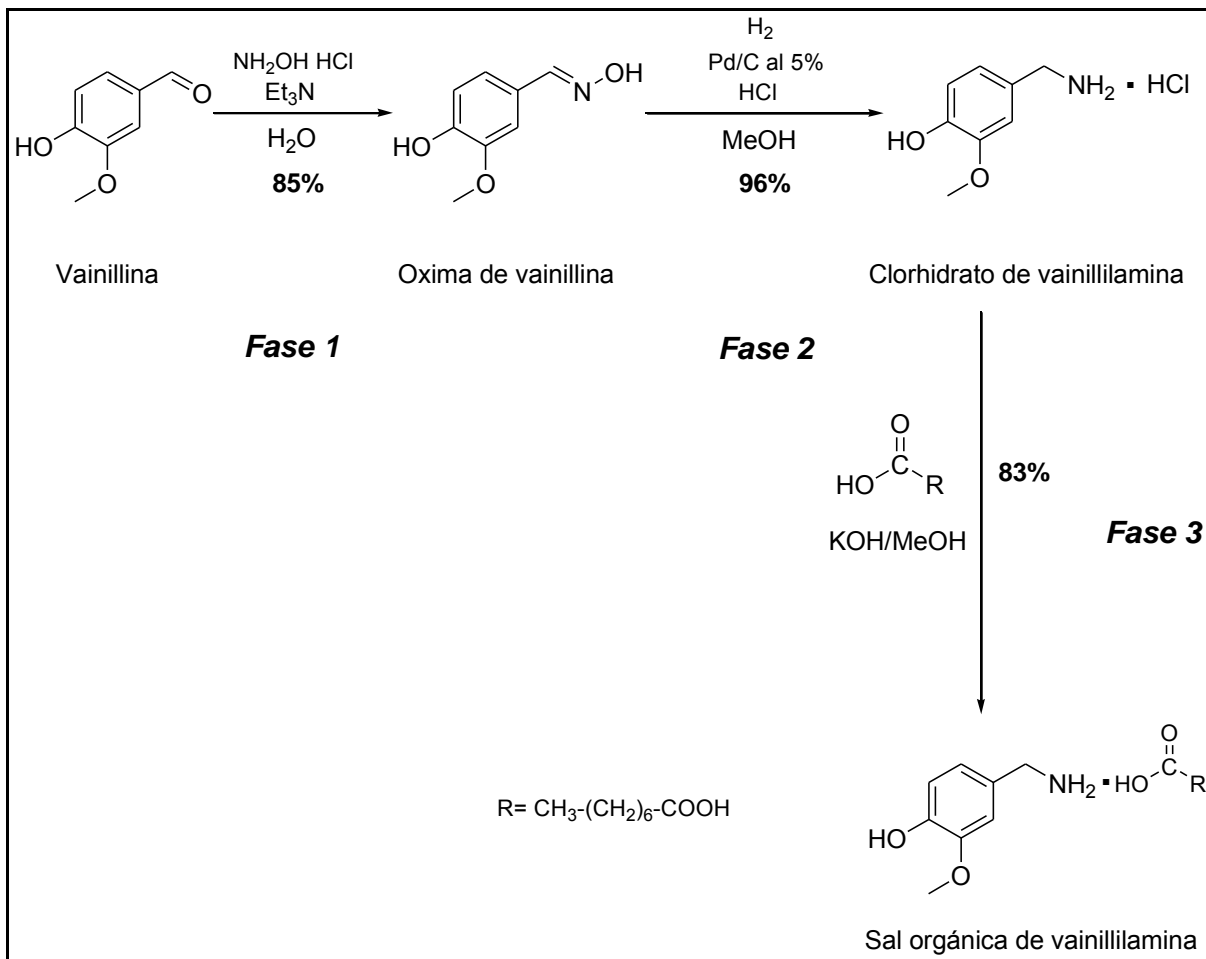
- Botella para hidrogenación
- Cabeza y cola de destilación
- Columna vigreux
- Embudos Büchner
- Embudos Hirsch
- Mangueras de hule
- Matraces balón junta esmerilada
- Matraces Erlenmeyer
- Matraces Kitasato
- Tubo refrigerante en espiral
- Vasos de precipitado

7.2. Métodos y técnicas generales

El curso de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina, empleando cromatofolios ALUGRAM® SIL-G/UV254 y como reveladores radiación ultravioleta 254/366 nm, vapores de yodo y solución de ninhidrina.

Los productos se caracterizaron por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^1H y realizada en un equipo JEOL Eclipse de 300 MHz, empleando tetrametilsilano como referencia interna y como disolvente CDCl_3 .

8. DESARROLLO EXPERIMENTAL



Fase 1

Se realizó la síntesis química de la oxima de la vainillina a partir de vainillina comercial, clorhidrato de hidroxilamina y trietilamina, usando agua destilada como disolvente. Se obtuvo un rendimiento del 85%.

Fase 2

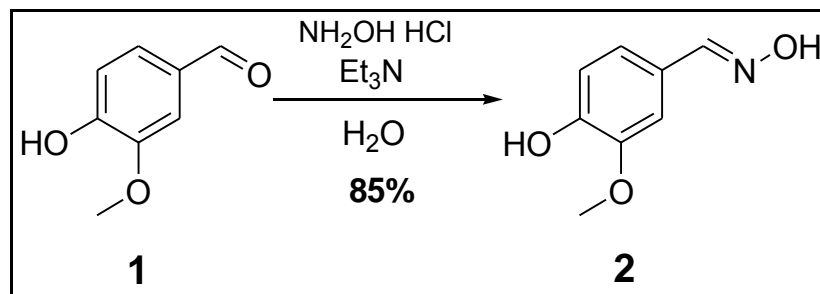
Se llevó a cabo la reducción de la oxima de la vainillina utilizando paladio sobre carbono al 5% como agente reductor, ácido clorhídrico concentrado y metanol como disolvente para obtener el clorhidrato de vainillilamina. Se obtuvo un rendimiento del 96%.

Fase 3

Se realizó la reacción ácido-base entre la vainillilamina y el ácido carboxílico (R), utilizando potasa metanólica para la liberación de la vainillilamina a partir del clorhidrato. Se obtuvo un rendimiento de 83 %.

8.1. Obtención de la oxima de vainillina

Se mejoró el método reportado de obtención de oxima de vainillina (**2**)² empleando trietilamina como base y agua como disolvente, partiendo de vainillina comercial (**1**), con rendimiento del 85% y con un proceso ambientalmente benigno (esquema 6).

