



**“ESTUDIO DE LA RESOLUCIÓN ENANTIO- Y QUIMIOSELECTIVA DE MEZCLAS
RACÉMICAS DE MOLÉCULAS BIFUNCIONALES”**

TESIS que para obtener el grado de Doctor en Ciencias presenta:

M. en C. Alejandro Torres Gavilán

Tutor: Edmundo Castillo Rosales

Cuernavaca, Morelos, 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Con mucho cariño a
Tomás, María Rosa, Adriana y Mariana

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

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

Agradezco:

Al Dr. Edmundo Castillo Rosales por la formación científica que me ha otorgado, su orientación y sobre todo, por su amistad.

Al Dr. Agustín López-Munguía por darme la oportunidad de participar en su grupo de trabajo así como por su apoyo en la realización de este proyecto.

Al comité tutorial y sinodal por sus sugerencias, comentarios y aportaciones a esta tesis:

Dr. Agustín López-Munguía Canales

Dr. Arturo Navarro Ocaña

Dra. Brenda Valderrama Blanco

Dra. Dolores Reyes Duarte

Dr. Edmundo Castillo Rosales

Dr. Enrique Rudiño Piñera

Dr. Jaime Escalante García

Dra. Ma. Yolanda Ríos Gómez

Al Dr. Ignacio Regla Contreras por todas las aportaciones a este proyecto, sus ideas, comentarios, sugerencias y apoyo técnico.

A la Dr. Patricia Severiano Pérez por el apoyo en las evaluaciones organolépticas.

Al T.L Fernando Gonzalez Muños por todo el apoyo técnico brindado durante la realización de este proyecto.

Todos ustedes han contribuido mucho en la realización de este proyecto. Gran parte de la culminación de esta etapa de mi vida es gracias a ustedes. Gracias por hacer que, a su lado, este trayecto fuera muy agradable; pero sobre todo, gracias, gracias, gracias, muchas gracias, por la oportunidad que me dieron, y espero sigan otorgándome, de compartirme con ustedes. Soy muy afortunado.

Mariana, Tomás, María Rosa, Adriana, Luis, Pedro, Gina, Lili, Roberto, todo el amor y cariño para ustedes.

Agustín, Edmundo, Fer, Arlette, Mari, Judith, Aure, muchas gracias por hacer del lugar de trabajo un laboratorio hogarizado y muy amigable.

Andrés, Ricardo, Cuauhtemoc, Luis, Julia, Catalina, Aubin, Bernardo, Adolfo, Adriana, Jalil, Enrique, más allá de la amistad, una hermandad.

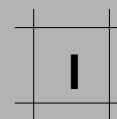
ÍNDICE	I
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	5
A1. Características Generales de las Lipasas.....	5
A2. Reconocimiento Enantioselectivo de las Lipasas.....	8
A3. Cuantificación de la Enantioselectividad.....	13
A4. Resolución de Aminas y Alcoholes Quirales por medio de Lipasas.....	16
A5. Descripción del Eq. Termodinámico y su Influencia en la Selectividad Enzimática.....	18
A6. Resumen de los Antecedentes.....	21
HIPÓTESIS	23
H1. Hipótesis 1.....	23
H2. Hipótesis 2.....	23
OBJETIVOS	24
O1. Objetivo 1.....	24
O2. Objetivo 2.....	24
O3. Objetivo 3.....	24
O4. Objetivo 4.....	25
CAPÍTULO 1. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE AMIDAS	26
1A. Resumen.....	26
1B. Introducción.....	28
1C. Materiales y Métodos.....	30
1C.1. Materiales.....	30
1C.2. Reacciones enzimáticas.....	30
1C.3. Análisis por HPLC.....	30
1C.4. Purificación.....	31
1C.5. Análisis sensorial.....	31
1C.6. Prueba de magnitudes y proporciones.....	31
1D. Resultados y Discusión.....	31
1D.1. Importancia del residuo acilo en la síntesis de capsaicinoides.....	32
1D.2. Importancia de los sustituyentes en el anillo de la amina.....	32
1D.3. Análisis sensorial de pungencia relativa.....	34
1E. Conclusiones.....	34

CAPÍTULO 2. HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA DE AMIDAS	36
2A. Resumen.....	36
2B. Introducción.....	38
2C. Materiales y Métodos.....	41
2C.1. Materiales.....	41
2C.2. Síntesis enzimática y purificación de amidas.....	41
2C.3. Hidrólisis de amidas.....	42
2C.4. Análisis por HPLC.....	42
2D. Resultados Y Discusión.....	43
2D.1. Influencia de la longitud del residuo acilo en la hidrólisis de vainillilamidias.....	43
2D.2. Influencia del estado físico de las amidas.....	43
2D.3. Influencia de las sustituciones del anillo aromático.....	44
2E. Conclusiones.....	46
CAPÍTULO 3. RESOLUCIÓN EFECTIVA DE AMINAS	47
3A. Resumen.....	47
3B. Introducción.....	49
3C. Materiales y Métodos.....	51
3C.1. Materiales.....	51
3C.2. Análisis por HPLC.....	51
3C.3. Análisis por HPLC quiral.....	52
3C.4. Síntesis química de la N-[(S)-(-)-1-feniletil]decanamida.....	52
3C.5. Reacciones enzimáticas.....	52
3C.5.1. Síntesis de la N-[(R)-(+)-1-feniletil]decanamida.....	52
3C.5.2. Hidrólisis de la N-[(R)-(+)-1-feniletil]decanamida.....	52
3C.6. Determinación de las estructuras.....	52
3D. Resultados Y DISCUSIÓN.....	53
3E. Conclusiones.....	55
CAPÍTULO 4. CONTROL TERMODINÁMICO Y QUIMIOSELECTIVIDAD	57
4A. Resumen.....	57
4B. Introducción.....	60
4C. Materiales y métodos.....	62
4C.1. Materiales.....	62
4C.2. Reacciones enzimáticas.....	62
4C.3. Análisis por HPLC.....	62
4C.4. Teoría COSMO-RS.....	63
4C.5. Cálculos COSMO-RS.....	64
4D. Resultados Y Discusión.....	65
4D.1. Síntesis de amidas y ésteres en hexano y 2M2B.....	65
4D.2. Síntesis quimioselectiva de amidas.....	68
4D.3. Síntesis quimioselectiva de ésteres.....	71
4D.4. Caracterización de los coeficientes de actividad termodinámica por COSMO-RS75	
4D.5. Resolución enzimática quimio- y enantioselectiva de moléculas bifuncionales... 81	
4E. Conclusiones.....	89

CONCLUSIONES	91
BIBLIOGRAFÍA	99
ANEXO 1	A
ANEXO 2	B
ANEXO 3	C
ANEXO 4	D

RESUMEN

Este proyecto parte de dos principios fundamentales en el que intervienen tanto la especificidad catalítica de la enzima definida por la estructura del sitio activo así como la termodinámica de las reacciones químicas para desarrollar herramientas biocatalíticas enfocadas a la resolución efectiva quimio- y enantioselectiva en la síntesis de ésteres y amidas, para lo cual se emplea a la lipasa B de *Candida antarctica* como modelo enzimático. En la primera sección se seleccionó un medio de reacción propicio para la síntesis de capsaicinoides que permite una elevada acumulación de amidas al equilibrio. La segunda sección de este proyecto muestra que la capacidad de las lipasas para hidrolizar amidas se encuentra en función de las características estructurales de los sustratos. Así, en el tercer capítulo se describe la utilidad enantioselectiva de las lipasas en un proceso de resolución efectiva de una mezcla racémica mediante la síntesis e hidrólisis de amidas. Finalmente, en la última sección se presenta una forma que permite integrar los principios antes descritos al establecer un proceso quimio- y enantioselectivo para la resolución de moléculas bifuncionales (amino-alcoholes) en el que se demuestra que al equilibrio, la acumulación preferencial de amidas o ésteres se encuentra en función de las diferencias entre los coeficientes de actividad de los productos, mismos que se manipulan mediante la apropiada elección del medio de reacción.



INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica es un sector económico de crecimiento exponencial y de ingresos multimillonarios. Si bien una parte importante del esfuerzo dedicado al desarrollo de compuestos farmacológicos está enfocado a generar moléculas con actividad específica, otra gran parte de ellos se involucran en el perfeccionamiento y desarrollo de rutas de síntesis para la obtención de los mismos. En particular, un área importante de estudio son las transformaciones selectivas en las que se evite la generación de subproductos o impurezas ¹, en otras palabras, procesos regio-, quimio- y estereoselectivos.

En su mayoría, los fármacos son compuestos ópticamente activos; de hecho, mientras que un estereoisómero muestra propiedades benéficas para el organismo, su imagen especular puede caracterizarse por ser tóxico, nocivo o inactivo. Por esta razón, muchos de los procesos en desarrollo para la obtención de fármacos quirales se orientan continuamente al empleo de herramientas altamente selectivas ².

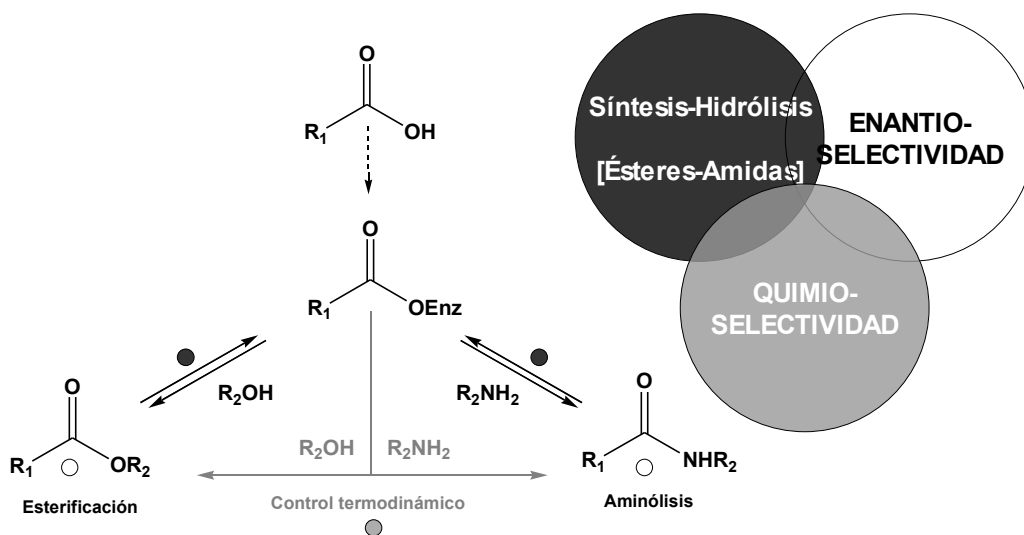
En los últimos años, la incorporación de procesos biotecnológicos estereoselectivos ha incrementado de manera considerable gracias a las propiedades selectivas de los biocatalizadores. En este sentido, si bien comprender el origen de la estereoselectividad enzimática es fundamental para interpretar el mecanismo de acción de los fármacos, también lo es para el diseño de estrategias y rutas de transformación en la producción de compuestos enantiopuros ³. Continuamente se describe que la capacidad de reconocimiento enantioselectivo enzimático obedece a interacciones específicas entre motivos estructurales del sitio activo de la enzima y del sustrato. En consecuencia, esta selectividad es considerada una propiedad intrínseca de la estructura del sitio activo de la enzima; y por ello, la mayor parte de los esfuerzos orientados a manipular y modificar la enantioselectividad de las enzimas se dirigen a alterar la geometría del sitio activo, o bien, a cambiar la estructura molecular de sustrato para optimizar las interacciones entre ambas geometrías ^{4,5}.

Por otro lado, dentro de la extensa diversidad de grupos funcionales presentes en moléculas de interés farmacéutico, la presencia de aminas y alcoholes abarca hasta un 50% del mercado global de compuestos activos ⁶. En el área de síntesis orgánica, una de las reacciones más importantes y extensamente utilizada para la derivatización de estos grupos funcionales es la acilación. Diversas aplicaciones de esta reacción destacan su trascendencia; sin embargo, cuando las moléculas contienen varios grupos funcionales susceptibles a la transformación, las reacciones suelen contaminarse con subproductos indeseados ⁷. Normalmente para evitar esta problemática y dirigir la reacción selectivamente

a un solo grupo funcional, se requiere de la protección y desprotección de grupos funcionales. Particularmente, en moléculas como los amino-alcoholes, dada la diferencia entre la nucleofilicidad del amino e hidroxilo, es común que se favorezca la N- sobre la O-acilación. A diferencia de la química tradicional, las enzimas no requieren de la activación del ácido carboxílico para llevar a cabo la síntesis de ésteres o amidas ya que esta tarea es realizada a nivel del sitio activo. Desde un punto de vista cinético, la enzima puede llevar a cabo la transformación en función de la facilidad para formar el complejo activo acil-enzima. Desde un punto de vista termodinámico, la reacción de acilación puede ser favorecida o controlada en la medida en que las interacciones generadas entre los productos y el medio de reacción lo promuevan. De hecho, para la manipulación de la quimioselectividad enzimática se plantean dos enfoques distintos que involucran un control cinético o bien termodinámico. En términos del control cinético, por lo general se manipula la relación entre el ácido carboxílico y la base (amina) con el objetivo de modificar el estado de ionización del grupo amino. En otras palabras, este tipo de estrategia se orienta a incrementar o reducir la disponibilidad del grupo amino beneficiando o previniendo la N-acilación sobre la O-acilación, respectivamente ^{8,9}. Por otro lado, desde el punto de vista termodinámico, la estrategia contempla modificaciones en la polaridad del medio de reacción con el fin de alterar las interacciones entre los componentes de la reacción. En particular, esta propuesta propone reducir los coeficientes de actividad termodinámica del producto de interés en función de la naturaleza del disolvente; de tal manera que, dicha reducción se refleje en la acumulación de la especie al equilibrio ^{10,11}. Este razonamiento sugiere que desde el punto de vista termodinámico, el empleo de medios de reacción hidrofóbicos son propicios para la producción de moléculas de carácter hidrofóbico como los ésteres y no así para la producción de amidas. Por el contrario, para la síntesis de compuestos con enlaces y características propiamente polares como las amidas, se recomienda el uso de disolventes hidrofílicos ¹².

Este proyecto plantea el desarrollo de una herramienta enzimática que integra la enantio- y quimioselectividad. Dentro de la gran variedad de enzimas existentes, el estudio refiere al uso de las lipasas. En particular, el modelo catalítico empleado es la lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B). La facultad que define a las lipasas como biocatalizadores útiles en la síntesis orgánica es su versatilidad catalítica. Es decir, CaL-B tiene la capacidad de transferir una gran diversidad de ácidos grasos así como de transformar diferentes alcoholes, ésteres, y aminas. Cabe resaltar que si bien la hidrólisis de ésteres es la actividad natural de las lipasas, se le atribuye nula o escasa actividad amidasa. Una consideración importante y determinante en la elección de este biocatalizador se debe a sus propiedades enantioselectivas. Este catalizador tiene la propiedad de reconocer centros quirales de alcoholes secundarios y aminas estructuralmente análogas. De hecho, el mecanismo de reconocimiento estereoselectivo de esta lipasa ha sido ampliamente descrito y como consecuencia, se emplea para la resolución de una amplia cantidad de moléculas quirales. Otro de los criterios por el que este biocatalizador fue seleccionado se fundamenta en la estabilidad que ofrece en distintos medios de reacción. Esta cualidad persiste en medios de reacción tan polares como el agua o líquidos iónicos, o de extrema hidrofobicidad como el *n*-hexano. El beneficio de ello expande su aplicación a la transformación de sustratos insolubles en agua, así como la posibilidad de manipular propiedades selectivas dentro de las que se incluyen la selectividad al sustrato, la regio-, quimio- y enantioselectividad.

Como consecuencia de esta promiscuidad catalítica y de las propiedades selectivas de CaL-B, se presenta en primera instancia un estudio dirigido a la síntesis e hidrólisis de amidas. Debido a que la síntesis de ésteres está ampliamente estudiada, en este proyecto partimos de la base de que un uso adecuado de los disolventes permite controlar la reversibilidad de la reacción para favorecer la síntesis de amidas. En particular, se propone que en la síntesis de amidas catalizadas por CaL-B, los altos rendimientos obtenidos en 2- metil-2-butanol (2M2B) no están influenciados por la estructura de los productos; más aún, se plantea que esta dependencia corresponde a la polaridad del enlace que se forma (**CAPÍTULO 1.**). La capacidad de CaL-B para hidrolizar la capsaicina¹³ así como la necesidad de un proceso biotecnológico amigable para la hidrólisis de amidas condujo a explorar las características determinantes en la actividad amidasa de esta lipasa. Se sugiere que la eficiencia de CaL-B está en función de las características estructurales de las amidas, en particular de la longitud del residuo acilo de la amida (**CAPÍTULO 2.**). La aplicación inmediata de ambos resultados, en beneficio de la alta capacidad enantioselectiva de CaL-B, se integró en la resolución efectiva de una mezcla racémica por medio de una estrategia acuñada con el término Easy-on, Easy-off (**CAPÍTULO 3.**). Finalmente, los resultados anteriores se dirigen a establecer un proceso integral quimio- y enantioselectivo para la resolución de moléculas bifuncionales en el que se sugiere que al equilibrio, la acumulación preferencial de amidas o ésteres puede manipularse mediante la apropiada elección del medio de reacción (**CAPÍTULO 4.**).