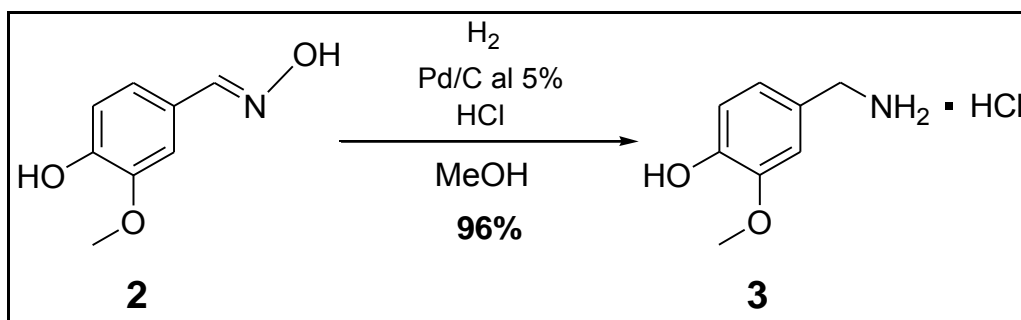


Esquema 6. Obtención de la oxima de vainillina por el método desarrollado.

Se cargaron 278 g (4 Moles) de clorhidrato de hidroxilamina en un matraz balón de 5 L y se adicionaron 350 mL de agua con agitación mecánica a 230 rpm, observándose endotermia (13° C). Se agitó por 15 minutos, se adicionaron 550 mL (4 Moles) de trietilamina en un tiempo de 13 minutos, manteniendo la reacción en baño de agua a una temperatura entre 25-35° C, se cargaron 500 g (3.3 Moles) de la vainillina manteniendo baño de hielo-agua (25-35 °C) y agitación a 230 rpm en un tiempo de 15 minutos. Se retiró del baño y se mantuvo con agitación a 32 °C durante una hora, se verificó el fin de reacción por TLC (DCM 100%, corrida 2 veces) observando completa transformación. Se adicionaron 2 L de agua y se mantuvo una hora a temperatura ambiente con agitación, posteriormente se le dieron 35 minutos más de agitación a una temperatura entre 5-8 °C. Se filtró al vacío sobre papel obteniendo 467 g de oxima de vainillina. Se obtuvo un rendimiento final de 85 %, se tomó punto de fusión al producto: 118-120 °C.

8.2. Obtención del clorhidrato de vainillilamina

Se obtuvo clorhidrato de vainillilamina (**3**) mediante la hidrogenación, catalizada por paladio en MeOH, de la oxima de vainillina (**2**) con rendimiento de 96 %. Los mejores rendimientos se obtuvieron con soluciones de oxima de vainillina en metanol del 1 y 2 % (esquema 7).

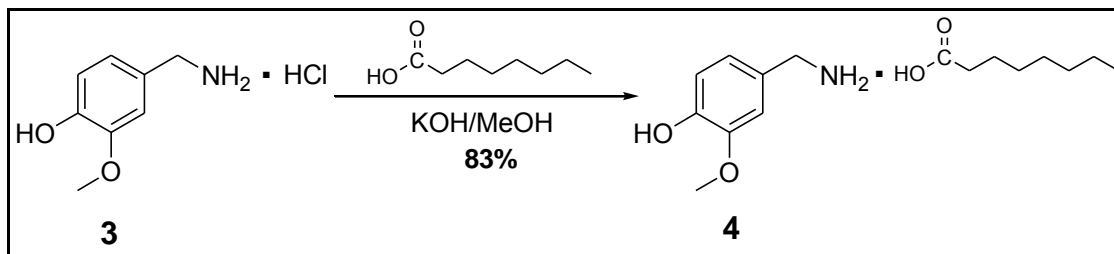


Esquema 7. Obtención del clorhidrato de vainillilamina.

Se cargaron 6 g (36 mmoles) de la oxima de vainillina en la botella de hidrogenación, se adicionaron 300 mL de metanol (para lograr una solución de oxima en metanol al 2%), se agregaron 6 mL (1 eq) de ácido clorhídrico concentrado por goteo (ligera exotermia no cuantificada) y se adicionaron 300 mg (5%) de paladio sobre carbono al 5 %. Se hidrogenó por 2 horas a 60 libras/pulg², se determinó el fin de reacción por TLC (AcOEt-MeOH-NH₄OH 85:15:50 μ L/mL, previa liberación del clorhidrato con NaHCO₃). Se recuperó el metanol/ácido por destilación al vacío (68 Kpa) en el rotavapor, se adicionó media parte de isopropanol (30 mL) y se recuperó en el rotavapor, se adicionó otra media parte de isopropanol (30 mL), se sonicó y se enfrió a 0 °C en baño hielo con agitación magnética por una hora, se filtró al vacío sobre papel y se lavó con 5 mL de isopropanol frío, se secó el producto a temperatura ambiente por 12 horas. Se obtuvieron 6.54 g de producto con punto de fusión 216-218 °C. Se obtuvo un rendimiento final de 96 %.

8.3. Obtención del caprilato de vainillilamina

Se obtuvo caprilato de vainillilamina (**4**) mediante la reacción ácido-base entre la vainillilamina liberada con potasa metanólica a partir de su clorhidrato (**3**) y el ácido caprílico, con un rendimiento del 83%. (esquema 8).



Esquema 8. Obtención del caprilato de vainillilamina.