Esquema 1. Representación gráfica de las áreas que se cubren en el proyecto. Mediante el estudio de la síntesis e hidrólisis de ésteres y amidas (**CAP 1, 2**), empleando como herramienta enantioselectiva a CaL-B (**CAP 3**), se plantean estrategias para el diseño de procesos integrales quimioselectivos (**CAP 4**) así como enantioselectivos para la resolución de mezclas racémicas de moléculas bifuncionales (**CAP 5**).

ANTECEDENTES

A1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS LIPASAS

Las lipasas son enzimas pertenecientes al grupo de las serin hidrolasas y tienen como reacción natural la hidrólisis de ésteres del glicerol (E.C. 3.1.1.3). Por esta razón también se conocen como acil-glicerolhidrolasas, acil hidrolasas o triacilglicerol hidrolasas ¹⁴. La mayoría de las lipasas son extracelulares y hay de diversos tamaños que van de 20 a 60 kDa. La estructura primaria de varias lipasas ha sido determinada. Dentro de sus características estructurales se incluye un plegamiento α/β hidrolasa, compuesto por un núcleo estructural de hebras β rodeado por hélices α , típico de numerosas hidrolasas (Figura 1.). Por lo general, las lipasas tienen una única estructura terciaria que expone al sitio catalítico solo en presencia de una fase lipídica insoluble (interfase agua-aceite) o bien en un disolvente orgánico con propiedades hidrofóbicas. Este fenómeno se conoce como activación interfacial y en la mayoría de los casos la causa de tal efecto se debe a una tapa formada por una α -hélice que cubre el sitio activo.

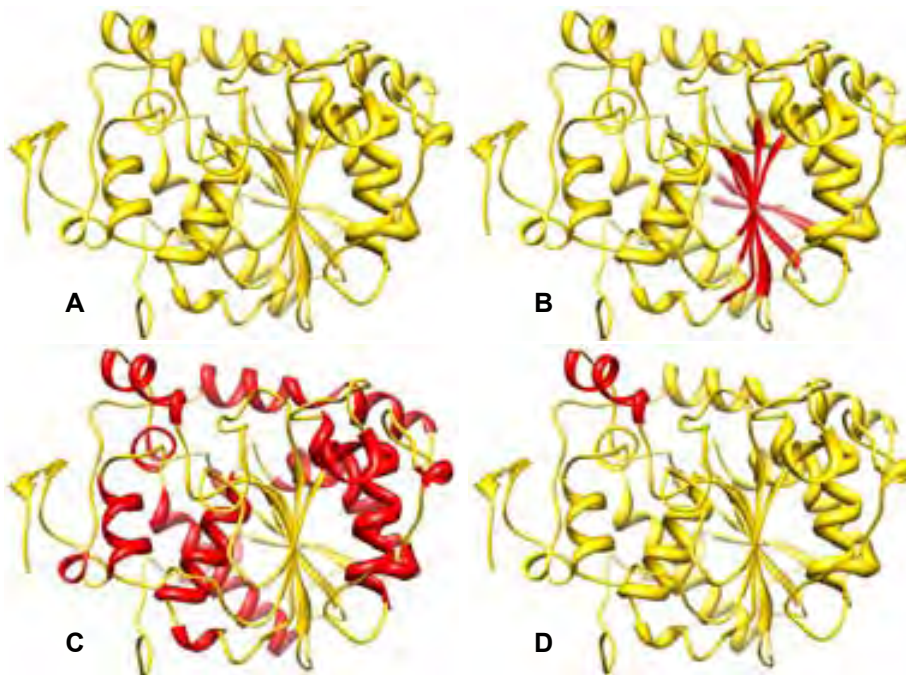


Figura 1. **A** Vista frontal de la estructura cristalográfica de la lipasa B de *Candida antarctica* (PDB 1TCA). **1.B.** Núcleo estructural de hebras β rodeado por **(1.C.)** hélices α . **1.D.** Hélice móvil ($\alpha 5$) responsable de la activación interfacial, o anclaje a la bifase lipídica.

Cabe señalar que existen lipasas que a pesar de contar con este motivo estructural, no presentan activación interfacial; en estos casos el sitio activo se encuentra expuesto permanentemente. Las lipasas de *P. glumae*, *P. aeruginosa* y la lipasa B de *C. antarctica* pertenecen a este grupo de enzimas. Para estas enzimas se propone que la hélice móvil ($\alpha 5$) tiene la función de enlazar o sujetar a la enzima a la interfase lipídica. De hecho, la estabilidad de las lipasas en disolventes hidrofóbicos está íntimamente relacionada a ésta característica estructural¹⁵. En particular, esto se debe a la gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos que expone cuando el sitio activo se vuelve accesible. Además, se han identificado cuatro estructuras que participan en la estabilización del estado de transición: un oxianión y tres cavidades (*sn*-1, -2 o -3) en donde se acomodan los ácidos grasos del triglicérido (**Figura 2**).

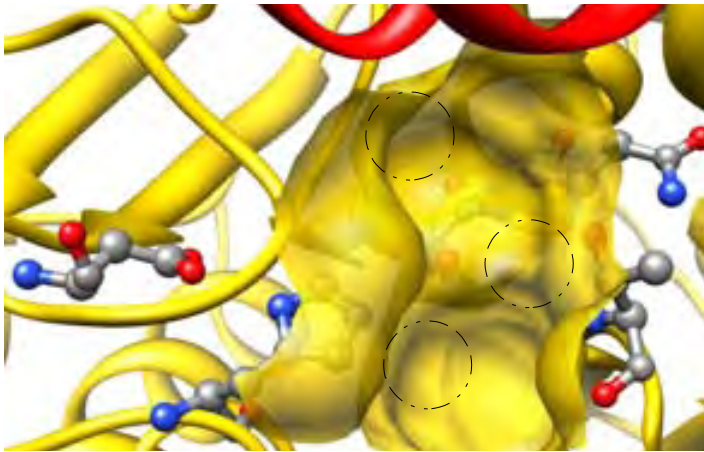


Figura 2. Superficie del sitio activo de la lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B). Con los círculos punteados se indican las tres cavidades en donde se sitúan los tres ácidos de los triglicéridos (*sn*-1, -2 y -3). La estructura secundaria marcada en rojo representa la hélice móvil ($\alpha 5$).

A diferencia de las esterasas, las lipasas pueden ser redefinidas como carboxil-esterasas con afinidad preferente hacia ácidos carboxílicos de cadena larga. Si bien el término cadena larga no es preciso, se sugiere que a este grupo pertenecen los ácidos de 10 ó más átomos de carbono en su cadena hidrocarbonada. Cabe aclarar que aún así, a expensas de decrementos en la afinidad, las lipasas son capaces de hidrolizar o sintetizar moléculas con residuos carboxílicos de menor tamaño. Sin embargo, la elección del ácido carboxílico es una condición esencial para la actividad de lipasas^{16,17}. En términos de las características del sitio activo, al igual que las serín proteasas, las lipasas se clasifican como serín hidrolasas ya que se componen de una triada catalítica integrada por una serina nucleofílica, un aspartato o glutamato unido por un puente de hidrógeno a una histidina (**Figura 3**).

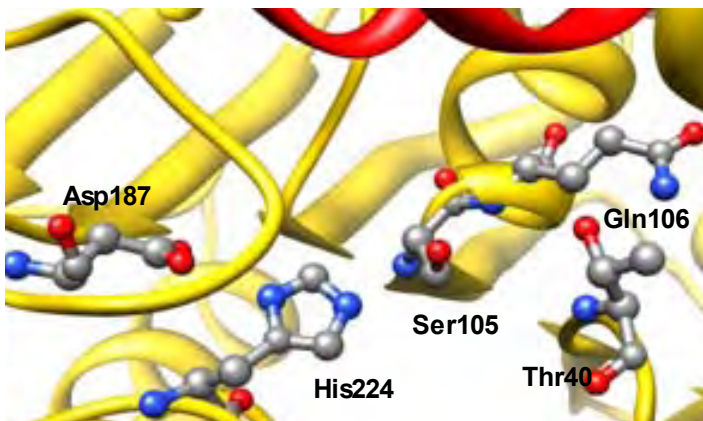


Figura 3. Sitio activo de CaL-B en donde se representa la triada catalítica (Ser105, Asp187 e His224) y el agujero oxianión (Thr40 y Gln106). La estructura secundaria en rojo es la hélice móvil ($\alpha 5$).

Estas enzimas prosiguen un comportamiento catalítico que se ajusta al modelo de tipo Ping Pong Bi Bi (**Figura 4.B**). La reactividad de la enzima se da cuando la serina nucleofílica es activada por la histidina y el ácido aspártico a través de una transferencia de protones. De esta manera la reacción comienza cuando la serina activada actúa como nucleófilo en un ataque al grupo carbonilo del sustrato (**S1**), con la salida concertada del primer producto (**P1**). Este intermediario tetraédrico se estabiliza mediante interacciones con el agujero oxianión. El primer producto de la reacción se genera cuando la histidina dona el protón, originario de la serina, al grupo saliente y se produce el complejo acil-enzima. El segundo sustrato (**S2**), nuevamente en un ataque nucleofílico, regenera un complejo tetraédrico formando un puente de hidrógeno con la histidina para entonces obtener el último producto (**P2**) de la reacción cuando la serina recupera el protón, regresando así la enzima a su estado original ^{14,18}.

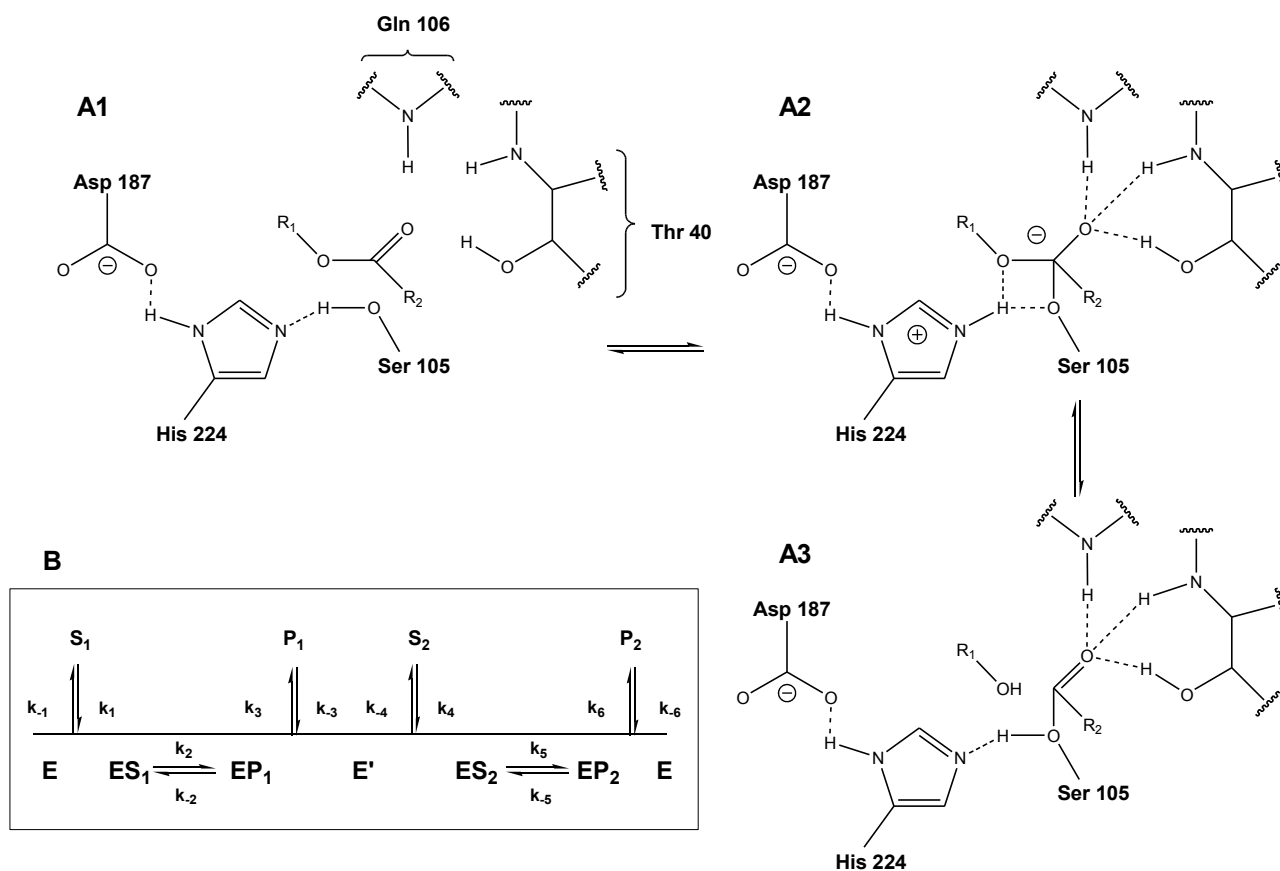


Figura 4. **A1)** Mecanismo catalítico de las lipasas basado en la triada catalítica compuesta por una serina nucleofílica (Ser105), una histidina (His224) y un ácido aspártico (Asp187). El intermediario tetraédrico (**A2**) es estabilizado mediante puentes de hidrógeno con lo que se conoce como el agujero oxianión integrado por una treonina (Thr40) y una glutamina (Gln106). El complejo acil-enzima (**A3**) se rompe cuando un segundo sustrato lleva a cabo un ataque nucleofílico al carbonilo de este complejo. A partir de entonces se genera un nuevo intermediario tetraédrico (**A2**) para terminar con la liberación del segundo producto y regenerar el sitio activo (**A1**). La numeración de los amino ácidos corresponde a la estructura de la lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B). (Figura adaptada para CaL-B de la referencia 14). **B)** Modelo de Ping-Pong Bi Bi.

Un atributo de las lipasas que permite su aplicación en síntesis orgánica es la versatilidad catalítica en términos de los grupos funcionales que puede transformar, entendido esto último

como promiscuidad por el sustrato ¹⁹. Es decir, estas enzimas son capaces de transformar distintos grupos funcionales (**Figura 5**). Esta propiedad está íntimamente ligada al mecanismo catalítico de las lipasas y a la nucleofilicidad de los grupos que transforma, lo que les permite la transformación de una amplia gama sustratos. En este sentido, y aprovechando su alta capacidad enantioselectiva, estas enzimas han sido ampliamente empleadas como herramientas para la resolución de mezclas racémicas de aminas, alcoholes, tioles, α -, β - y γ -amino-ácidos, ésteres, lactonas, entre otras ^{20,21,18,22,23,24,25}.

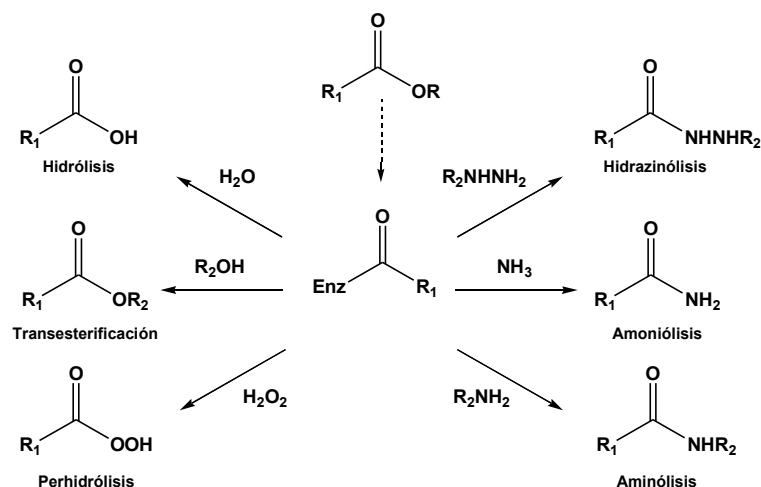


Figura 5. Reacciones más comunes catalizadas por lipasas en disolventes orgánicos en las que intervienen alcoholes y aminas.

A2. RECONOCIMIENTO ENANTIOSELECTIVO DE LAS LIPASAS

Una de las propiedades más relevantes del sitio activo de las lipasas se debe a sus características estructurales, de las cuales deriva su alta capacidad enantioselectiva. La disponibilidad de lipasas co-cristalizadas con inhibidores quirales ha permitido describir las interacciones fundamentales entre el sitio activo de la enzima y el sustrato que determinan la eficiencia enantioselectiva ^{26,27,28,29,30,3}. En este sentido, el modelado *in silico* de estas enzimas proporciona información necesaria para analizar el efecto de la estructura del sustrato o bien, para realizar mutaciones puntuales a la enzima, que favorezcan el desempeño enantioselectivo. De hecho, existe una amplia cantidad de reportes con enfoques y objetivos distintos dentro de los que destacan, estrategias para incrementar la enantioselectividad de las lipasas ³¹, resolver mezclas racémicas que la enzima nativa no discrimina ³², e incluso, invertir la enantioselectividad de la enzima ⁴. Algunas aproximaciones orientadas a la estudio de la estructura del sustrato han demostrado que incrementar las interacciones del estado de transición entre la especie a transformar y el sitio activo de la enzima, mejoran la enantioselectividad de la reacción (**Figura 6**).

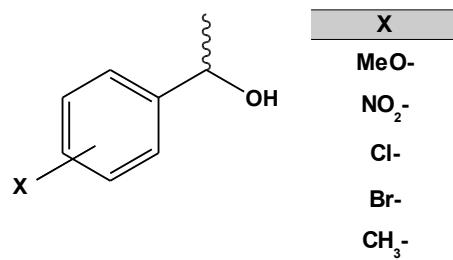


Figura 6. Se ha observado que cambios en la posición y naturaleza del sustituyente del anillo aromático en la esterificación de alcoholes quirales catalizadas por lipasas modifica la enantioselectividad de la reacción.

En este mismo sentido, pero desde el punto de vista estructural, se ha demostrado que alteraciones a la estructura del sitio activo o modificaciones en la arquitectura del sitio activo también altera la enantioselectividad de las enzimas. Un ejemplo de ello es la mutante Trp104Ala de CaL-B en donde el cambio del aminoácido permite entonces el reconocimiento del enantiómero (S)- del feniletanol ³³ (Figura 7.).

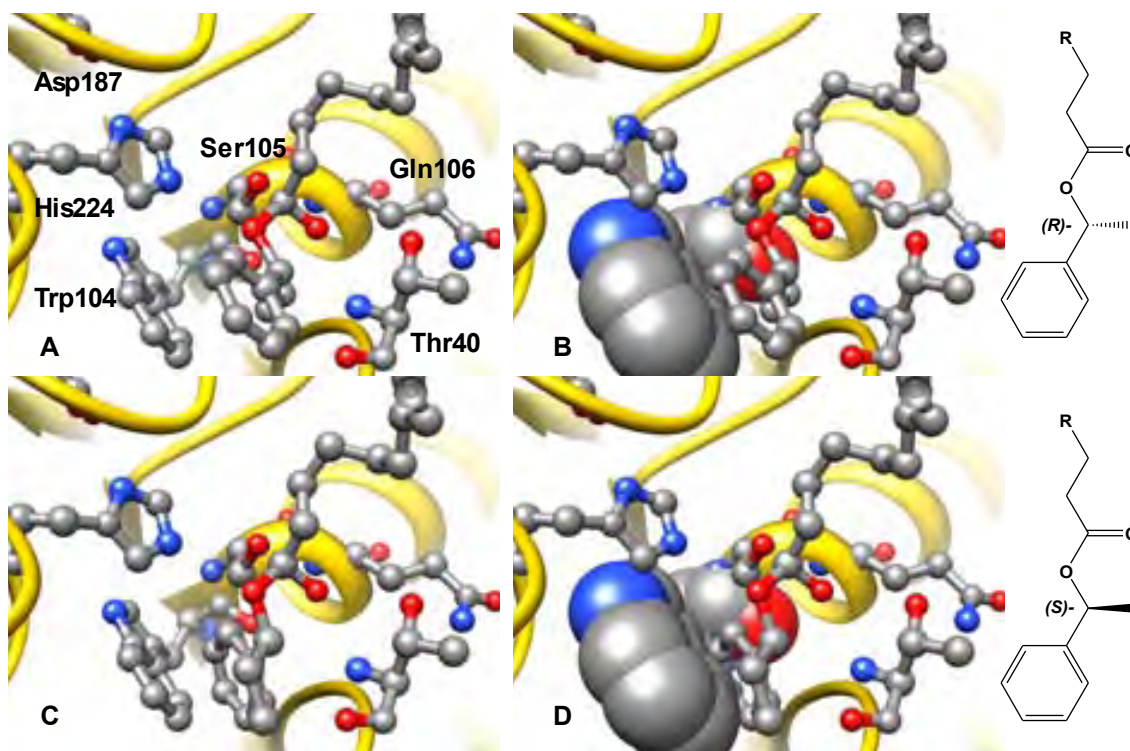


Figura 7. A y B Representación del sitio activo de CaL-B en complejo con el éster del (R)-feniletanol en donde además de los aminoácidos de la triada catalítica y el agujero oxianión se presenta el triptofano (Trp104), principal responsable de la discriminación enantiomérica que acota los sitios de reconocimiento para los sustituyentes del carbono quiral (fenilo y metilo). C y D Representaciones forzadas del complejo entre CaL-B y el enantiómero del éster del (S)-feniletanol en donde se muestran los impedimentos estéricos entre el aminoácido Trp104 y el sustituyente fenilo.

La estereoselectividad también puede modularse mediante la ingeniería de disolventes ³⁴. Cabe aclarar que el mecanismo que origina estos cambios no están totalmente esclarecidos. Una hipótesis consiste en explicar que es la estereoselectividad de la molécula lo que se manipula y no la del biocatalizador. En otras palabras, los cambios en la enantioselectividad se atribuyen a modificaciones en la energía libre de un cluster entre el soluto y el disolvente conocido como “supramolécula” ³⁵. Es decir, que la estereoespecificidad de una reacción depende de la estructura de la supramolécula, determinada por las interacciones entre el sustrato y el disolvente a una temperatura determinada. Por ello una molécula en distinto medio a una temperatura determinada presenta una conformación diferente y en consecuencia, la estereoespecificidad se altera. En conclusión, los cambios en la enantioselectividad mediada por el uso de distintos medios de reacción no dependen ni de la enzima, ni de la molécula *per se*, sino de la conformación de la supramolécula soluto-disolvente.

Otra alternativa para modificar la enantioselectividad enzimática que no involucra aspectos estructurales ni de la enzima ni del sustrato se produce al modificar la temperatura del medio de reacción. La estrategia para manipular la enantioselectividad de una reacción enzimática en función de la temperatura se deriva a partir de la teoría del estado de transición ³⁶. Para ello es necesario tomar en cuenta la diferencia de la energía libre de activación entre ambos enantiómeros ($\Delta\Delta G_{S-R}^\ddagger$), misma que puede ser dividida en componentes entálpicos ($\Delta\Delta H_{S-R}^\ddagger$) y entrópicos ($\Delta\Delta S_{S-R}^\ddagger$) de acuerdo a,

$$(\Delta G_S - \Delta G_R)^\ddagger = (\Delta\Delta G_{S-R})^\ddagger = (\Delta\Delta H_{S-R})^\ddagger - T(\Delta\Delta S_{S-R})^\ddagger \quad \text{Ec. 1}$$

en donde $\Delta\Delta$ se interpreta como la diferencia de energía entre enantiómeros. De acuerdo a la ecuación anterior (**Ec. 1**), en función de la magnitud de cada diferencia energética entre los enantiómeros ($\Delta\Delta H_{S-R}^\ddagger$ y $\Delta\Delta S_{S-R}^\ddagger$), la enantioselectividad de la reacción puede ser fuertemente influenciada por pequeños cambios de temperatura. De hecho, con la ecuación anterior se puede calcular el valor de temperatura teórico al cual el proceso deja de ser enantioselectivo (**Ec. 2**), esto es, cuando no hay diferencia en la energía libre de reacción entre ambos enantiómeros ($\Delta\Delta G^\ddagger = 0$).

$$T_r = \frac{(\Delta\Delta H_{S-R})^\ddagger}{(\Delta\Delta S_{S-R})^\ddagger} \quad \text{Ec. 2}$$

Esta temperatura, conocida como temperatura de inversión o racemización, es específica para cada reacción enzimática. Dependiendo de la magnitud de cada contribución energética (entálpica o entrópica) la temperatura de racemización puede ser elevada o moderada. Cuando la temperatura de racemización es moderada ($T_r < 400^\circ\text{K}$), pequeñas variaciones en la temperatura de reacción tendrán un efecto significativo en la enantioselectividad de la misma. Este fenómeno quedará clarificado en la siguiente sección mediante un análisis a detalle sobre los criterios para evaluar los procesos enantioselectivos así como la contribución de las energías entrópica y entálpica a la energía libre de las reacciones para cada enantiómero. Por lo pronto es importante resaltar que existe una temperatura teórica en la que las velocidades de transformación para ambos estereoisómeros es la misma y que esta se conoce como temperatura de inversión o racemización (**Ec. 2**).

Para las reacciones enantioselectivas catalizadas por lipasas se han identificado dos tipos de reconocimiento distinto. Clasificadas de acuerdo a sus propiedades enantioselectivas se dividen en lipasas con reconocimiento de centros quirales remotos como el de alcoholes primarios y lipasas con estereoselectividad para alcoholes secundarios (**Figura 8**).

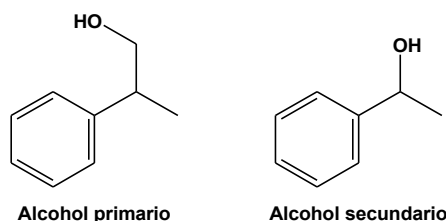


Figura 8. Estructuras representativas de un alcohol primario y uno secundario.

El primer grupo de lipasas del cual se describieron las propiedades estereoselectivas son aquellas cuya capacidad discriminatoria está determinada para alcoholes secundarios en los que el grupo funcional participa como sustituyente del carbono quiral. Para este reconocimiento, mediante química combinatoria, se propuso una regla empírica que permite predecir la viabilidad enantioselectiva de lipasas en función del volumen de los sustituyentes

del carbono quiral³⁷; modelo que ahora se conoce como regla de Kazlauskas (**Figura 9**). Este modelo propone que en el sitio activo están presentes dos cavidades de volumen distinto para el acomodo y reconocimientos de los sustituyentes del carbono quiral denominadas cavidades “Large” (L) y “Medium-size” (M).

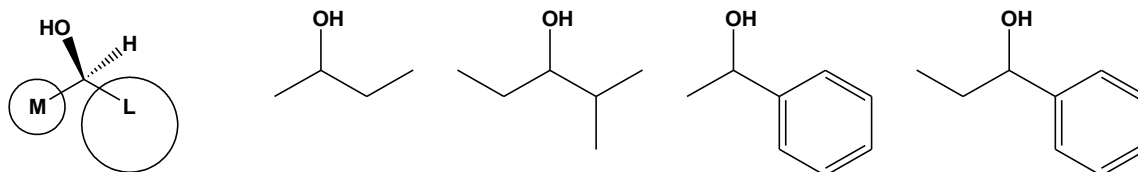


Figura 9. Modelo de Kazlauskas. El esquema muestra el acomodo correcto para el enantiómero favorecido. El grupo hidroxilo apunta hacia afuera del plano de la hoja. **M** representa al sustituyente de volumen pequeño y **L**, al sustituyente de mayor volumen. Aunque el tamaño del volumen para cada sustituyente es distinto para cada lipasa, por lo general el sustituyente de menor tamaño no excede las dimensiones volumétricas del grupo etilo, y las del mayor volumen corresponde al volumen de un fenilo.

La cristalización de un complejo entre la lipasa de *Candida rugosa* (CRL) y un inhibidor quiral proporcionó la información estructural que precisa los sitios de reconocimiento de los sustituyentes del carbono quiral considerados en el modelo de Kazlauskas³⁸ (PDB **1LPM**). Además, la información de este complejo detalla las interacciones entre los amino-ácidos del sitio activo y los grupos funcionales del sustrato que estabilizan el estado de transición para el estereoisómero transformable. De hecho, mediante el análisis de la estructura resuelta de la lipasa B de *Candida antarctica*³⁹ se generaliza el modelo geométrico descrito por Kazlauskas y la presencia de ambas cavidades²⁶, así como las interacciones moleculares entre la proteína y enantiómero determinantes para el reconocimiento enantioselectivo^{40,18} (**Figura 10**). Una vez esclarecidos los límites volumétricos de las cavidades de reconocimiento y las interacciones de los amino-ácidos que componen al agujero oxanión, se ha generado un importante número de trabajos integrados por modelamiento *in silico* y herramientas de biología molecular dirigidos a la búsqueda de variantes con mejores propiedades enantioselectivas^{41,42,32,33}.

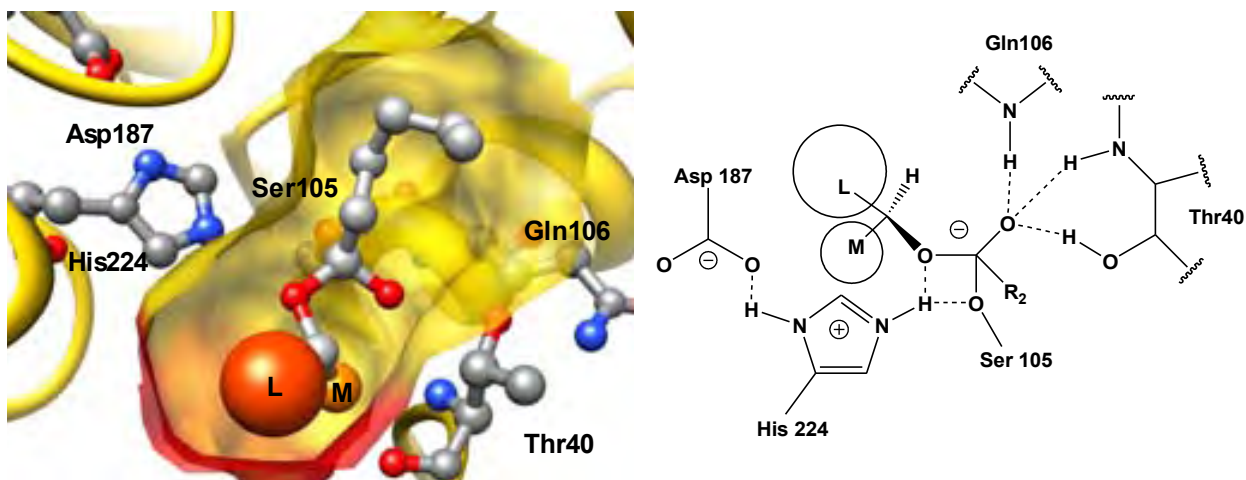


Figura 10. Esquema del acomodo correcto de los sustituyentes del carbono quiral en los sitios de reconocimiento descritos por Kazlauskas (**M** y **L**), así como la estabilización del intermediario tetraédrico. En el enantiómero menos favorecido o bien los sustituyentes no caben en los sitios de reconocimiento por impedimentos estéricos, o bien, no se generan los puentes de hidrógeno con el agujero oxanión que estabilizan al complejo tetraédrico.

Por otro lado, se han descrito lipasas con la capacidad de discriminar centros quirales remotos al grupo funcional, ejemplo de ellas es la lipasa de *Pseudomonas cepacia* ahora reclasificada como *Burkholderia cepacia*²⁷. Mediante el empleo de este biocatalizador, particularmente en la hidrólisis de ésteres, se resuelven enantiómeros de alcoholes primarios cuyo centro quiral se encuentra alejado por un carbono de distancia del grupo funcional^{43, 44, 45}. La cristalización de esta enzima ha permitido sugerir las causalidades del reconocimiento enantioselectivo⁴⁶. Sin embargo, a pesar del extenso provecho de esta lipasa en la resolución de alcoholes primarios y en la abundante cantidad de reportes que describen el mecanismo de discriminación enantiomérico, aún existen algunas controversias al respecto. Dos propuestas refieren a lo que comúnmente se conoce como modelo o regla de Kazlauskas, originalmente propuesta para la resolución de alcoholes secundarios (**Figura 11.a**)³⁷. Una de ellas plantea que existen dos sitios de reconocimiento para los sustituyentes del carbono quiral que difieren en volumen. En consecuencia, la capacidad estereoselectiva de la lipasa depende del apropiado acomodo de los sustituyentes³¹(**Figura 11.b**), por lo que la enantioselectividad es mayor cuanto mayor diferencia exista entre los sustituyentes del carbono quiral. Por otro lado, aunque con cierta semejanza, se propone que existe un sitio de reconocimiento alternativo para grupos hidrofóbicos⁴⁷(**Figura 11.c**). En particular, sugieren que existe una tercera cavidad alternativa exclusiva para la estabilización y reconocimiento de sustituyentes hidrofóbicos dado que en ella se concentran una gran cantidad de aminoácidos hidrofóbicos.

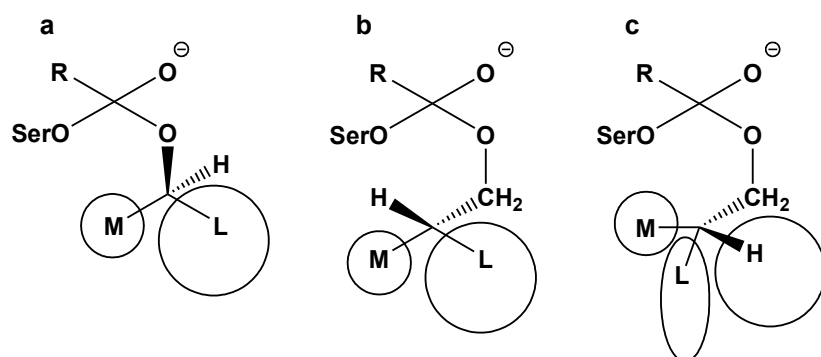


Figura 11. a) Modelos clásicos de Kazlauskas para alcoholes secundarios y (b) primarios. c) Modelo en el que se propone un sitio de reconocimiento alternativo de interacción para grupos hidrofóbicos. En todos los casos se esquematiza el intermediario tetraédrico.