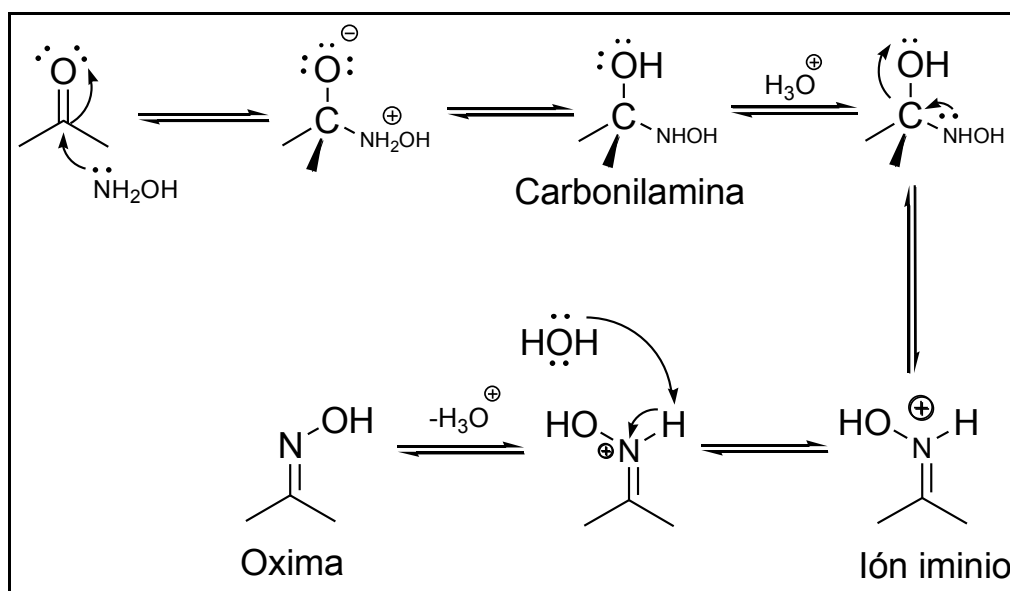
Se colocaron 100 g de clorhidrato de vainillilamina (527 mmoles) en un matraz bola de 5 L, se adicionaron 580 mL de potasa metanólica 1.1 M (1 eq) manteniéndose en suspensión con agitación mecánica, se midió pH= 11.1, posteriormente se adicionaron 105 mL de ácido caprílico (1.1 eq) y se midió pH= 7.09 (a este pH la reacción no entró en solución y precipita el KCl), la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C por 2 horas manteniendo la agitación. Se filtró al vacío sobre papel para retirar el cloruro de potasio (se obtuvieron 35 g de KCl, rendimiento estequiométrico $\text{KOH} \leftrightarrow \text{KCl}$ de 71 %), el filtrado se concentró por destilación a presión reducida (70 Kpa) para retirar el metanol, se enfrió a temperatura ambiente y se adicionó media parte de acetato de etilo (500 mL). La suspensión se enfrió por 1 h a 0° C con agitación mecánica, se filtró al vacío sobre papel el caprilato de vainillilamina y se lavó con 250 mL de agua a 3 °C para eliminar trazas de KCl, el producto se secó a temperatura ambiente por 12 h. Se obtuvieron 129 g de producto con punto de fusión 115-117 °C, rendimiento final de 83 %.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Referente a la síntesis de:

9.1. Oxima de vainillina

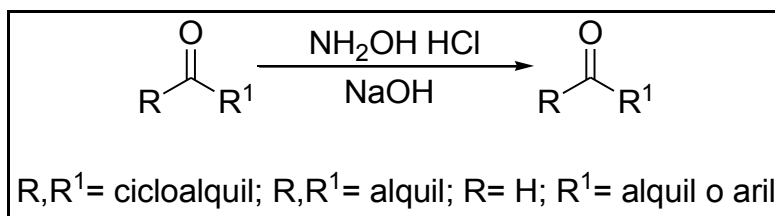
Convencionalmente las oximas se preparan a partir de compuestos carboxílicos con clorhidrato de hidroxilamina en reflujo de una solución alcohólica en presencia de una base.⁵⁷ El ataque nucleofílico a la cetona o aldehído por el par de electrones sin compartir del nitrógeno de la hidroxilamina origina un intermediario tetraédrico polar. Luego un protón del nitrógeno emigra al oxígeno, con lo que se produce el amino-alcohol (carbonilamina) que resulta neutro, el catalizador ácido protona al oxígeno hidroxílico. El par de electrones sin compartir del nitrógeno expulsa agua, con lo cual se produce un ión iminio. La pérdida de H^+ del nitrógeno da el producto neutro, generando la oxima⁵⁸ (esquema 9).



Esquema 9. Mecanismo general de formación de oximas con hidroxilamina.

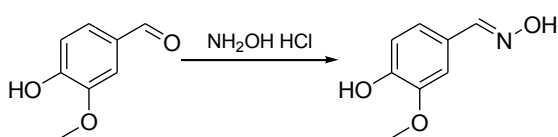
La formación de la oxima es lenta y ocurre con un pH alto o pH bajo, pero alcanza su velocidad máxima con un pH débilmente ácido alrededor de 4-5⁵⁸. Generalmente las oximas se preparan a partir de compuestos carboxílicos con clorhidrato de hidroxilamina en reflujo en una solución alcohólica en presencia de una base como acetato, hidróxido

del sodio o piridina. Esta técnica normalmente da rendimientos entre 50-60% con ambos isómeros en cantidades equivalentes. (esquema 10)^{59,60}



Esquema 10. Reacción para la formación de oximas con una base.

El método reportado de síntesis² se describe a continuación:



Una mezcla de vainillina (1.52 g, 10 mmoles) y piridina (10 mL) se agitó a temperatura ambiente por 24 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (200 mL), el etanol fue retirado a presión reducida y la fase acuosa se extrajo con éter etílico (5 x 100 mL). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con porciones de 100 mL cada una de solución acuosa de bicarbonato de sodio al 10 %, solución acuosa de bisulfito de sodio al 10 % y salmuera, se secó con sulfato de magnesio, se filtró, se concentró a presión reducida por una destilación en Kugelrohr (120 °C a 0.1 mmHg) para obtener la oxima de vainillina (1.63 g, 83 %) que es un sólido blanco cristalino, con punto de fusión 118-119 ° C.

Durante la optimización de este paso se probó la utilización de acetato de sodio para liberar el clorhidrato de hidroxilamina; sin embargo, ésta base requiere de grandes volúmenes de agua para disolverse, por lo que se sustituyó por trietilamina, ya que se trata de un compuesto líquido que disminuye considerablemente el volumen utilizado de agua para la disolución de acetato de sodio y posterior liberación de la hidroxilamina. Otra ventaja de esta modificación es la fácil recuperación de la trietilamina por medio de una reacción ácido-base, extracción y destilación. Por último, la menor toxicidad de la trietilamina frente a la piridina, la cual posee propiedades carcinógenas y requiere mayor seguridad en su manejo.

Se probó el uso de metanol-agua como disolvente en proporción 9:1, 8:2, 6:4, 2:8 y 0:10, logrando eliminar por completo el uso de metanol de la reacción, favoreciendo un proceso de tipo química verde y el fácil aislamiento de la oxima de vainillina.