Si bien la predicción mediante los modelos descritos anteriormente puede ser precisa, también se plantea que la interacción molecular responsable de la enantioselectividad de la lipasa de *Burkholderia cepacia* se debe a un empaquetamiento de la imagen-especular (Mirror-Image Packing)³. En cristales de esta enzima inhibida por ambos enantiómeros de un fosfonato (*R* y *S*) que mimetizan el estado de transición (PDB **1YS1** y **1YS2**), se observa que la única diferencia entre ambos estereoisómeros es la posición del hidrógeno del carbono quiral (**Figura 12.**). Por ello, se atribuye como responsables de la discriminación enantiomérica a las interacciones de este protón. Incluso se plantea que, en el modelo de Kazlauskas las interacciones de los sustituyentes con los sitios de reconocimiento podrían ser inespecíficas y aún así la lipasa manifestaría enantioselectividad debido a la correcta posición del hidrógeno. Como se puede apreciar, a pesar de las inferencias que ofrece el modelo de Kazlauskas, las bases moleculares que describen la razón de la selectividad enantiomérica de este tipo de lipasas (con reconocimiento de alcoholes primarios) como la de *Burkholderia cepacia* divergen. Aún así, el empleo de estas lipasas para la resolución enantiomérica de alcoholes primarios es considerablemente aprovechado.

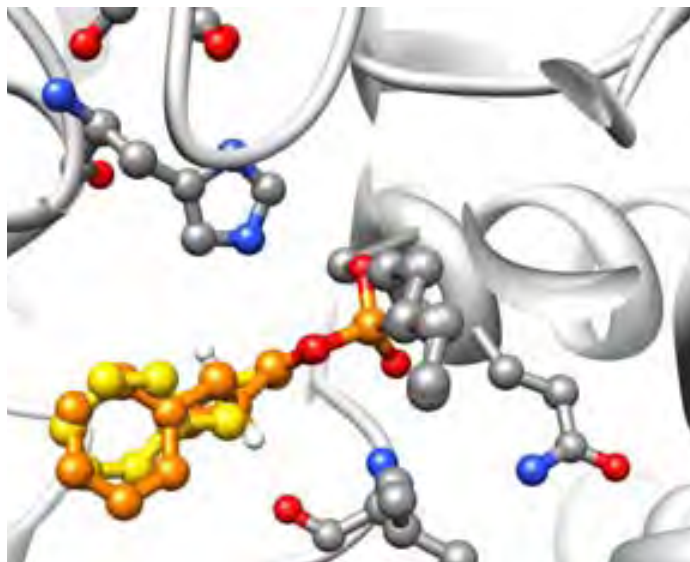


Figura 12. Representación de dos cristales de la lipasa de *Burkholderia cepacia* inhibida por ésteres del ácido hexilfosfónico y el 2-metil-3-fenilpropanol. En naranja, el enantiómero (*R*)- del alcohol y en amarillo el estereoisómero (*S*)-. Como se puede apreciar en la comparación de ambas estructuras (**1YS1**, **1YS2**), la única diferencia significativa entre ellos es la posición del hidrógeno del carbono quiral.

Para evitar la ambigüedad en términos de la capacidad enantioselectiva de cualquier enzima y cuantificar esta propiedad, a continuación se describe un parámetro que integra la pureza enantiomérica y la conversión de la reacción. El valor de este parámetro define a la enzima y por consecuencia, es una propiedad intrínseca del catalizador. La utilidad de este parámetro permite comparar la eficiencia enantioselectiva de varias enzimas para un mismo compuesto o bien, la selectividad de una enzima para varios sustratos.

A3. CUANTIFICACIÓN DE LA ENANTIOSELECTIVIDAD

En una reacción enantioselectiva, la descripción de la enantiopureza, para sustrato o producto, está determinada por la diferencia entre la concentración de un enantiómero con respecto al otro, en una expresión conocida como exceso enantiomérico (**ee**)⁴⁸.

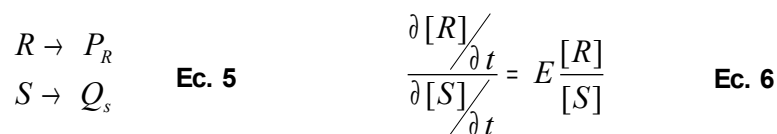
$$ee = \frac{|[R] - [S]|}{|[R] + [S]|} \quad \text{Ec. 3}$$

Sin embargo, la información que proporciona este parámetro es limitada y se restringe a la relación entre enantiómeros. Para describir la eficiencia del proceso enantioselectivo se propone la incorporación de un parámetro de proporción enantiomérica conocido como valor E. Dicho valor es función de la relación entre las constantes catalíticas del biocatalizador (k_{cat}/K_m) que caracterizan la formación de cada uno de los enantiómeros.

$$E = \frac{V_{mx}^R / K_m^R}{V_{mx}^S / K_m^S} = \frac{k_{cat}^R K_m^S}{k_{cat}^S K_m^R} \quad \text{Ec. 4}$$

Este parámetro E, por definición, es una propiedad intrínseca del catalizador⁴⁹. En el mejor de los casos, el ímpetu se dirige al empleo de una enzima que permita la obtención de un enantiómero (sustrato y/o producto) con la mayor enantiopureza posible y que la eficiencia

catalítica (kcat/Km) del enantiómero discriminado sea despreciable. En otras palabras un proceso altamente enantioselectivo se califica por un $ee > 95\%$ y un valor de $E > 70$. Caso contrario, enzimas con baja capacidad estereoselectiva se caracterizan por valores de $E < 50$. Aún así, el empleo de enzimas con esta pobre característica selectiva permite la obtención de altos excesos enantioméricos del sustrato o producto en detrimento de la conversión o producción, respectivamente. Lo anterior se expresa con mayor claridad al caracterizar las reacciones de resolución enantioselectiva mediante el valor E , expresado en función de la conversión y el exceso enantiomérico. Para tal efecto, se recurre al ejemplo de resolución enzimática más sencillo, tomando en cuenta una reacción irreversible unimolecular, sin reacciones secundarias (**Ec. 5**). La expresión de esta reacción, en acuerdo a la definición del valor de E (**Ec. 4**) queda descrito por la **Ec. 6**.



Al resolver esta diferencial a condiciones iniciales de $[S] = [S]_0$ y $[R] = [R]_0$ a $t = 0$, entonces:

$$\ln \frac{[R]}{[R]_0} = E \ln \frac{[S]}{[S]_0} \quad \text{Ec. 7}$$

La relación anterior puede expresarse como una relación entre el exceso enantiomérico del sustrato (**Ec. 3**) y la conversión (x) al definir esta última como:

$$x = 1 - \frac{[R] + [S]}{[R]_0 + [S]_0} \quad \text{Ec. 8}$$

de tal manera que:

$$\begin{aligned} [R] &= (1-x)(1-ee)([R]_0 + [S]_0)/2 \\ [S] &= (1-x)(1+ee)([R]_0 + [S]_0)/2 \end{aligned}$$

Para la resolución de una mezcla racémica, en donde la concentración de ambos enantiómeros es la misma ($[R]_0 = [S]_0$), la expresión de E (**Ec. 7**) en función de la conversión (**Ec. 8**) y el exceso enantiomérico del sustrato (**Ec. 3**) se describe como:

$$E = \frac{\ln[(1-x)(1-ee)]}{\ln[(1-x)(1+ee)]} \quad \text{Ec. 9}$$

Como se mencionó con anterioridad, el valor de E es una propiedad intrínseca del catalizador y su utilidad reside en la predicción del exceso enantiomérico (ee) a una conversión determinada; o viceversa, la conversión requerida para la obtención del exceso enantiomérico deseado. La visualización gráfica de la **Ec. 9** para enzimas con distintos valores de E permite apreciar la codependencia entre la conversión y el exceso enantiomérico (**Figura 13**). (Una extensa revisión sobre la cuantificación de la enantioselectividad se presenta en la referencia 49).

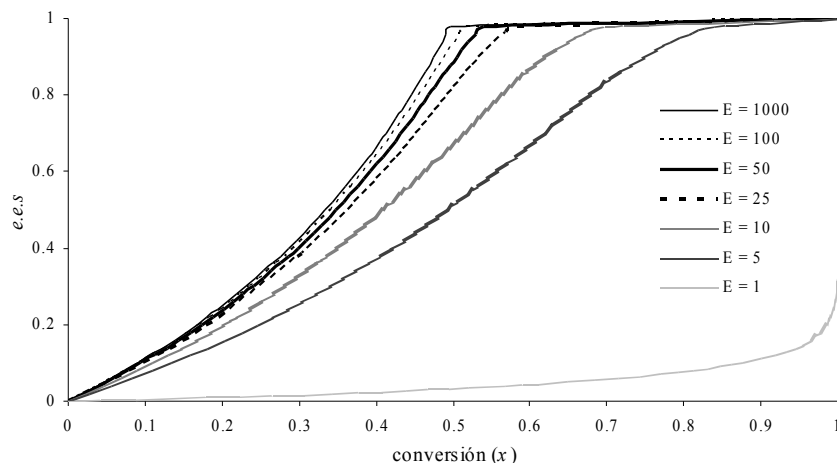


Figura 13. Enantioselectividad enzimática dependiente de el exceso enantiomérico del sustrato (ees) y de la conversión, para enzimas con diferente valor de E.

Retomando las consideraciones del apartado anterior en el que se describe la temperatura de racemización, ahora enfocado a la modificación de la enantioselectividad de la reacción en función de la temperatura, en acuerdo a la definición del parámetro E (**Ec. 4**) y a la teoría de estado de transición, la ecuación 1 (**Ec. 1**) puede reescribirse como:

$$\ln(E) = - \frac{(\Delta G_S - \Delta G_R)^\ddagger}{RT} = - \frac{(\Delta \Delta H_{S-R})^\ddagger}{RT} + \frac{(\Delta \Delta S_{S-R})^\ddagger}{R} \quad \text{Ec. 10}$$

Con esta ecuación, para reacciones en donde el $\ln(E)$ tiene un comportamiento lineal en función de T^{-1} , se puede calcular la diferencia tanto de la energía entálpica como entrópica entre los enantiómeros. Por consiguiente, con estos cálculos se puede estimar una temperatura óptima y adecuada para el proceso de resolución enantioselectiva en el que el valor de E sea el máximo posible. Más aún, la interpretación de esta correlación permite calcular la temperatura de racemización en la que el proceso pierde la estereoselectividad o incluso se invierte. Normalmente, en resoluciones enzimáticas enantioselectivas en donde la energía entálpica gobierna el proceso de discriminación y la contribución entrópica es despreciable, la temperatura de inversión es un valor teórico inadecuado para la catálisis enzimática ($T_r > 900^\circ\text{K}$). En cambio, para reacciones estereoselectivas controladas por la energía entrópica la temperatura de racemización suele ser inferior a los 100°C ($T_r < 380^\circ\text{K}$)³⁶. En los segundos, pequeños cambios en la temperatura de la reacción tienen una fuerte influencia en el valor de E y por tanto, en la enantioselectividad de la reacción. Varias aproximaciones se han llevado a cabo para discernir la influencia y contribución de cada energía a los procesos de resolución enantiomérica y aunque existen contradicciones se puede concluir que para cada reacción la magnitud de las contribuciones tanto entálpicas como entrópicas dependen del tipo de sustrato y del tipo de enzima. En otras palabras, la diferencia entre la energía libre de reacción de los enantiómeros, y en consecuencia el valor de E, en ocasiones es debida a la energía interna del complejo enzima-sustrato, y en otras, se debe a la adecuación y acomodo estructural de los enantiómeros en el sitio activo.

A4. RESOLUCIÓN DE AMINAS Y ALCOHOLES QUIRALES POR MEDIO DE LIPASAS

En la biocatálisis, las lipasas han sido ampliamente utilizada para la resolución de alcoholes, ácidos y lactonas mediante reacciones de hidrólisis, síntesis o transesterificación. Estas enzimas también se emplean en otros procesos que involucran reacciones de acilación; como por ejemplo, para la resolución de aminas o la producción de amidas quirales. Si bien la estrategia para los procesos enantioselectivos mediados por lipasas para la resolución de alcoholes y aminas difiere en cuanto a la elección del donador de acilo, por lo general en la síntesis de ésteres se emplean ésteres activados mientras que para la síntesis de amidas se recomienda el uso de ácidos carboxílicos libres. Tomando en cuenta que la reacción natural de las lipasas es la hidrólisis de ésteres, el empleo de estas enzimas para la resolución de ésteres es extenso tanto para la obtención de alcoholes quirales primarios como secundarios^{50,27}. Por lo general, las lipasas exhiben mayor estereoselectividad en la producción de alcoholes secundarios que primarios y a su vez que terciarios, tanto en la hidrólisis como en la síntesis de ésteres. De hecho, la factibilidad para resolver alcoholes mediante la acilación enantioselectiva extiende el espectro de procesos selectivos de estas enzimas (**Figura 14.**).

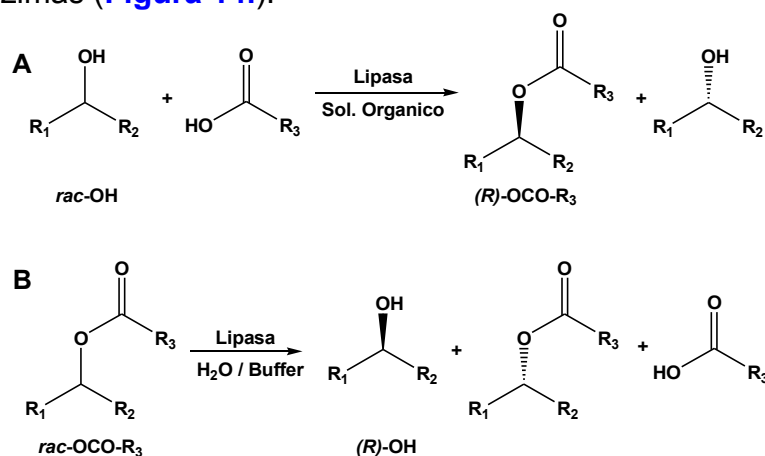


Figura 14. Esquemas para la resolución enantioselectiva de ésteres y alcoholes por medio de la síntesis (**A**) e hidrólisis (**B**) catalizadas por lipasas. Por lo común el enantiómero (*R*)- es el reconocido.

En acuerdo al modelo de Kazlauskas, tanto la hidrólisis como la síntesis enantioselectiva de ésteres, resulta en la transformación selectiva del enantiómero (*R*)-, independientemente del sentido termodinámico de la reacción (síntesis o hidrólisis). Por consiguiente, esta ventaja permite la resolución efectiva de alcoholes; es decir, mediante un proceso de síntesis e hidrólisis de ésteres, se pueden obtener ambos alcoholes con una alta enantiopureza⁵¹. Una amplia variedad de alcoholes de diversas estructuras han sido resueltos utilizando lipasas como catalizadores enantioselectivos y queda fuera del ámbito de esta introducción presentar las distintas estrategias y métodos para su resolución (se recomienda la ref. 52 para tal efecto). Algunos ejemplos de la diversidad estructural de alcoholes resueltos por lipasas se presenta en la siguiente figura (**Figura 15.**). Por otro lado, las lipasas también han encontrado un gran nicho en la resolución de aminas; peculiarmente, con aminas estructuralmente análogas a alcoholes secundarios. Una de las lipasas comúnmente utilizada para tal efecto es la lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B)⁵³.

R	E
1	Ph, CH ₂ Ph
	CH ₂ CN
	CH ₂ COOEt
2	Ph
	CH(N ₃)C ₂ H ₅
3	
4	cis-COOEt
	cis-OAc
	trans-COOEt
5	OH
	COOEt
6	

X	E
7	F
	Cl
	Br
	N ₃
8	F

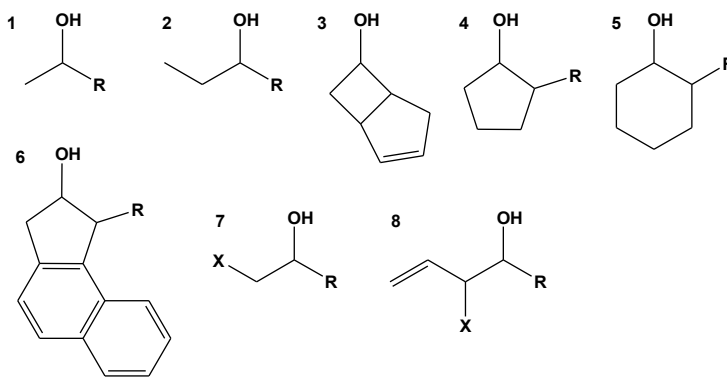


Figura 15. Algunos ejemplos de alcoholes quirales resueltos por medio de la acilación enantioselectiva de lipasas como la B de *Candida antarctica*, *Candida rugosa* y *Burkholderia cepacia*. Se puede observar que el valor de E cambia dependiendo de la estructura del sustrato.