Se redujo considerablemente el tiempo de reacción, a menos de 4 h, una mejora importante en comparación con el método reportado, que requiere un mínimo de 30 h para poder realizarse. Se mejoró levemente el rendimiento obtenido de este paso.

En el cuadro 1 se observan las principales diferencias entre el método reportado y el método desarrollado:

	Método Reportado	Método desarrollado
Base	Piridina*	Trietilamina
Disolventes orgánicos	Etanol y éter etílico	No requerido**
Aislamiento	Complicado	Sencillo
Tiempo de reacción	24 h	3h 30 min
Rendimiento	83 %	85 %

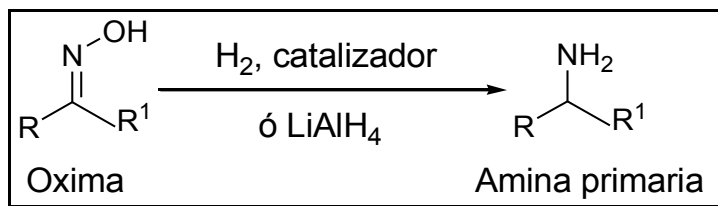
*La piridina es un compuesto carcinógeno, la trietilamina no.

**Sólo requiere agua como disolvente.

Cuadro 1. Principales diferencias entre los dos métodos para la obtención de oxima de vainillina.

9.2. Clorhidrato de vainillilamina

La oximas son intermediarios de gran interés en síntesis orgánica, una de las reacciones es la reducción de una oxima a amina primaria, la cual suele ser una reacción muy útil que puede llevarse a cabo mediante diferentes condiciones reductoras, como la reducción catalítica mediante hidrógeno y paladio o níquel Raney, o la reducción química empleando zinc y ácido acético o hidruro de litio y aluminio (LiAlH_4) (esquema 11).⁶¹



Esquema 11. Reducción de oximas a aminas primarias.

Se probaron diferentes condiciones de reacción para este paso. La principal variable que determina el resultado del proceso es la concentración de la oxima de vainillina en la solución metanólica que se somete a la hidrogenación catalítica. Esto se determinó por medio de diversos experimentos, donde las condiciones de reacción se mantuvieron constantes, excepto la antes mencionadas; determinando que al 1% es la concentración óptima de oxima de vainillina para evitar la formación de la amina secundaria **5** (figura 5) como producto lateral de la hidrogenación.

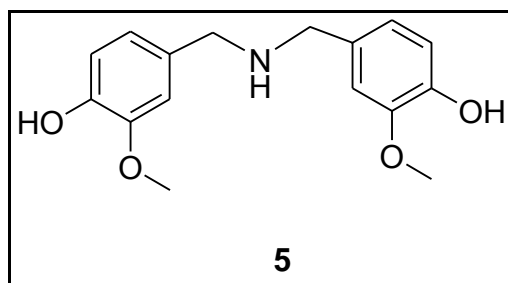
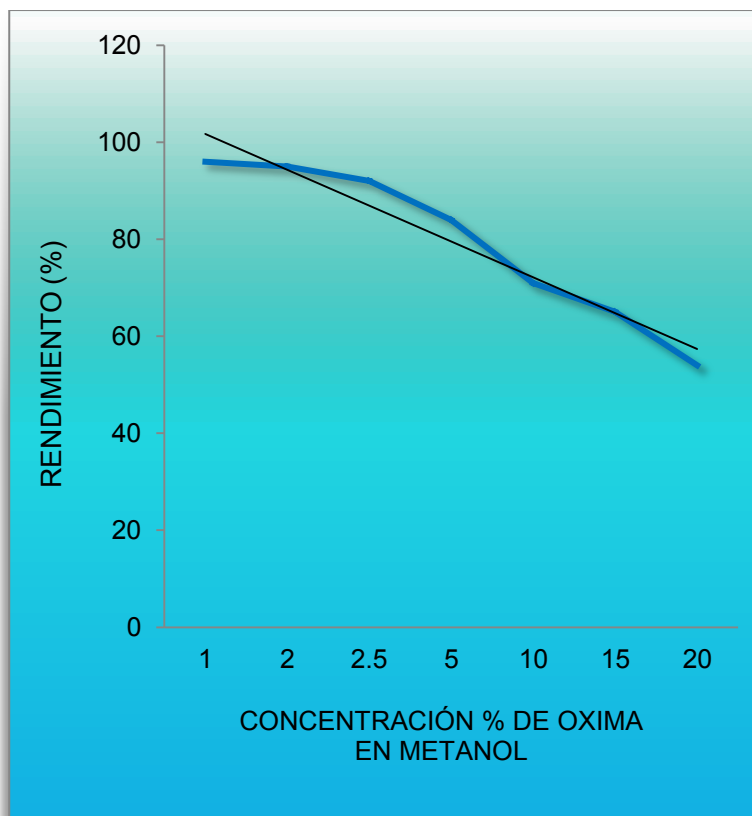


Figura 5. Amina secundaria formada como producto lateral en la hidrogenación de la oxima de vainillina.

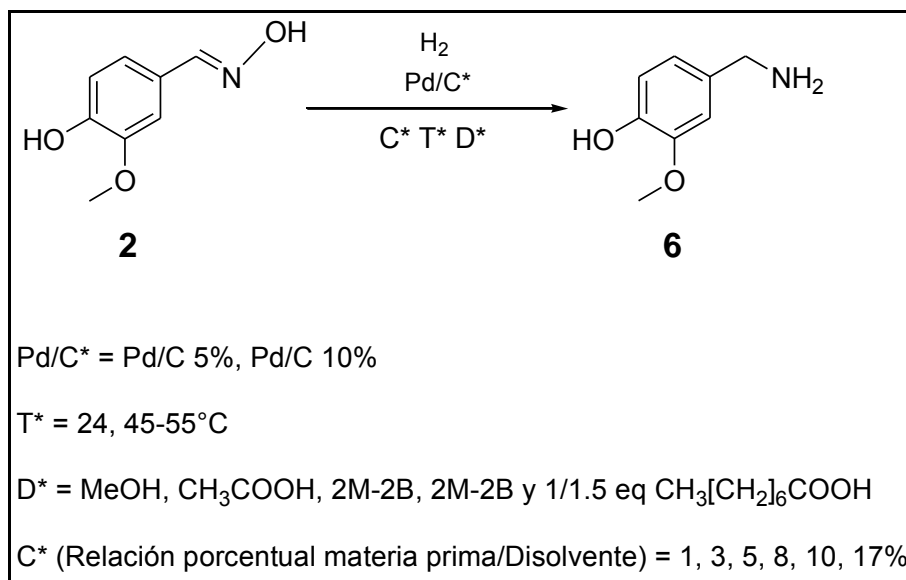
Al 2 % de concentración de oxima de vainillina, **5** se forma en una cantidad menor del 1 % según lo observado en TLC, por lo que ésta es la concentración máxima recomendable para obtener rendimientos superiores al 95 %. Se probaron concentraciones mayores de oxima en metanol: 2.5, 5, 10, 15 y 20 % y se determinó que el rendimiento decaía considerablemente con el aumento de dicho valor (gráfica 1), en TLC también se observó que **5** se encontraba en mayor proporción conforme aumentaba la concentración de oxima.



Gráfica 1. Relación inversamente proporcional entre la concentración de oxima en metanol y el rendimiento, para la reacción de obtención de clorhidrato de vainillilamina.

La mayor desventaja de este procedimiento fue el tamaño de los reactores para llevar a cabo éste paso y el costo inherente a la recuperación del metanol, ya que resulta excesivo el uso de éste disolvente, para obtener 1 g del clorhidrato de vainillilamina, se requieren 50 mL de metanol; lo cual es un inconveniente importante y hace que esta reacción no sea económicamente viable.

Como alternativa, se propuso formar a la vainillilamina como base libre (**6**) con la intención de evitar la formación de **5** y poder aumentar la concentración de la solución de oxima en metanol. Se probaron diferentes condiciones de reacción mediante la hidrogenación del compuesto **2** con catálisis de paladio. No se obtuvo el éxito deseado en los múltiples intentos realizados para evitar la formación de productos laterales, en particular la amina secundaria **5** (esquema 12).

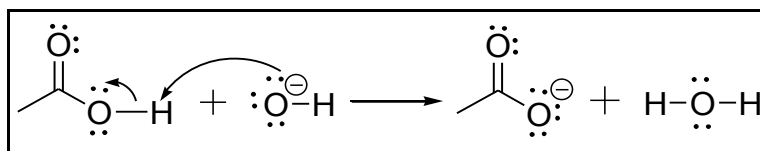


Esquema 12. Diferentes condiciones de reacción probadas para la obtención de vainillilamina base libre (**6**) por hidrogenación catalítica.

Durante el desarrollo de este paso se descubrió la formación de la sal orgánica **4** que hasta el momento era desconocida y concluyendo que **6** no puede obtenerse sin la presencia de la amina secundaria (**5**).

9.3. Caprilato de vainillilamina

Aunque menos habituales que en química inorgánica, muchas reacciones orgánicas entran en la categoría de reacciones ácido-base. Los ácidos carboxílicos, alcoholes y acetilenos terminales son algunos ejemplos de sustancias que pueden comportarse como ácidos, disminuyendo en el orden mencionado la fuerza ácida, pudiendo reaccionar con bases orgánicas o inorgánicas. En este tipo de reacciones se da una fijación reversible del protón que proviene de un ácido sobre el par de electrones de la base (esquema 13).⁶²



Esquema 13. Reacción ácido-base en química orgánica.

Los ácidos son, en la mayor parte de los casos, especies químicas capaces de generar uno o varios protones. Sus protones están habitualmente unidos a átomos de oxígeno o de azufre. Entre los ácidos orgánicos, los más importantes son los ácidos carboxílicos.⁶³

Es importante tener en cuenta que la desprotonación de los ácidos carboxílicos es más fácil que su protonación. Los ácidos carboxílicos son más débiles que los ácidos minerales. La acidez de los ácidos carboxílicos se refuerza por la presencia de átomos o grupos de átomos que generan efecto inductivo atractor en la proximidad del grupo funcional.⁶³

Las bases son, en la mayor parte de los casos, especies químicas que poseen uno o varios pares de electrones libres y que pueden fijar uno o varios protones. Entre las bases orgánicas las más importantes son las aminas.⁶³

La protonación de las aminas es más fácil que su desprotonación. Las aminas alifáticas son más básicas que el amoníaco, su basicidad evoluciona según su sustitución pero de manera no regular. Las aminas primarias son menos básicas que las secundarias, que son más básicas que las aminas terciarias por el aumento del impedimento estérico aparte de la solvatación de los iones amonio. La basicidad de las aminas depende de la disponibilidad del par de electrones libre del átomo de nitrógeno para fijar un protón.⁶³

La obtención de caprilato de vainillilamina impulsó la idea en el Instituto de Biotecnología UNAM, de explorar la posibilidad de utilizarla como materia prima para la formación de capsaicinoides por reacción enzimática con CaLB, la cual funciona utilizando 2-metil-2-butanol con resultados muy favorables. Debido a esto, se realizaron pruebas de solubilidad de **4** en dicho disolvente (cuadro 2).

RELACIÓN PORCENTUAL *	SOLUBILIDAD**
1%	Insoluble
2%	Insoluble
3%	Insoluble
4%	Insoluble
5%	Insoluble
6%	Insoluble
8%	Insoluble
10%	Insoluble
12%	Insoluble
14%	Insoluble
16%	Insoluble
18%	Insoluble
20%	Insoluble
22%	Insoluble

* Caprilato de vainillilamina en 2-metil-2-butanol

**Solubilidad determina a temperatura ambiente, 25 ° C

Cuadro 2. Pruebas de solubilidad de **4** en 2-metil-2-butanol a 25 ° C

Se determinó que **4** es insoluble a temperatura ambiente en 2M-2B, se realizó la misma prueba a 45 ° C (cuadro 3), temperatura a la cual la enzima CaLB se activa en el proceso de síntesis.

RELACIÓN PORCENTUAL *	SOLUBILIDAD**
1%	Soluble
2%	Soluble
3%	Soluble
4%	Soluble
5%	Soluble
6%	Soluble
8%	Soluble
10%	Soluble
12%	Soluble
14%	Soluble
16%	Soluble
18%	Soluble
20%	Insoluble
22%	Insoluble

*Solubilidad determina a temperatura de 45 ° C

**Caprilato de vainillilamina en 2-metil-2-butanol

Cuadro 3. Pruebas de solubilidad de **4** en 2-metil-2-butanol a 45 ° C

De acuerdo al cuadro 2 y 3 se determinó que el caprilato de vainillilamina es insoluble a temperatura ambiente y se disuelve a 45 °C en una concentración máxima del 18 % de caprilato de vainillilamina en 2-metil-2-butanol.