Es importante enfatizar que dentro de todos los métodos de resolución mediados por lipasas, hasta la realización de este proyecto, no se había descrito la resolución de amidas o la producción de aminas quirales a partir de la hidrólisis de amidas. Inclusive, se había descartado a las lipasas como herramienta hidrolítica para tales sustratos pues se consideraba que las lipasas tenían nula o escasa actividad amidasa^{54,55}. Por tal motivo, la resolución efectiva de aminas por medio de enzimas reportadas hasta hace poco se limitaba a la obtención de solo un enantiómero (Figura 16.). Para la hidrólisis del estereoisómero transformado por la lipasa era necesario recurrir a métodos agresivos de química tradicional²⁴.

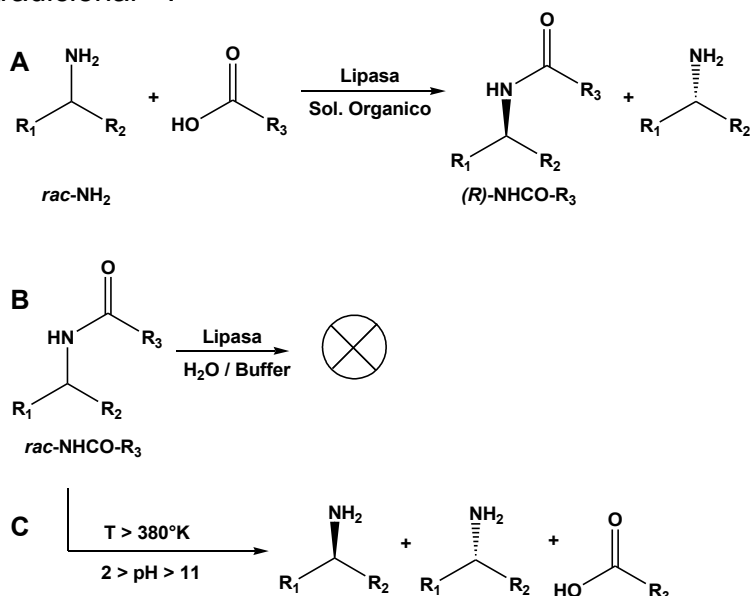


Figura 16. A Síntesis enantioselectiva de amidas. Dado que se ha reportado que las lipasas tienen nula o escasa actividad amidasa (B), para la hidrólisis de amidas se recurre a métodos agresivos de química tradicional (C).

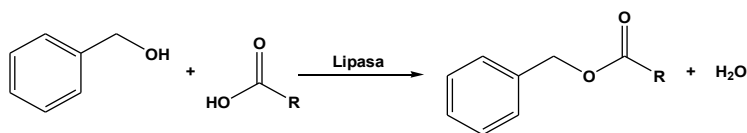
En la mayoría de los procesos de resolución enantioselectiva de aminas y alcoholes mediados por lipasas, en particular para alcoholes secundarios y aminas estructuralmente análogas, se obtiene altos excesos enantioméricos (ee > 98%) y elevados valores de

E (> 100). Si bien estos parámetros son una propiedad intrínseca de la lipasa y propiamente dicho, de la estructura del sitio activo, un factor atractivo en el aprovechamiento de la enantioselectividad de las lipasas está íntimamente ligado a la estabilidad de estas enzimas en distintos medios de reacción. De hecho, la hidrólisis inversa, o síntesis de ésteres y/o amidas está termodinámicamente impedida en medio acuoso. En cambio llevar a cabo la catálisis en medios no convencionales permite manipular termodinámicamente el sentido de la reacción como se describe a continuación.

A5. DESCRIPCIÓN DEL EQUILIBRIO TERMODINÁMICO Y SU INFLUENCIA EN LA SELECTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Por naturaleza, la mayoría de las enzimas actúan en medios acuosos. Sin embargo, para efectos prácticos, el agua es un disolvente pobre que termodinámicamente imposibilita la mayoría de las reacciones de síntesis orgánica, maximizando de hecho, el contrasentido (hidrólisis). Con el objetivo de desplazar el equilibrio termodinámico hacia la acumulación del producto de interés, la biocatálisis ha extrapolado su aplicación al empleo de disolventes orgánicos. En esta transición, la ingeniería de disolventes en biocatálisis ha transitado por transformaciones en disolventes miscibles en agua, reacciones en medios bifásicos, el uso de disolventes anhidros y recientemente el diseño de líquidos iónicos^{56,57,58,59,9}. A estos esfuerzos se suman estrategias para controlar la cantidad de agua disponible (a_w) por medio de la evaporación del agua producida a presiones reducidas o bien, mediante el empleo de tamices moleculares, resinas de intercambio iónico y la adición de sales deshidratadas. Por lo general, en reacciones que producen agua, se ha observado un decremento en el rendimiento de síntesis además de una disminución en la estabilidad de la enzima⁶⁰. Cabe mencionar que a pesar de los esfuerzos por eliminar la mayor cantidad de agua del medio para favorecer las reacciones de síntesis y disminuir la hidrólisis, en la práctica esto no resulta conveniente. Se sabe de hecho, que una cantidad mínima de agua es necesaria para la estabilidad estructural de la enzima y resulta indispensable para mantener su capacidad catalítica⁶¹. En este sentido, la mayoría de los disolventes polares con alta afinidad por el agua tienden a inactivar a las enzimas al secuestrar dichas moléculas de agua indispensables. Por el contrario, algunos disolventes hidrofóbicos incompatibles con el agua no provocan ni la inactivación, ni la deshidratación de la enzima y ello los convierte en medios de reacción convenientes para la biocatálisis.

Por lo anterior, en las reacciones mediadas por lipasas en las que se produce agua, como en la síntesis de ésteres o amidas, uno de los objetivos principales es el control termodinámico del agua, o actividad termodinámica de la misma (a_i). Ello está íntimamente relacionado con el desplazamiento del equilibrio hacia la acumulación del producto de acuerdo a la definición de la constante de equilibrio termodinámico (**Ec. 11**).



$$K_e = \frac{a_{\text{éster}} \times a_{\text{agua}}}{a_{\text{alcohol}} \times a_{\text{ácido}}}$$

Ec. 11

La actividad termodinámica (a_i) de cada especie se define como el producto de la fracción mol (X_i) y el coeficiente de actividad (γ_i) de esa especie (**Ec. 12**). De tal manera que la constante de equilibrio puede expresarse de la siguiente manera.

$$a_i = \gamma_i \times X_i \quad \text{Ec. 12}$$

$$K_e = \frac{\gamma_{\text{éster}} \times \gamma_{\text{agua}}}{\gamma_{\text{alcohol}} \times \gamma_{\text{ácido}}} \times \frac{X_{\text{éster}} \times X_{\text{agua}}}{X_{\text{alcohol}} \times X_{\text{ácido}}} \quad \text{Ec. 13}$$

Si bien la constante de equilibrio es única para cada reacción, independiente del disolvente en el cual se lleve a cabo la reacción, el coeficiente de actividad depende de las interacciones de la especie con el disolvente⁶². De esta manera, además del debido control de la actividad de agua, la elección del medio de reacción apropiado para desplazar el equilibrio hacia la acumulación del producto deseado está en función de los coeficientes de actividad de las especies involucradas en dicho medio. En otras palabras, la selección del medio de reacción es un compromiso entre el coeficiente de actividad de los productos y su concentración o fracción molar al equilibrio. En particular, en la producción de un compuesto de interés, la elección del medio debe estar enfocada a promover la disminución del coeficiente de actividad de dicha especie que entonces repercute en un incremento de la fracción mol de la especie al equilibrio, de manera tal que el valor de actividad termodinámica cumpla con la constante de equilibrio. Por el contrario, para evitar la acumulación de una especie se requiere un disolvente que interaccione pobremente con dicha especie para entonces elevar su coeficiente de actividad tal que la fracción mol al equilibrio sea restringida^{10,63}. En función de lo anterior, y con cierta cautela empírica, se recomienda el uso de disolventes hidrofóbicos como el hexano para la síntesis de productos de baja hidrofiliidad como podrían ser los ésteres con alto contenido de carbonos en la cadena hidrocarbonada¹¹. Por el contrario, en general, para la síntesis de compuestos de carácter hidrofílico como las amidas, se propone el uso de disolventes hidrofílicos como lo son algunos alcoholes terciarios¹². Bajo esta premisa, la manipulación de la naturaleza del medio de reacción implica, además de posibilitar reacciones que en medio acuoso son difíciles de realizar o simplemente no suceden, la eventual manipulación de propiedades selectivas como la quimio-, regio- y enantioselectividad enzimática.

Tomando en cuenta este principio termodinámico, el empleo de disolventes con diferente polaridad como medios de reacción en la acilación de polioles ha resultado en una estrategia que permite controlar el grado de esterificación. En este sentido, se ha reportado que la producción selectiva de mono-, di- ó tri-ésteres del glicerol puede ser manipulada por la polaridad del medio de reacción¹⁰. En particular, ésta aproximación demuestra que al emplear mezclas de 2-metil-2-butanol (2M2B) y *n*-hexano como medios de reacción en la acilación del glicerol por medio de una lipasa, la producción selectiva de mono-ésteres del glicerol se logra en 100% de 2M2B (**Figura 17**). En cambio, la selectividad hacia la producción de mono-ésteres se suprime al llevar a cabo la reacción en el extremo hidrofóbico (*n*-hexano 100%), mientras que la producción de di- y tri-ésteres se favorece. Una aportación relevante de este reporte es la generación de un modelo matemático que permite estimar la acumulación de cada producto de la reacción (mono-, di- y tri-ésteres) en función de la actividad termodinámica del glicerol, estimada a partir del cálculo del coeficiente de actividad termodinámica de dicha especie.

Producción de ésteres del glicerol y ácido oléico

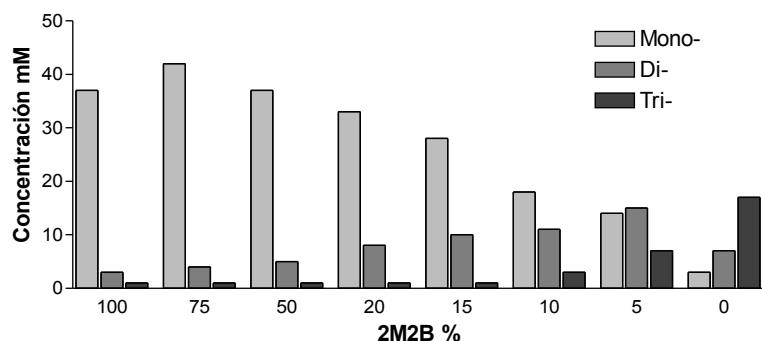


Figura 17. Producción selectiva de mono-, di- y tri-ésteres del glicerol y el ácido oleico en función de la concentración de 2M2B en hexano. Estos datos se tomaron de: Bellot, J.C. (2001) *Enz. Microb. Tech.*, **28**, 362-369.

En este mismo sentido, otra aplicación de este principio se da en la producción selectiva de mono-ésteres del xilitol los cuales sólo se producen mediante el empleo de mezclas de disolventes de alta polaridad ¹¹. En esta estrategia que involucra la ingeniería de disolventes, se diseñaron medios de reacción con distinta polaridad apoyados en la determinación experimental del parámetro de polaridad $E_T(30)$ para varios disolventes y mezclas de ellos. Se encontró que en un medio de carácter hidrofóbico como el *n*-hexano la acumulación preferencia de di- y tri-ésteres del xilitol era favorecida. Por el contrario, en mezclas de disolventes polares como 2M2P ó 2M2B y DMSO se impide la acilación consecutiva del glicerol, y en consecuencia se promueve la acumulación del mono-éster (Figura 18.). Esta dependencia de la acumulación preferencial de los productos en función de la polaridad del disolvente se argumenta en el hecho de haber diseñado un medio de reacción en el cual se produce una diferencia entre los coeficientes de actividad termodinámica de los productos que determina la producción selectiva de los ésteres. En otras palabras, se concluye que el medio polar compuesto por 2M2P y DMSO reduce el coeficiente de actividad del mono-éster y eleva el de los di- y tri-ésteres, de tal manera que se promueve la acumulación al equilibrio del mono-acilado. En cambio, en *n*-hexano, mientras que el coeficiente de actividad del mono-éster es elevado y el de los di- y tri-ésteres son moderados, se favorece la producción de los poli-ésteres

Producción de ésteres del xilitol

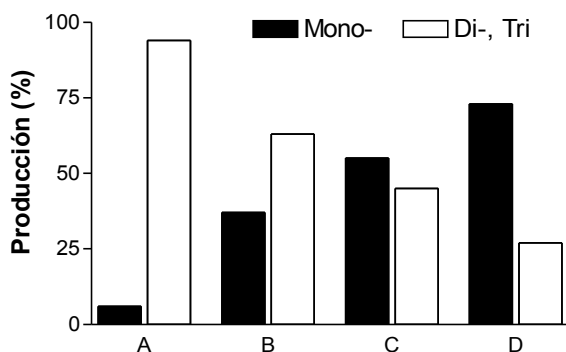


Figura 18. Producción selectiva de mono-, di, y tri-ésteres del xilitol y el ácido oleico en función del disolvente (A) *n*-hexano, (B) 2M2B, (C) 2M2P y (D) 2M2P/DMSO (80:20 v/v). Los datos fueron tomados de: Castillo, E. (2003) *J. Biotech.*, **102**, 251-259.

Un ejemplo de la influencia de la polaridad del medio sobre la acumulación del producto al equilibrio se reporta para la síntesis de la vainillinoleamida y del éster análogo vainillinoleato ¹². Para la síntesis de la amida compuesta por el ácido oleico y la vainillina, se observó que al emplear 2M2B como medio de reacción el rendimiento al equilibrio (98%) es

mucho mayor que el obtenido en *n*-hexano (60%). Inversamente, para la síntesis del éster análogo la producción en *n*-hexano (100%) resultó superior a la obtenida en 2M2B (75%). En este mismo sentido, en la trans-acilación de la capsaicina al vainillinalcohol, se ha demostrado que la producción del éster (capsiato) solo ocurre cuando se emplea *n*-hexano como medio de reacción (**Figura 19.**). De hecho, el rendimiento de la reacción en *n*-hexano es del 33% mientras que en 2M2B la reacción no sucede ⁶⁴.

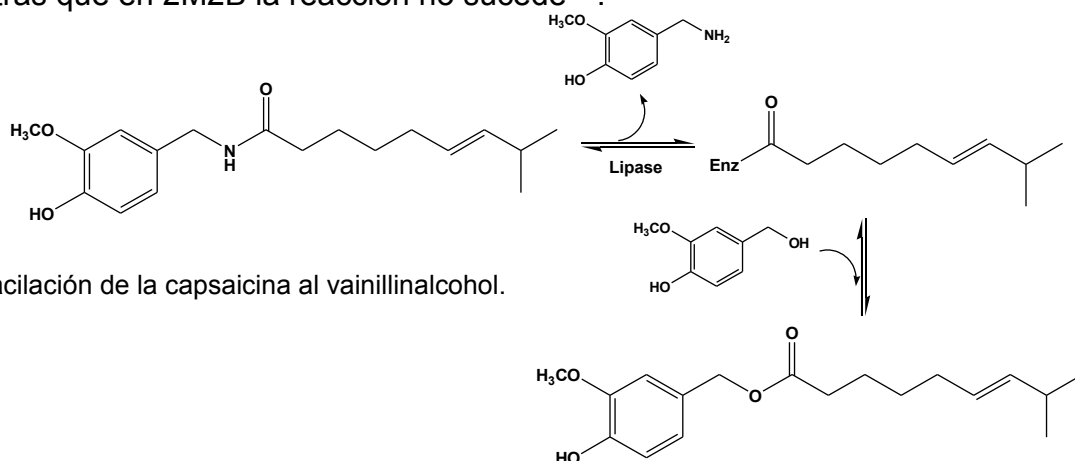


Figura 19. Trans-acilación de la capsaicina al vainillinalcohol.

Estos resultados reflejan una dependencia de la acumulación preferencial de los productos en función de sus coeficientes de actividad termodinámica. Es decir, dado que el enlace amida tienen características polares, la producción de estos compuestos se favorece en medios de reacción polares como el 2M2B en donde por lo general, sus coeficientes de actividad, relativos a los de los ésteres estructuralmente análogos, adquieren valores bajos tal que mediante una compensación por la concentración al equilibrio su actividad termodinámica cumpla con la constante de equilibrio (**Ec. 12 y 13**). En cambio, los ésteres, cuyo enlace es de carácter hidrofóbico, se acumulan con mayor facilidad en *n*-hexano dado que los coeficientes de actividad de los ésteres en este medio, comparados con los de las amidas, son inferiores; y en consecuencia, su acumulación al equilibrio está favorecida.