Con los resultados anteriores, se determinó que el gasto de 2M-2B no sería económicamente viable, ya que un litro del disolvente cuesta \$1869.0 MXP en Laboratorios SIGMA-ALDRICH (precio consultado el 20-enero-2015) y de acuerdo a las pruebas de solubilidad, la máxima concentración para llevar a cabo la reacción sería del 18 % (0.6 Molar), lo cual motivó a probar otros disolventes buscando una mejor opción.

Se realizaron pruebas de solubilidad de **4** en diversos disolventes, de los cuales se rescataron los valores del cuadro 4, ya que éstos son los utilizados en el proceso desarrollado que tuvo mejores resultados.

DISOLVENTE	SOLUBILIDAD*
Acetato de etilo	Insoluble
Agua	1 g en 240 mL (prácticamente insoluble)
Metanol	1 g en 1 mL (muy soluble)

* Solubilidad determinada a temperatura ambiente (25 ° C).

Cuadro 4. Pruebas de solubilidad de 4 en diversos disolventes a 25 °C

Con los datos de solubilidad obtenidos, se desarrolló el nuevo método de reacción, el cual al ser monitoreado por TLC demostró menos del 1% del compuesto 5.

La cristalización de 5 se realizó adicionando media parte de acetato de etilo, teniendo excelentes resultados.

Este paso de síntesis puede ser monitoreado potenciométricamente, notándose que las reacciones se dan de forma casi instantánea.

El cloruro de potasio se puede separar por medio de una centrifugación o por filtración al vacío sobre papel.

El mejor rendimiento obtenido fue de 83%, el cual no fue tan alto como el esperado.

Este método de síntesis fue enviado al Instituto de Biotecnología UNAM, para su escalamiento en planta piloto, para posteriormente entrar a la reacción enzimática y pasar este desarrollo tecnológico a la empresa alimentaria interesada en él.

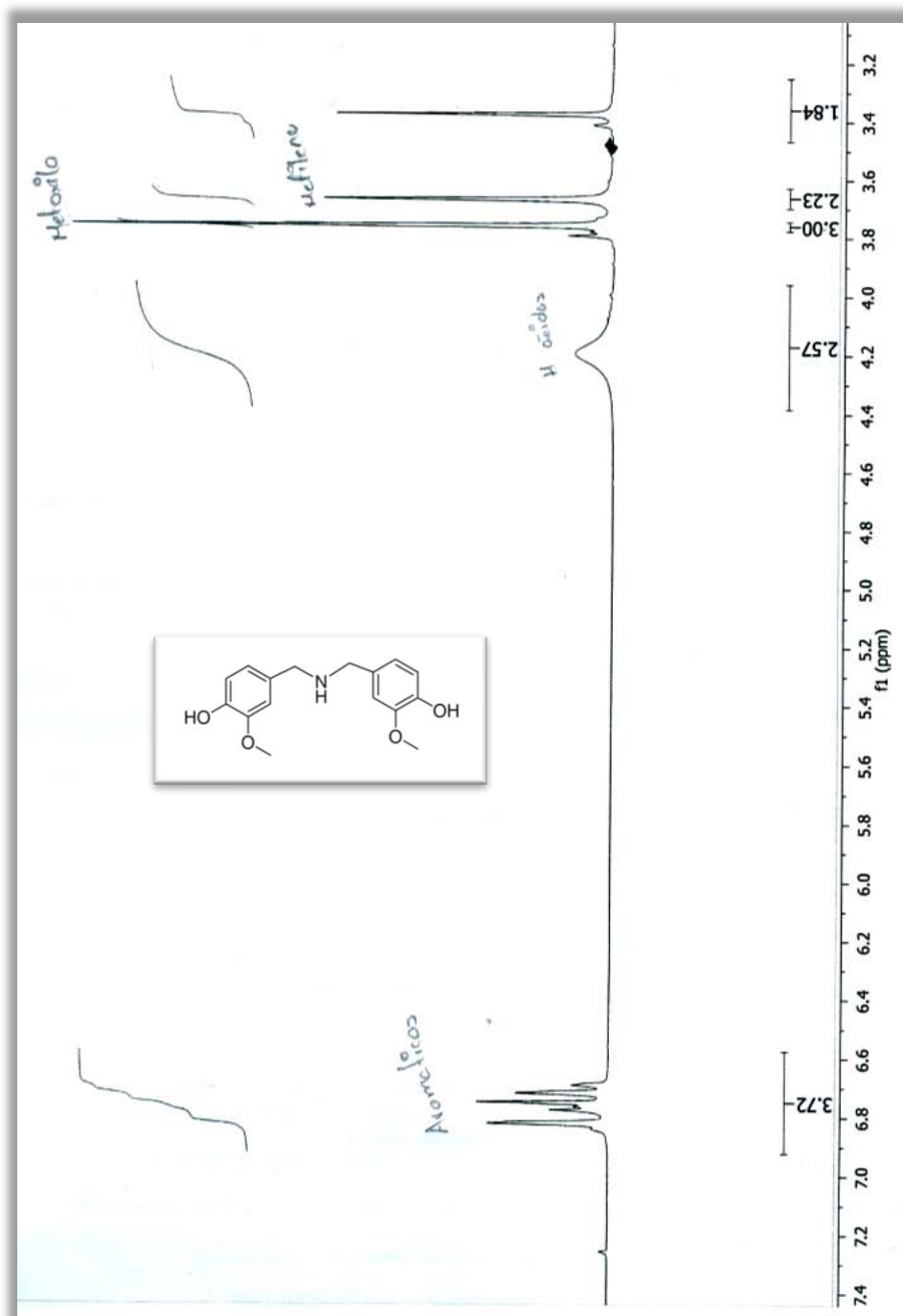
10. CONCLUSIONES

Se desarrollaron condiciones eficientes de reacción para la obtención de la oxima de vainillina, desarrollando un método de síntesis catalogado como química verde y utilizando insumos económicos y reciclables.

Si bien se desarrollaron condiciones eficientes para el segundo paso en la obtención de vainillilamina, éstas permanecieron con el mismo parámetro de seguridad y costo que las ya reportadas, pudiendo sólo mejorar el rendimiento de la reacción y disminuyendo el uso de reactivos (lo cual contribuyó a hacer de esta reacción un proceso ambientalmente amigable).