A6. RESUMEN DE LOS ANTECEDENTES

Las lipasas son una herramienta de amplio espectro catalítico. Sus propiedades estructurales así como el mecanismo catalítico que prosiguen las hacen unas enzimas bastante promiscuas. Esta falta de especificidad resulta una ventaja en la transformación enantioselectiva tanto de ésteres, alcoholes, aminas y tioles. De hecho, la discriminación estereoselectiva de las lipasas ahora esclarece ampliamente sus características moleculares. Fundamentalmente este atributo, intrínseco al catalizador, reside en una estrecha simetría entre el sitio activo y la estructura molecular de la especie a transformar. Por lo general, la manipulación de la enantioselectividad se orienta a la modificación geométrica del sitio catalítico o bien a la manipulación química del sustrato. Por el contrario, la regio- y quimioselectividad son fenómenos descritos pobremente y cabe resaltar, no se asocian a la naturaleza estructural de la enzima, y a pesar de su gran potencial en la química orgánica, las determinantes que permiten su manipulación aún no están bien establecidas. En consecuencia, en provecho de la promiscuidad de las lipasas, empleando ingeniería de disolventes y abordado desde un punto de vista termodinámico, una parte importante de este proyecto revela factores sustanciales que permiten manipular procesos enzimáticos

quimiosselectivos. En particular, el estudio está orientado en la síntesis selectiva de amidas y/o ésteres. Además, de importancia superlativa es la conclusión del proyecto en la que describimos una metodología que permite resolver enantioselectivamente moléculas bifuncionales (amino-alcohol) a las que se incorpora la resolución quimiosselectiva.

HIPÓTESIS

La evidencia experimental que se ha obtenido en los últimos años en nuestro laboratorio nos lleva a formular las siguientes hipótesis. Por un lado, resultados generados en la hidrólisis de la capsaicina por medio de CaL-B confrontan la idea de que las lipasas tienen nula o escasa actividad amidasa. Dado que el mecanismo catalítico para la hidrólisis de amidas es similar a la de los ésteres, el potencial de las lipasas para llevar a cabo esta reacción podría residir en las características estructurales del sustrato. Por otro lado, hemos observado que la acumulación preferencial de ésteres y/o amidas, está íntimamente relacionada con la polaridad del medio. En concreto, suponemos que la manipulación de la quimioselectividad, se debe a un efecto sinérgico entre la polaridad del medio de reacción y los productos, en particular, con los coeficientes de actividad termodinámica de los productos en determinado medio de reacción. En acuerdo con lo anterior se plantean las siguientes hipótesis.

H1. HIPÓTESIS 1

“La actividad amidasa de las lipasas depende de las características estructurales del sustrato”

El mejor desempeño de la actividad catalítica de las enzimas se promueve al satisfacer la estrecha relación que existe entre la estructura molecular del sustrato y el sitio activo de la enzima. Solo amidas con definidas características estructurales fomentan la estabilización del estado de transición en el proceso de hidrólisis de tal manera que así las lipasas pueden adquirir la actividad amidasa. Consecuentemente, al favorecer estas determinantes podrá llevarse a cabo la resolución efectiva de mezclas racémicas de aminas.

H2. HIPÓTESIS 2

“La quimioselectividad es una *propiedad* manipulable”

Se ha observado que el equilibrio termodinámico de una reacción enzimática puede ser dirigido hacia la acumulación del producto con mayor afinidad por el medio. Por ello, se espera que mediante la apropiada elección de la polaridad del medio de reacción, la quimioselectividad pueda ser manipulada hacia la síntesis de amidas o ésteres.

OBJETIVOS

O1. OBJETIVO 1

Analizar las características estructurales del sustrato que son determinantes para la eficiencia de la síntesis de amidas por medio de lipasas.

- Sintetizar una variedad de amidas análogas a la capsaicina en las que se modifique tanto los sustituyentes del anillo vainilloide como la longitud del residuo acilo y caracterizar la catálisis en términos de la velocidad inicial de síntesis y las conversiones al equilibrio.
- Una vez caracterizados los parámetros cinéticos y termodinámicos determinar si el 2M2B es un disolvente propicio para la síntesis de amidas por medio de lipasas.

O2. OBJETIVO 2

Caracterizar la actividad amidasa de la lipasa B de *Candida antarctica* con un conjunto de amidas estructuralmente análogas a la capsaicina.

- Determinar, por medio de velocidades iniciales, las características de los nucleófilos y ácidos carboxílicos que favorecen la hidrólisis de amidas por medio de lipasas.

O3. OBJETIVO 3

Desarrollar una herramienta biocatalítica para la resolución efectiva de una mezcla racémica de aminas.

- Una vez encontradas las determinantes que favorecen la síntesis e hidrólisis de amidas, demostrar que las lipasas son una herramienta útil para la resolución efectiva de aminas.

O4. OBJETIVO 4

Demostrar que la acumulación preferencial de ésteres y/o amidas está relacionada con sus coeficientes de actividad termodinámica, de tal manera que la quimioselectividad pueda ser manipulada a través del control de los coeficientes.

- Realizar los cálculos teórico-cuánticos de los coeficientes de actividad termodinámica de los productos (amidas y ésteres) en medios de reacción de polaridad contraria (2M2B y *n*-hexano).
- Alterar el equilibrio termodinámico en la síntesis de amidas y ésteres mediante el uso de disolventes con distinta polaridad.
- Modificar la acumulación de los productos variando la polaridad de los sustratos.
- Llevar a cabo reacciones de síntesis a distintas temperaturas y cuantificar el efecto en la producción de amidas y ésteres.

SÍNTESIS DE AMIDAS CATALIZADA POR LIPASAS: SELECCIÓN DEL MEDIO DE REACCIÓN APROPIADO

1A. RESUMEN

En esta sección se detalla la síntesis enzimática de una extensa variedad de amidas estructuralmente análogas a la capsaicina (**Figura 1.1**).

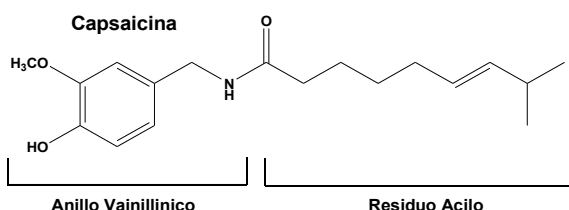
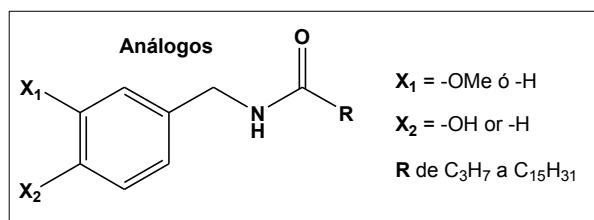
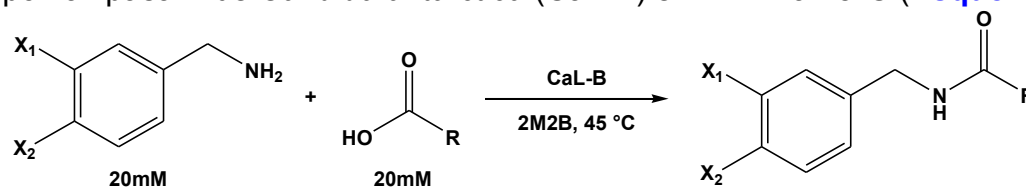


Figura 1.1. Estructura molecular de la capsaicina y análogos.

La producción y variabilidad de los análogos tuvo como objetivo determinar la capacidad termodinámica del 2-metil-2-butanol (2M2B) como medio de reacción para la acumulación de dichos compuestos al equilibrio. Desde un punto de vista termodinámico, se ha observado que con el uso de un disolvente polar como el 2M2B la síntesis de amidas se encuentra favorecida. De hecho, con el uso de este medio de reacción, los rendimientos en la producción de amidas fueron superiores que los obtenidos con el empleo de medios reacción hidrofóbicos como el *n*-hexano. Un aporte adicional de esta sección radica en la obtención de moléculas artificiales con actividad pungente. La variedad de análogos permitió identificar algunas características estructurales determinantes en dicha actividad. En función de todo lo anterior, el modelo de estudio contempló la síntesis de 16 capsaicinoides análogos en los que se incluyeron tanto modificaciones estructurales en la longitud del residuo acilo así como variaciones en los sustituyentes del anillo bencílico. Todas las reacciones fueron catalizadas por la lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B) en 2M2B a 45°C (**Esquema 1.1**).



Esquema 1.1 Síntesis de capsaicinoides análogos. Los compuestos están constituidos por diferentes longitudes del residuo acilo y por variaciones en las sustituciones del anillo.

Se presenta un análisis detallado sobre la influencia del residuo acilo y del anillo en la acumulación al equilibrio de estas amidas. Se encontró que la longitud del residuo acilo no influye en la velocidad inicial de síntesis. Sin embargo, esta velocidad si se encuentra influenciada por los sustituyentes del anillo vainilloide. En particular, la velocidad de síntesis disminuye en la medida en que aumenta la cantidad de grupos en el anillo. De hecho, la velocidad de síntesis de las amidas bencílicas ($13.00\mu\text{mol mgE}^{-1} \text{ min}^{-1}$) es mayor que para las amidas 3-metoxi-sustituidas ($7.70\mu\text{mol mgE}^{-1} \text{ min}^{-1}$), y a su vez que las 3-metoxi-4-hidroxi-sustituidas ($2.38\mu\text{mol mgE}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Por otro lado, en términos del equilibrio de la reacción, se observó que independientemente del ácido carboxílico y de la naturaleza del anillo, en todos los casos, se obtienen altas conversiones de sustrato (de 89 a 95% al cabo de 48h). Se concluye que, de acuerdo a la polaridad de las amidas, un disolvente polar y prótico como el 2M2B es un medio propicio para la acumulación de estos compuestos.

Otra de las contribuciones importantes de este capítulo radica en la obtención de dos moléculas artificiales con actividad pungente. De todos los análogos sintetizados se encontraron dos compuestos con actividad pungente de 65 y 40%, relativa a la actividad de la capsaicina.

. A partir de los resultados de esta sección se publicó el artículo:

Castillo E., **Torres-Gavilán A.**, Severiano P., Navarro A., López-Munguía A.

Lipase-catalized synthesis of pungent capsaicin analogues. Food Chemistry 100 (2007) 1202-1208. (**ANEXO 1**)

1B. INTRODUCCIÓN

La importancia del enlace amida radica en la alta estabilidad química que confiere a las moléculas que lo contienen. Este grupo funcional está presente en una amplia gama de moléculas de diversa aplicación; en particular, se encuentra presente en una extensa variedad de fármacos, de los cuales el 50% corresponde a fármacos sintéticos, el 10% a fármacos de origen natural (descartando los proteicos) y el 40% a fármacos en desarrollo ⁶.

Un grupo de amidas de interés particular para la industria de alimentos son una familia de compuestos conocidos como capsaicinoides. Estos compuestos son los responsables del efecto pungente en los chiles ⁶⁵. De esta familia, la capsaicina (*trans*-8-metil-N-vainillin-6-nonenamida) es la molécula natural más pungente (**Figura 1.2.**). Se han identificado tres motivos estructurales que confieren la actividad pungente a estos compuestos: el enlace amida, el residuo acilo y un anillo vainilloide ⁶⁶. Además, a estas amidas se les atribuyen diversas actividades farmacológicas dentro de las cuales destacan la capacidad para estimular el sistema respiratorio, cardiovascular y digestivo ⁶⁷ y se aplican como promotores del metabolismo energético. Más aún, también son moléculas con actividad anti-inflamatoria y bloqueadores de la transmisión del dolor ⁶⁸; sin embargo, esta aplicación farmacológica está limitada debido a la irritación que ocasionan al contacto con la piel. En este sentido, la búsqueda de capsaicinoides análogos con esta propiedad farmacológica, con los efectos adversos suprimidos, resulta por demás atractiva ⁶⁹.

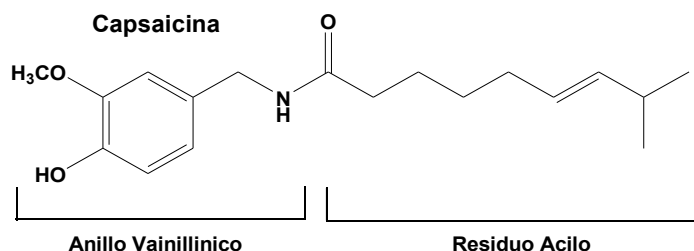


Figura 1.2. Molécula de capsaicina en donde se muestran tres componentes estructurales a los cuales se les ha atribuido la actividad pungente, el anillo vainilloide, el enlace amida y el residuo acilo insaturado no lineal.

En la producción de capsaicinoides análogos se ha recurrido a la síntesis química tradicional. Químicamente las amidas se obtienen mediante la reacción entre amoníaco o aminas y cloruros o anhídridos de ácidos. De manera industrial suelen prepararse por calentamiento de las sales de amonio de ácidos carboxílicos. El procedimiento químico se conoce como reacción de Schotten-Baumann. Cabe mencionar que el éxito de estos métodos para la producción de capsaicinoides es limitado debido a las características tóxicas de los reactivos utilizados en la condensación del agente acilante. Más aún, la producción de estas amidas requiere de la protección y desprotección de grupos susceptibles a la acilación, en este caso, el hidroxilo del anillo aromático de la amina. Una alternativa reciente para la producción de amidas es la síntesis enzimática. En este procedimiento se han utilizado varias enzimas hidrolíticas como por ejemplo amidasas y proteasas ^{70,53,55}. Sin embargo, el empleo de estas enzimas presenta algunas desventajas entre las que destaca la poca estabilidad de estos biocatalizadores en medios orgánicos. Además, la capacidad catalítica de estas enzimas se restringe a un estrecho número de sustratos, particularmente aminoácidos y derivados. Una herramienta enzimática ejemplar para la producción de amidas son las lipasas. Un número importante de lipasas han sido utilizadas para la formación de amidas ⁷¹. Como consecuencia, la producción y exploración de las propiedades de capsaicinoides análogos

han encontrado en las lipasas una herramienta catalítica conveniente. Para la síntesis de capsaicinoides por medio de lipasas se han propuesto varias estrategias. Dentro de estas metodologías se ha reportado la condensación de la vainillinamina y distintos ácidos grasos empleando buffer de fosfatos como modelo de reacción ⁷². Como era de esperarse, en estos ensayos el mejor desempeño enzimático se produjo con la lipasa B de *C. antarctica* (CaL-B); sin embargo, al cabo de 72h de reacción los rendimientos son bajos (40 – 59%), debido a la alta concentración de agua en el medio de reacción. Otro proceso para la producción de estos análogos, también catalizado por CaL-B, describe la transacilación de la capsaicina con varios aceites de origen natural tales como el aceite de oliva y girasol, en dos medio de reacción distintos, *n*-hexano y CO₂ supercrítico ^{73,74}. En estas reacciones, la producción de los capsaicinoides no excede el 85% de conversión en *n*-hexano al cabo de 144h y de 54% en CO₂ después de 72h de transcurrida la reacción. Estos antecedentes sugieren que los bajos rendimientos están influenciados por la baja solubilidad de las amidas en estos medios de reacción. Por otro lado, se ha demostrado que en la producción del olvanil (**Figura 1.3.**), los rendimientos en 2-metil-2-butanol (2M2B, 98%) son mucho mayores que en *n*-hexano (60%) ¹². De hecho, este incremento es atribuido a una mayor solubilidad del producto en 2M2B. Más aún, se propone que las diferencias entre ambos rendimientos derivan de un menor coeficiente de actividad termodinámico del producto en 2M2B; y en consecuencia, la acumulación de la amida se favorece en este disolvente polar. Por el contrario, en la síntesis del oleato de vainillilo (éster análogo al olvanil, de carácter hidrofóbico), la producción está favorecida en *n*-hexano (100%) y no así en 2M2B (75%). Es decir que, de acuerdo a las características hidrofóbicas del enlace ester, el coeficiente de actividad de este producto es menor en *n*-hexano que en 2M2B y por ello, la producción al equilibrio es mayor en el disolvente hidrofóbico.

Es pertinente resaltar que este fenómeno termodinámico también se ha reportado para la síntesis preferencial de ésteres de polioles ¹⁰, en donde la producción regioselectiva de mono-, di- y tri-ésteres del xilitol está sumamente relacionada con la polaridad del medio de reacción. De hecho, el rendimiento en la producción selectiva de mono-ésteres sólo se obtiene en un medio de reacción polar compuesto por 2M2B y 20% de DMSO (37%), mientras que en un medio de reacción hidrofóbico como el *n*-hexano la síntesis de tri-ésteres es total (94%) ¹¹.

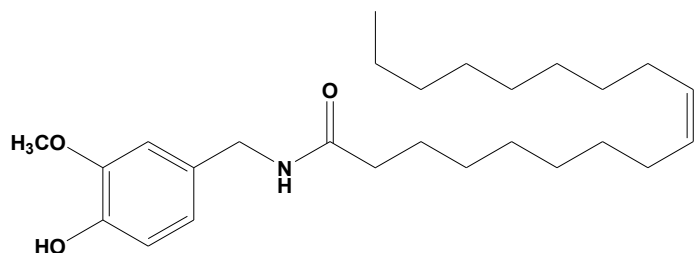
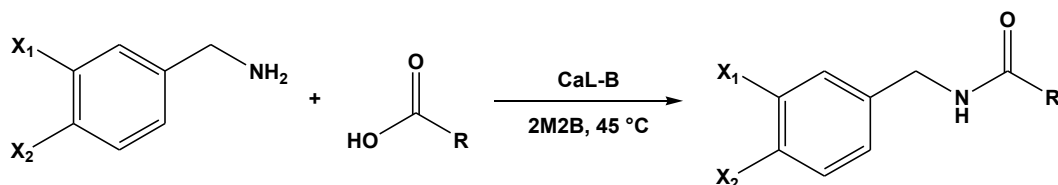


Figura 1.3. Estructura molecular del olvanil. Capsaicinoide análogo formado por la vainillinamina y el ácido oleico.

Bajo estas observaciones, esta sección del proyecto aborda el estudio de las características estructurales de las amidas que favorecen su acumulación en 2M2B. Para ello, tomando la estructura molecular de la capsaicina como modelo, se llevó a cabo la síntesis enzimática de una amplia variedad de capsaicinoides análogos en los que se varió tanto el tamaño de la cadena hidrocarbonada como los sustituyentes del anillo bencílico. Las reacciones se catalizaron por medio de CaL-B en 2M2B a 45°C (**Figura 1.4.**). Aunado a ello se realizaron

pruebas sensoriales para identificar capsaicinoides análogos artificiales con actividad pungente. Para lo que se entrenó a un panel de 15 jueces capaces de percibir esta sensación en concentraciones de capsaicina hasta de 0.056ppm.



Compuesto	X ₁	X ₂	Compuesto	R
1	MeO-	HO-	a	-C ₃ H ₇
2	MeO-	H-	b	-C ₅ H ₁₁
3	H-	H-	c	-C ₇ H ₁₅
			d	-C ₉ H ₁₉
			e	-C ₁₁ H ₂₃
			f	-C ₁₃ H ₂₇
			g	-C ₁₅ H ₃₁
			h	-(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃

Figura 1.4. Estructuras moleculares de los capsaicinoides análogos en los que se utilizaron aminas con diferentes sustituciones en el anillo aromático así como ácidos carboxílicos lineares saturados con distinto número de carbonos (salvo h).

1C. MATERIALES Y MÉTODOS

1C.1. MATERIALES

El 2-metil-2-butanol (99.7%) se obtuvo de J.T. Baker (Edo. de México, México), el metanol y acetonitrilo (grado HPLC) se obtuvieron de Burdick & Jackson (TECROM, México). El clorhidrato de vainillina (Vainillina-HCl, 98%), la 3-metoxibencilamina (98%), el ácido decanoico (99%), etil butirato (99%), etil caprilato (99%) así como el tamiz molecular (8-12 mesh) se adquirieron de Aldrich (WI, USA). La capsaicina (98% y 60%), el ácido oleico (98%), mirístico (99-100%), laúrico (99%), palmítico (99%), metil caproato (99%), la N,N-diisopropiletilamina (DIPEA, 99%) y bencilamina (99%) fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (MO, USA). La lipasa B de *Candida antarctica* (Novozym 435), se obtuvo de Novozymes A/C (México).

1C.2. REACCIONES ENZIMÁTICAS

Todas las reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de 45°C con agitación magnética controlada. Los análogos de capsaicina se sintetizaron por medio de la lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B, Novozym 435, 20mg ml⁻¹) en 5ml de 2-metil-2-butanol (2M2B) previamente deshidratado con tamiz molecular a una concentración equimolar de sustratos (20mM). En la síntesis de las vainillilamidas (1) se incubó la amina con DIPEA por 30min, para liberar el clorhidrato, seguida de la adición del ácido carboxílico. La relación entre DIPEA y el clorhidrato de vainillina fue de 18:1 en acuerdo a un reporte previo¹². En la síntesis de las 3-metoxibencilamidas (2) y bencilamidas (3) los sustratos y la enzima se agregaron simultáneamente. Con el propósito de controlar la actividad de agua en el medio de reacción se agregan 20mgml⁻¹ de tamiz molecular.

1C.3. ANÁLISIS POR HPLC

Las muestras se centrifugaron a 1,600g durante 5min para precipitar el tamiz molecular y la enzima inmovilizada y posteriormente se analizaron los productos por HPLC. Para este análisis se utilizó un equipo de cromatografía Waters con detector de arreglo de diodos (PDA, Photo Diode Array). Las reacciones se cuantificaron mediante la desaparición de la amina. Para la detección de la vainillinamina se utilizó una columna Spherisorb 80-5 ODS-2 (4.6 x 250mm) con una fase de elución 50:50 v/v metanol:H₂O. Para la separación de la bencilamina se empleó una columna Supelcosil C18 (3.9 x 300mm) con una fase compuesta por 85:15 v/v metanol:H₂O. La 3-metoxibencilamina se separó en una columna Waters Spherisorb ODS-2 5mm con una fase móvil compuesta por 70:30 acetonitrilo:H₂O. En todos los casos, el flujo de la fase es de 1mlmin⁻¹.

1C.4. PURIFICACIÓN

Para la recuperación de los productos se desarrolló un método de purificación que consta de un primer paso en el que se separan la enzima y el tamiz molecular por una centrifugación a 10,000 rpm por 12 min, proseguida de la evaporación del disolvente (2M2B) en un rotavapor Büchi 461 (85 °C, 100 rpm, -60 Pa). Evaporado todo el disolvente, mediante extracciones en 1.5ml de *n*-hexano se induce la solubilización del ácido residual y la precipitación de la amida y amina, que son prácticamente insolubles en este disolvente. Para la separación de la amida y la amina residual, se resuspende la mezcla en 1.5ml de agua para promover la solubilización de la amina. Las estructuras de las amidas recuperadas se identificaron por espectrometría de masas y por resonancia magnética nuclear ¹³C y ¹H (**ANEXO 1**).

1C.5. ANÁLISIS SENSORIAL

Para evaluar la pungencia de los capsaicinoides sintetizados se trabajó en el entrenamiento de un panel constituido por 15 jueces. Dicho proceso consistió en la evaluación de muestras de capsaicina. Se prepararon soluciones alcohólicas de capsaicina al 97% a concentraciones entre 0 y 0.2 ppm. A la concentración umbral de cada juez se asignó un valor de 10 y a partir de entonces se cuantificó la pungencia relativa de los capsaicinoides artificiales mediante una prueba de magnitudes y proporciones. Las muestras se presentaron de manera ascendente y codificadas con tres dígitos. Después de cada muestra se procedió con un enjuague de agua y 2 galletas habaneras.

1C.6. PRUEBA DE MAGNITUDES Y PROPORCIONES

La muestra de referencia fue una solución de capsaicina a la concentración umbral del grupo de jueces. La evaluación de los capsaicinoides artificiales se llevó a cabo en tres sesiones. Se prepararon soluciones de los 10 capsaicinoides artificiales a distintas concentraciones y se evaluó el grado de pungencia con respecto a la referencia. Las muestras se presentaron de manera completamente aleatoria y codificadas con tres dígitos. Se utilizó agua y 2 galletas habaneras como enjuague. Los datos se analizaron mediante un análisis de variancia (ANOVA). La relevancia de cada valor estadístico se calculó a un nivel de $\alpha = 0.05$ utilizando la prueba F-test. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa Statgraphic Plus for Windows Computer Package (1995 Manugistics Inc., Rockville, MD).

1D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1D.1. IMPORTANCIA DEL RESIDUO ACILO EN LA SÍNTESIS DE CAPSAICINOIDES

Para este análisis se llevó a cabo la acilación de la vainillinamina con distintos ácidos carboxílicos (**1a-g** [Figura 1.4.](#)) por medio de CaL-B en 2M2B a 45°C. En todos los casos 48h fueron suficientes para alcanzar el equilibrio. Para la reacciones en la que se parte de ácidos grasos libres las conversiones son mayores a 90% (**1d-g**). Cuando se emplean donadores de acilo esterificados el grado de conversión reduce, para los donadores metil- y etil-ester se obtienen conversiones de 83 (**1a**) y 87% (**1c**), respectivamente ([Figura 1.5.](#)). Estos resultados están en acuerdo con observaciones previas en donde se favorece la acumulación de amidas en 2M2B¹². De hecho, al emplear 2M2B como medio de reacción, a pesar de encontrarse a una temperatura inferior (45°C), se obtienen conversiones superiores que en *n*-hexano a 70°C⁷³. En términos de la cinética de la reacción, se observó que las velocidades iniciales de reacción son similares en todos los casos, lo que sugiere que para esta familia de compuestos sintetizados en 2M2B, la velocidad de síntesis es independiente de la naturaleza y longitud del residuo acilo.

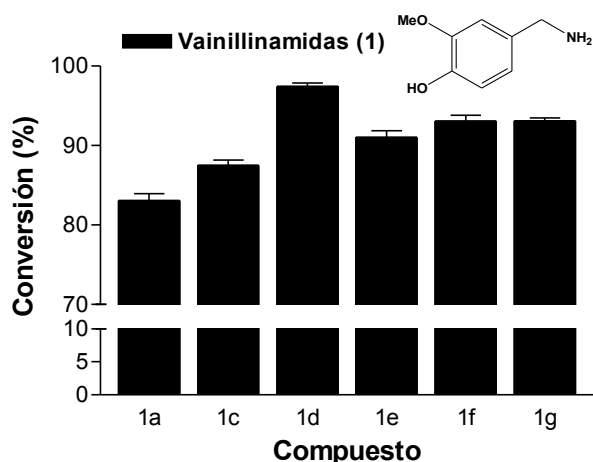


Figura 1.5. Conversiones al equilibrio en la síntesis de vainillilamidas. La nomenclatura de los compuestos corresponde a las claves de la [Figura 1.4.](#)

1D.2. IMPORTANCIA DE LOS SUSTITUYENTES EN EL ANILLO DE LA AMINA

Con el fin de determinar la capacidad termodinámica del 2M2B como medio propicio para la producción de amidas, se llevó a cabo la síntesis de varias amidas a partir de nucleófilos con diferencias en la estructura del anillo y distintos ácidos carboxílicos (**2c-f** y **3b-f** [Figura 1.4.](#)). Las reacciones fueron catalizadas por CaL-B (20mg ml⁻¹) en 2M2B a 45°C. Al igual que en los ejemplos anteriores, en la síntesis de estas amidas se observó que el equilibrio se alcanza al cabo de 48h de transcurrida la reacción. En general, las conversiones de estos análogos resultaron mayores al 90%. Esto confirma, al igual que en la síntesis de las vainillinamidas (**1**), que el uso de un disolvente polar como el 2M2B favorece la acumulación de las amidas al equilibrio. Incluso se puede corroborar que los altos índices de conversión al equilibrio son independientes de la longitud del residuo acilo y de la naturaleza del anillo aromático dado que en todos los casos se obtiene conversiones cercanas al 90% ([Figura 1.6.](#)).

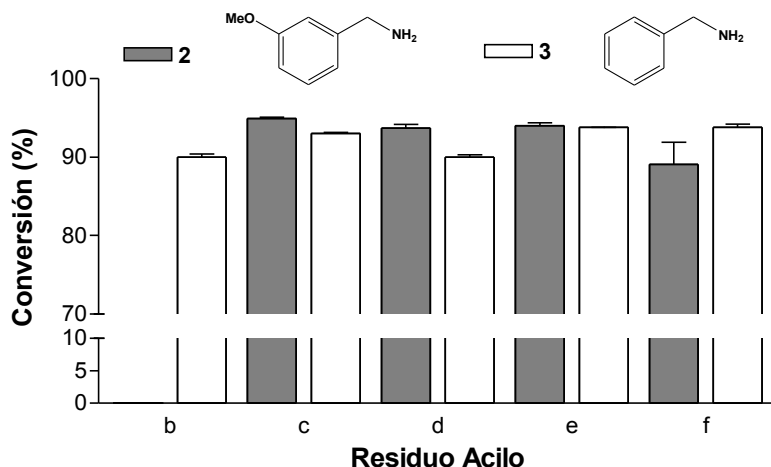


Figura 1.6. Conversiones al equilibrio en la síntesis de las 3-metoxi- y bencilamidas. La nomenclatura de los ácidos refiere a la [Figura 1.4](#).

Por otro lado, al comparar las velocidades iniciales de reacción de estas amidas se observa que, si bien éstas son independientes de la naturaleza del donador de acilo, existe una clara influencia por las características estructurales de las aminas ([Figura 1.7](#)). De hecho, las velocidades de síntesis de las bencilamidas (**3**), cuyo nucleófilo carece de sustituciones, son mayores que cualquiera de las otras amidas (**1** y **2**). En este sentido, se puede concluir que la velocidad de reacción disminuye al incluir sustituyentes en el anillo del nucleófilo y en consecuencia, la síntesis de las amidas bencilicas (**3**) son más rápidas que las 3-metoxibencilamidas (**2**) y a su vez que las vainillinamidas (**1**). Este efecto ha sido previamente reportado por otros autores que proponen una estrecha relación entre la actividad de las lipasas y las sustituciones en anillos aromáticos, principalmente debido a impedimentos estéricos generados por la naturaleza, posición y número de sustituyentes en el anillo^{75,5}. En nuestro caso observamos que introducir sustituciones en el anillo aromático de las aminas repercute de manera proporcional a la velocidad inicial de síntesis de los capsaicinoides análogos; sin embargo, es importante precisar que ello no influye de manera significativa en las conversiones al equilibrio.

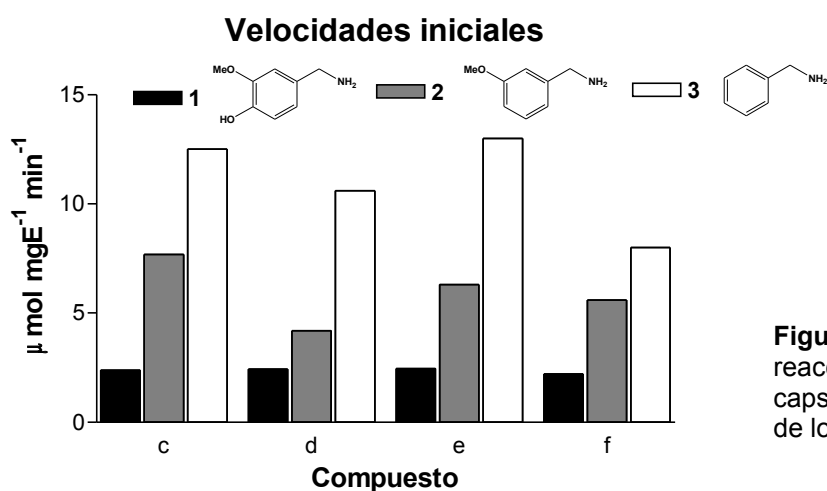


Figura 1.7. Velocidades iniciales de reacción en la síntesis de los capsaicinoides análogos. La nomenclatura de los ácidos refiere a la [Figura 1.4](#).

1D.3. ANÁLISIS SENSORIAL DE PUNGENCIA RELATIVA

Para elegir la concentración de los capsaicinoides artificiales con la que se trabajaría en la evaluación de pungencia, se llevó a cabo un ensayo en el que se estableció el umbral de pungencia del panel de jueces. Esta prueba se realizó a diferentes concentraciones de capsaicina y se estableció que a una concentración de 0.056ppm 50% del panel detectó la sensación pungente. Una vez establecido este umbral, se evaluó por medio de una prueba de magnitudes y proporciones la pungencia relativa de diferentes análogos sintetizados enzimáticamente dentro de los cuales se encuentran 8 derivados de la vainillinamina (**1a-h**), uno de la 3-metoxibencilamina (**2c**) y uno correspondiente a la bencilamina (**3c**). Las muestras de estos análogos se prepararon a 1.12ppm, concentración 20 veces mayor al umbral de capsaicina. En la mayoría, la pungencia relativa fue indetectable, salvo para dos muestras (**1c** y **1d**). La pungencia relativa de estos análogos fue del 66 (**1c**) y 36% (**1d**), con respecto a la capsaicina (**Figura 1.8**). Con el objetivo de detectar un mayor número de compuestos con actividad pungente se incrementó la concentración de los análogos a 2.4ppm. En correlación con lo anterior, se encontró que la pungencia relativa de los análogos **1c** y **2d** incrementó 2 veces; sin embargo, la sensación fue indetectable para el resto de las muestras. Con estas muestras sin actividad pungente, sólo fue posible causar dicha sensación en el panel cuando la concentración de las amidas se incrementó hasta 28ppm. En este caso se observó que los análogos **1b** y **1e** exhibían valores relativos de 1.2 y 2.1%, respectivamente.