El escalamiento a 100 g no se realizó a todo el proceso, pero pudo lograrse en dos de las tres fases (obtención de oxima de vainillina y obtención de caprilato de vainillilamina), las cuales tuvieron alto rendimiento del producto, buenas condiciones de seguridad y bajo daño ambiental de acuerdo a los preceptos de la química verde. El escalamiento de la hidrogenación catalítica hubiese requerido de equipo y condiciones de seguridad con las que no contamos en el campus universitario.

11. ANEXO



Anexo 1. Espectro de RMN ^1H de la amina secundaria (5).

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Meyer O, Heddeshimer I. Process for preparing vanillylamine hydrochloride. Patent US6958418 B2.
2. Gannett P, Nagel D, Reilly P, Lawson T, Sharpe J, Toth B. The Capsaicinoids: Their Separation, Synthesis, and Metabolism. *Journal of Organic Chemistry*. 1988; 53:1064-71.
3. Yarto M, Gavilán A, Martínez M. La química verde en México. *Gaceta ecológica*. 2004; 72:1405-2849.
4. Clark J. Catalysis for green chemistry. *Pure and Applied Chemistry*. 2001; 73(1):103-11.
5. Anastas P, Warner J. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press: New York. 1998. p.30.
6. La producción de chile en el mundo. [En Internet]; 2007 [citado 08 Febrero 2014]. Disponible en:http://www.inforural.com.mx/producto.php?&id_rubrique=17&id_article=7382.
7. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production, Commodities by Country. [En Intenert]; 2011 [citado 08 Febrero 2014]. Disponible en: http://www.inforural.com.mx/producto.php?&id_rubrique=17&id_article=7382.
8. Morán-Bañuelos H, Aguilar-Rincón H, Corona-Torres T, Castillo-González F, Soto-Hernández M, San Miguel-Chávez R. Capsaicinoides en Chiles Nativos de Puebla, México. *Agrociencia*. 2008; 42(7):807-16.
9. Xiu-Ju L, Jun P, Yuan-Jian L. Recent Advances in tne Study on Capsaicinoids and Capsinoids. *European Journal of Pharmacology*. 2011; 650:1-7.
10. Yazawa S, et al. Content of capsiaicinoids and capsaicinoid-like substances in fruit of pepper (*Capsicum annum* L.) hybrids made with CH-19 Sweet as a parent. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 1989; 58:601-07.
11. Ajinomoto Co., Inc. Facts, Capsinoids Overview. [En Intenert]; 2007 [citado 08 Febrero 2014]. Disponible en: <http://www.aboutcapsinoids.com/pages/facts-capsinoids-overview.htm>.
12. Nelson E, Dawson L. The constitution of capsaicin, the pungent principle of *Capsicum*. *Journal of the American Chemical Society*. 1923; 45(9):2179–81.
13. Reyes-Escogido M, González-Mondragón E, Vazquez-Tzompantzi E. Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin. *Molecules*. 2011; 16:1253-70.
14. Walker K, Urban L, Medhurst S, Patel S, Panesar M, Fox A, et al. The VR1 Antagonist Capsazepine Reverses Mechanical Hyperalgesia in Models of Inflammatory and

Neuropathic Pain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2003; 304:56-62.

15. Gorman J. A Perk of Our Evolution: Pleasure in Pain of Chillies. *New York Times*. 2010; Publicado: septiembre 20, 2010.

16. Reyes M. Caracterización y aplicación de lipasas en la síntesis e hidrólisis de amidas [tesis]. Cuernavaca: Instituto de biotecnología. 2002.

17. Reregistration Eligibility Decision. Facts for Capsaicin. United States Environmental Protection Agency. Retrieved 2012-11-13.

18. Zhang L, Wan P. The effectiveness of topically applied capsaicin. A meta-analysis. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 1994; 46:517-22.

19. Hempenstall K, Nurmikko T, Johnson R, A'Hern R, Rice A. Analgesic Therapy in Postherpetic Neuralgia: A Quantitative Systematic Review. *PLOS Medicine*. 2005; 2(7):e164.

20. Fraser C, Chapple C. The Phenylpropanoid Pathway in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*. 2011; 9:1-19.

21. Vázquez-Flota F, Miranda-Ham M, Monforte-González M, Gutiérrez-Carbajal G, Velázquez-García C, Nieto-Pelayo Y. La Biosíntesis de Capsaicinoides, el Principio Picante del Chile. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 2007; 30(4):353-60.

22. Thomas J, Williams R. Catalysis: principles, progress, prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*. 2005; 363:765-91.

23. McIlvain S, Chen W, Ramiya P, Burch R, Carter R, Anderson T. Preparation and purification of synthetic capsaicin. PatentWO2004/092122 A2.

24. Appendino G, Cravotto G, Palmisano G. Synthesis and Evaluation of Phorboid 20-Homovanillates: Discovery of a Class of Ligands Binding to the Vanilloid (Capsaicin) Receptor with Different Degrees of Cooperativity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1996; 39:3123-31.

25. Lee J, Lee J, Szabo T, Gonzalez A, Welter J, Blumberg M. N-(3-Acyloxy-2-Benzylpropyl)-N'-Dihydroxytetrahydrobenzazepine and Tetrahydroisoquinoline Thiourea Analogues as Vanilloid Receptor Ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2001; 9:1713-20.

26. Wang Y, Szabo T, Welter J, Toth A, Tran R, Lee J, et al. High Affinity Antagonists of the Vanilloid Receptor. *Molecular Pharmacology*. 2002; 62:947-56.

27. Appendino G, Harrison S, De Petrocellis L, Daddario N, Bianchi F, Schiano A, et al. Halogenation of a capsaicin analogue leads to novel vanilloid TRPV1 receptor antagonists. *British Journal of Pharmacology*. 2003; 139:1417-1424.

28. Appendino G, Minassi A, Morello A. N-Acylvanillamides: Development of an expeditious synthesis and discovery of new acyl templates for powerful activation of the vanilloid receptor. *Journal of medicinal chemistry*. 2002; 45(17):3739-45.

29. Reyes-Duarte D, Castillo E, Martínez R, López-Munguía A. Lipase-catalysed synthesis of olvanil in organic solvents. *Biotechnology Letters*. 2002; 24:2057-61.
30. Appendino G, De Petrocellis L, Trevisani M, Minassi A, Daddario N, Schiano A, et al. Development of the First Ultra-Potent "Capsaicinoid" Agonist at Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 (TRPV1) Channels and Its Therapeutic Potential. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005; 312:561-70.
31. Ohnuki K, Haramizu S, Oki K, Watanabe T, Yazawa S, Fushiki T. Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2001; 65:2735-40.
32. Kim K, Kawada T, Ishihara K, Inoue K, Fushiki T. Swimming capacity of mice is increased by oral administration of a nonpungent capsaicin analog, stearylvanillylamide. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 1997; 61:1718-23.
33. Luna H. Aplicación de la biocatálisis a la preparación de intermediarios para la síntesis de fármacos. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 2004; 48:211-19.
34. Juhl P, Doderer K, Hollman F, Thum O, Pleiss J. Engineering of *Candida antarctica* lipase B for hydrolysis of bulky carboxylic acid esters. *Journal of Biotechnology*. 2010; 150:474-80.
35. Kramer M, Cruz J, Pfromm P, Rezac M, Czermak P. Enantioselective transesterification by *Candida antarctica* Lipase B immobilized on fumed silica. *Journal of Biotechnology*. 2010; 150:80-6.
36. Pleiss J, Scheib H, Schmid R. The His gap motif in microbial lipases: A determinant of stereoselectivity toward triacylglycerols and analogs. *Biochemie*. 2000; 82:1043-52.
37. Trodler P, Pleiss J. Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Structural Biology*. 2008; 8(9):1-10.
38. Kobata K, Kobayashi M, Tamura Y, Miyoshi S, Ogawa S, Watanabe T. Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs by transacylation of capsaicin with natural oils or fatty acid derivatives in n-hexane. *Biotechnology Letters*. 1999; 21(6):547-50.
39. Kobata K, Kawamura M, Toyoshima M, Tamura Y, Ogawa S, Watanabe T. Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs by amidation of vanillylamine with fatty acid derivatives. *Biotechnology Letters*. 1998; 20(5):451-53.
40. Kobata K, Kobayashi M, Kinpara S, Watanabe T. Supercritical CO₂ as a reaction medium for synthesis of capsaicin analogues by lipase-catalyzed transacylation of capsaicin. *Biotechnology Letters*. 2003; 25(18):1575-78.
41. Reyes-Duarte D, Castillo E, Martínez R, López-Munguía A. Lipase-catalysed synthesis of olvanil in organic solvents. *Biotechnology Letters*. 2002; 24:2057-61.
42. Castillo E, López-González I, De Regil-Hernández R, Reyes-Duarte D, Sánchez-Herrera D, López-Munguía A, et al. Enzymatic synthesis of capsaicin analogs and their effect. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007; 356:424-30.

43. Castillo E, Regla I, Demare P, Luviano-Jardón A, López-Munguía A. Efficient Chemoenzymatic Synthesis of Phenylacetylvanillin: An Ultrapotent Capsaicinoid. *Synlett*. 2008; 18:2869-73.
44. López-Ortiz M, Herrera-Solís A, Luviano-Jardón A, Reyes-Prieto N, Castillo I, Monsalvo I, et al. Chemoenzymatic synthesis and cannabinoid activity of a new diazabicyclic amide of phenylacetylricinoleic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2010; 20:3231-4.
45. Luo X, Peng J, Li Y. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European Journal of Pharmacology*. 2011; 650:1-7.
46. Anand P, Bley K. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *British Journal of Anaesthesia*. 2011; 107(4):490-502.
47. Instituto Nacional del Cáncer. ¿Qué es el cáncer? [En Internet]; 2012 [citado 08 Febrero 2014]. Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>.
48. American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition. [En Internet]; 2011 [citado 08 febrero 2014]. Disponible en: <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-027766.pdf>.
49. Oh S, Kim H, Lim S, Hou C, Chang I, You H. Dihydrocapsaicin (DHC), a saturated structural analog of capsaicin, induces autophagy in human cancer cells in a catalase-regulated manner. *Autophagy*. 2008; 4(8):1009-19.
50. Thoennissen N, O'Kelly J, Lu D, Iwanski G, La T, et al. Capsaicin causes cell-cycle arrest and apoptosis in ER-positive and -negative breast cancer cells by modulating the EGFR/HER-2 pathway. *Oncogene* Epub ahead of print. 2009.
51. Ip S, Lan S, Huang A, Yang J, Chen Y, Huang H, et al. Capsaicin induces apoptosis in SCC-4 human tongue cancer cells through mitochondria-dependent and -independent pathways. *Environ Toxicology*. 2010; 27(6):332-41.
52. Lopez C, Hernandez L, Dubrow R. Chili Pepper Consumption and Gastric Cancer in Mexico: A Case-Control Study. *American Journal Epidemiology*. 1994; 139:263-71.
53. Le T, Chun D, Ra S. Capsaicin-induced apoptosis of FaDu human pharyngeal squamous carcinoma cells. *Yonsei Medicine Journal*. 2012; 53(4):834-41.
54. Oyagbemi A, Saba A, Azeez O. Capsaicin: A novel chemopreventive molecule and its underlying molecular mechanisms of action. *Indian Journal of Cancer*. 2010; 47(1):53-8.
55. Si W, Liang Y, Ma K, Chung H, Chen Z. Antioxidant activity of capsaicinoid in canola oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012; 60(24):6230-4.
56. Whiting S, Derbyshire E, Tiwari B. Capsaicinoids and capsinoids. A potential role for weight management? A systematic review of the evidence. *Appetite*. 2012; 59(2):341-8.

57. Sharghi H, Sarvari M. One-step Beckmann rearrangement from carbonyl compounds and hydroxylamine hydrochloride in Al₂O₃/CH₃SO₃H (AMA) as a new reagent. *Journal of chemical R-S*. 2001; 10:446-9.
58. McMurry J. *Química orgánica*. Ed. International Thomson. México. 2001; 5:770-2.
59. Greene T, Wuts P. *Protective Groups in Organic Synthesis*. Ed. John Wiley & Sons Inc. New York. 1991; 2:214.
60. Sandler S, Karo W. *Organic Functional Group Preparation*. *Journal of chemical education*. 1983; 3:11.
61. Martín E, Allinger N, Llinger N. *Manual de prácticas Cava Química Orgánica*. Ed. Reverte. 1984; 1:813.
62. Wade L. *Química Orgánica*. Ed. Prentice Hall Hispanoamericana. México. 1993; 2: 50-5.
63. Carey F. *Química Orgánica*. Ed. McGraw-Hill. México. 1999; 3:68-74.