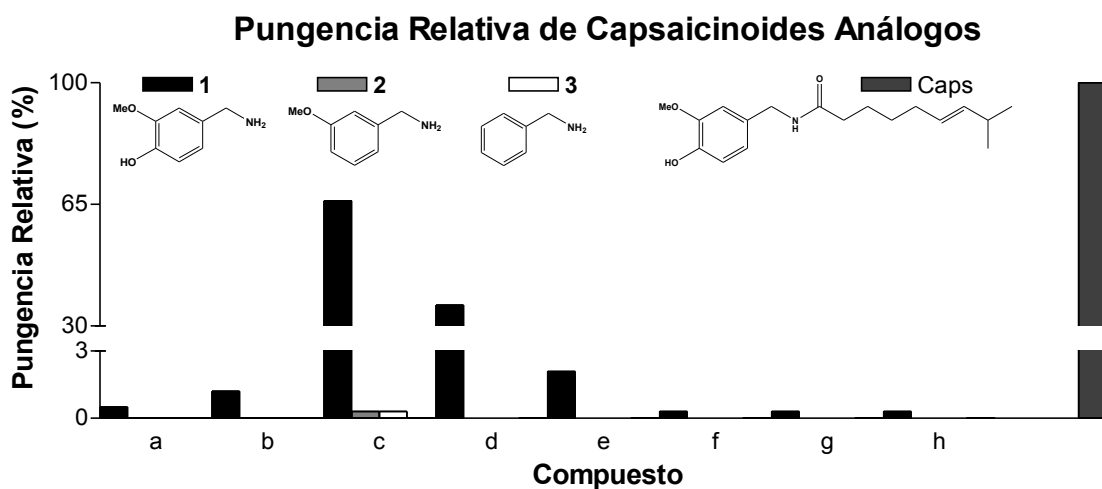


Figura 1.8. Pungencia relativa de los capsaicinoides análogos referida a la capsaicina a concentraciones de 1.12ppm. Estadísticamente la pungencia relativa de estos resultados es significativamente diferente a un nivel de confianza del 95.0%. Los resultados representan el valor medio de los 15 jueces (en todos los casos, la variación de los coeficientes es menor al 15%).

1E. CONCLUSIONES

La mayor parte de los trabajos avocados a la síntesis de amidas centran su atención en la naturaleza del grupo acilo y pocos se refieren a un estudio global en donde se considera la importancia de los sustituyentes o naturaleza química del agente nucleofílico. En este trabajo, dado que el objetivo es determinar la capacidad del 2M2B para acumular amidas al equilibrio, se variaron las características estructurales de los productos mediante la

condensación de ácidos carboxílicos de distinta longitud con aminas aromáticas con diferente grado de sustitución en el anillo bencílico. En todas las reacciones de síntesis presentadas destacan las altas conversiones de las aminas obtenidas al equilibrio (~90%). Esto permite suponer que desde un punto de vista termodinámico, el efecto predominante en la producción de amidas corresponde a la naturaleza del disolvente, y que este hecho, es independiente de la naturaleza de los sustratos que intervienen en el proceso (residuo acilo y anillo aromático). Es decir que, el uso de un disolvente polar como el alcohol terciario empleado, favorece la producción de amidas al equilibrio. Más aún, esto sugiere que, al equilibrio, la acumulación preferencial de estos compuestos es independiente de las características estructurales de los productos. En un fenómeno similar al que se observa en la síntesis selectiva de ésteres del xilitol ¹¹, proponemos que las altas conversiones obtenidas en la producción de los capsaicinoides análogos corresponden a un efecto termodinámico en el que existe una estrecha relación entre la polaridad del medio y el enlace que se forma. Por otro lado, observamos que la velocidad de síntesis no está influenciada por la longitud del residuo acilo; sin embargo, se obtienen diferencias significativas en función del número de sustituciones en el anillo aromático del nucleófilo. Esto, al parecer se debe a que las sustituciones en el anillo generan impedimentos estéricos entre los sustratos y el sitio activo de la enzima, originando detrimentos en la actividad de la lipasa.

En términos de la evaluación sensorial de los capsaicinoides artificiales se observó que el método propuesto para evaluar la pungencia relativa resulta útil para correlacionar el efecto pungente con las características estructurales de las moléculas que lo determinan ⁷⁶. De hecho, los análogos estructuralmente más cercanos a la capsaicina son aquellas vainillinamidas con residuos acilo de C_8 (**1c**) y C_{10} (**1d**) carbonos, mismos que exhiben el mayor valor de pungencia relativa. Incluso, el análogo **1c** tiene un nivel de pungencia similar al de la Norhidrocapsaicina (capsaicinoide natural). Por otro lado, una drástica pérdida de actividad pungente se observa al incrementar o reducir el residuo acilo a C_6 (**1b**) y C_{12} (**1e**) carbonos. En este mismo sentido, reducir el número de sustituciones en el anillo vainilloide elimina totalmente la actividad pungente de los análogos. Tal es el caso de moléculas que a pesar de contar con un residuo acilo de 8 carbonos, perdieron el poder pungente dado que el anillo aromático carece de una (**2c**) ó ambas sustituciones (**3c**). Es importante resaltar que mediante el uso de una herramienta enzimática se sintetizaron dos compuestos con valores de pungencia relativa similar a la mayoría de los capsaicinoides naturales (**Figura 1.9.**).

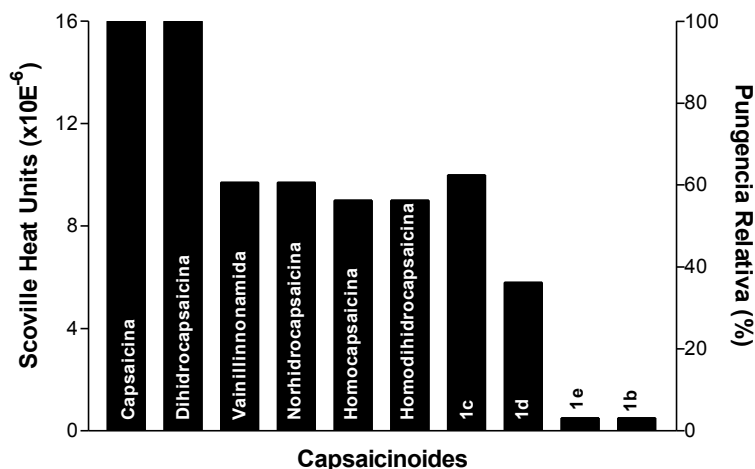
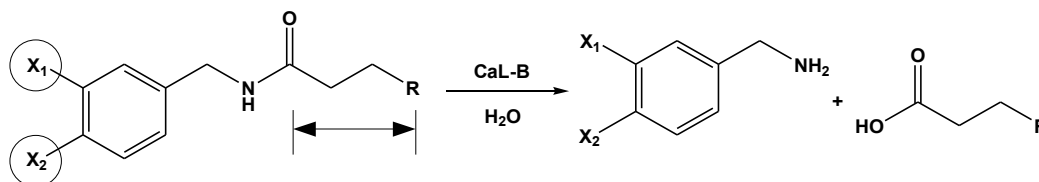


Figura 1.9. Valores de pungencia relativa y Unidades Scoville (Scoville Heat Units SHU) de capsaicinoides naturales y análogos. Las unidades Scoville para los capsaicinoides naturales se obtuvieron de la literatura y para los análogos (**1b-e**) se estimaron en función de los resultados obtenidos en el análisis sensorial.

HIDRÓLISIS DE AMIDAS CATALIZADA POR LIPASAS

2A. RESUMEN

En este capítulo del proyecto se presentan los resultados del estudio de los factores estructurales de las amidas que promueven la actividad amidasa de la lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B). El objetivo de este estudio fue, una vez determinadas las condiciones de síntesis, desarrollar las condiciones para la hidrólisis de amidas y así tener un sistema de resolución efectiva de aminas. Para ello, se sometieron a hidrólisis 15 amidas con una arquitectura molecular compuesta por residuos acilo lineares saturados con distinto número de carbonos (C_4 - C_{16}) y por anillos aromáticos con diferentes sustituyentes (**Esquema 2.1.**).



Esquema 2.1. Estrategia empleada en el estudio de la hidrólisis de amidas por medio de CaL-B. La estructura de las amidas comprende variaciones en el anillo aromático y de ácidos carboxílicos de distinta longitud.

Se encontró que la velocidad inicial de hidrólisis de amidas por medio de CaL-B está relacionada con las características estructurales del sustrato. En términos de la longitud del residuo acilo se observó una mayor velocidad inicial de hidrólisis para amidas con cadenas de 10 átomos de carbono (C_{10}). Por otro lado, también se demostró que a menor número de sustituyentes en el anillo aromático se obtienen mayores velocidades iniciales de hidrólisis. Por consiguiente, las bencilamidas se hidrolizan más rápido que las 3-metoxi- y estas a su vez más rápido que las 3-metoxi-4-hidroxi-sustituidas. La amida formada por un anillo bencílico y un residuo acilo C_{10} se hidroliza 5 veces más rápido que la vainillinamida con el mismo ácido. Un caso particular resultó la hidrólisis de la capsaicina (**Figura 2.1.**), pues pese a presentar un anillo aromático doble sustituido se hidrolizó más rápido que la bencilamida C_{10} ¹³.

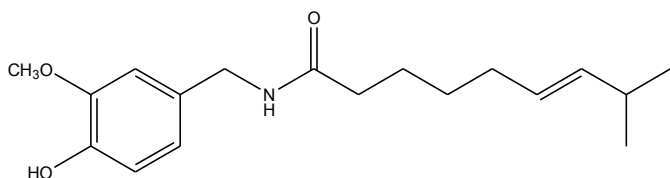


Figura 2.1. Estructura molecular de la capsaicina.

Por tal motivo, se sintetizó, purificó e hidrolizó una amida constituida por la bencilamina y el ácido no-lineal insaturado de la capsaicina (ácido 8-metil-6-nonanoico). En la hidrólisis de la amida compuesta por estos motivos estructurales se obtuvo una velocidad inicial de reacción 4 veces mayor a la observada con capsaicina. En resumen, a pesar de la idea generalizada de que las lipasas tienen nula o escasa actividad amidasa de las lipasas, con estos resultados mostramos que la capacidad de CaL-B para hidrolizar amidas puede ser modulada mediante la modificación de las características estructurales de los sustratos.

. A partir de los resultados de esta sección se publicó el artículo:

Torres-Gavilán A., Castillo E., López-Munguía A.

The amidase activity of Candida antarctica lipase B is dependent on specific structural features of the substrates. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 41 (2006) 136-140. (**ANEXO 2**)

2B. INTRODUCCIÓN

La baja reactividad del enlace amida resulta ventajosa en la estabilización de diferentes moléculas tales como las proteínas. Sin embargo, cuando se requiere la obtención de aminas a partir de la hidrólisis de amidas la tarea se vuelve complicada. En efecto, para lograr este objetivo específico, generalmente se recurre a la hidrólisis química, proceso que cabe resaltar como poco selectivo, agresivo y de bajos rendimientos ²¹. Químicamente, la hidrólisis de amidas es una reacción poco favorable debido a la resonancia que genera el átomo de nitrógeno con el grupo carbonilo vecinal, esto provoca una disminución en el dipolo parcial del carbonilo y en consecuencia la sustitución nucleofílica se dificulta. La hidrólisis química de amidas puede ocurrir a condiciones ácidas ($\text{pH} < 2$) o alcalinas ($\text{pH} > 11$); en ambos casos se requiere de temperaturas elevadas para que la reacción se lleve a cabo totalmente ($T > 100^\circ\text{C}$) ⁷⁷. La hidrólisis ácida consiste en una primera etapa de protonación del oxígeno del carbonilo de la que prosigue un ataque nucleofílico del agua ^{78,79}. En cambio, en la hidrólisis a condiciones alcalinas, la reacción consiste de un ataque nucleofílico del ion hidroxilo directo al carbonilo de la amida ⁸⁰. En ambas condiciones el ataque nucleofílico es el paso limitante de la reacción (**Figura 2.2.**).

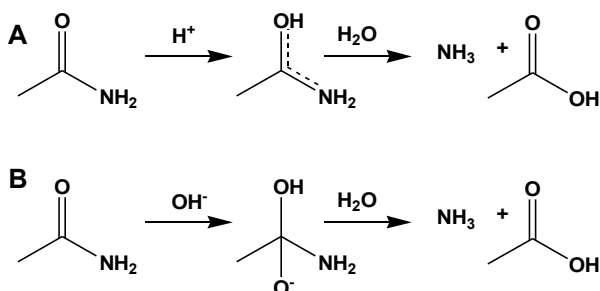


Figura 2.2. **A** Hidrólisis de amidas a condiciones ácidas y **B** a condiciones alcalinas.

Una alternativa interesante a los procesos químicos resulta el empleo de biocatalizadores para la hidrólisis de amidas que permita llevar a cabo la reacción a condiciones moderadas. Para tal efecto se han utilizado algunas enzimas hidrolíticas dentro de las que destacan proteasas y amidasas. Si bien estas enzimas transforman de manera eficiente cierto tipo de sustratos, presentan como principal desventaja el estrecho perfil de sustratos que reconocen. En efecto, la actividad hidrolítica de estos biocatalizadores se restringe a un reducido número de sustratos con características estructurales muy específicas. Así, las proteasas se limitan a la hidrólisis de enlaces peptídicos entre los aminoácidos más comunes por lo que su aplicación se resume a la hidrólisis de amidas con estructuras similares. Por otro lado, se ha demostrado que la actividad hidrolítica de algunas penicilin-amidasas es una herramienta útil para la degradación de amidas; aunque dicha catálisis está determinada para sustratos constituidos por la (*R*)-fenilglicina o el ácido fenilacético ⁵⁵. Una alternativa recientemente reportada para la hidrólisis de amidas es el uso de lipasas. Si bien el potencial de aplicación para estas enzimas es interesante para un abanico muy amplio de sustratos con diversas estructuras ¹⁹, a estas enzimas generalmente se les ha atribuido nula o escasa actividad amidasa ^{21,54,55}. En realidad, dada la similitud entre los enlaces ester y amida y más aún, de acuerdo al mecanismo catalítico que prosiguen las lipasas, la factibilidad de que estas enzimas adquieran actividad amidasa resulta razonable. En la literatura se encuentran escasos trabajos en los que se reporta la hidrólisis de amidas por medio de lipasas, en todos ellos, el común denominador que promueve la actividad amidasa de las lipasas está relacionado a una actividad dependiente de la estructura de los sustratos.

Los primeros trabajos reportados para la hidrólisis de amidas por medio de lipasas mencionan el uso de extractos enzimáticos del hígado de ratas, enriquecidos en lipasas y esterasas capaces de hidrolizar a la capsaicina⁸¹. Posteriormente se demostró que dicha amida puede ser hidrolizada por la lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B)¹³. El razonamiento de la actividad amidasa de CaL-B propone que la formación del complejo acil-lipasa (característico del mecanismo de las serin-hidrolasas) se ve favorecido por la naturaleza del residuo acilo (C9:6) de la capsaicina, que facilita el ataque nucleofílico del agua (Figura 2.3.).

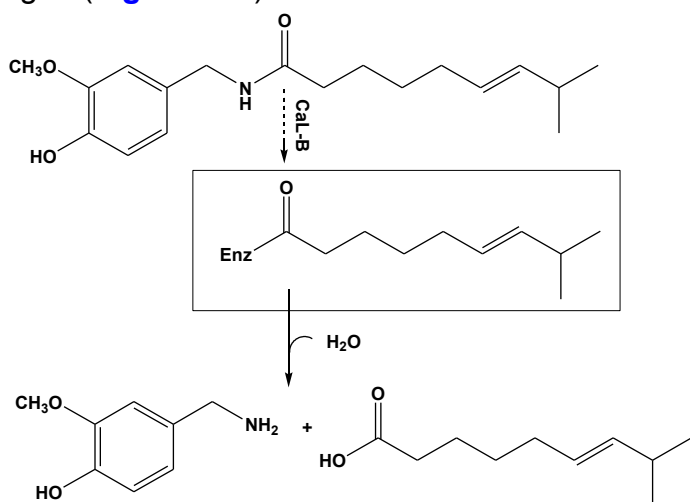
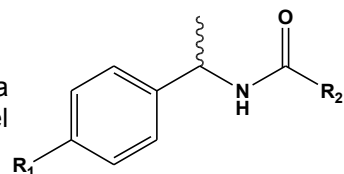


Figura 2.3. Hidrólisis de la capsaicina por medio de CaL-B. Para la hidrólisis de esta amida se propone que la naturaleza del residuo acilo promueve la estabilización del complejo acil-enzima con lo que se induce la actividad amidasa de la lipasa.

En términos de la influencia estructural de la amina resultante, se ha propuesto que la cloro sustitución en posición *para*- en anillos aromáticos, provoca una electro-atracción que disminuye el poder nucleofílico de la amina asociada al enlace amida, lo que da como resultado un mejor grupo saliente y en consecuencia se observa una mayor velocidad de hidrólisis⁷⁵ (Figura 2.4.). Sin embargo, es importante aclarar que el efecto inductivo de este tipo de sustituciones es muy débil. De hecho, la resonancia y los efectos electrónicos que se generan con las sustituciones se debilitan o interrumpen por el carbono que se encuentra entre el anillo aromático y el nucleófilo. Por otro lado, al igual que en la síntesis de amidas por medio de lipasas, la naturaleza del grupo acilo tiene un rol importante en la formación del complejo acil-enzima. La elección de el residuo acilo debe entonces estar dirigida a beneficiar la estabilización del estado de transición para favorecer la hidrólisis de amidas. En este sentido, la hidrólisis de amidas por medio de CaL-B se ha logrado cuando el complejo acil-enzima se induce por la activación de sustratos, como es el caso de amidas compuestas por derivados del ácido 2-metoxiacético; o bien, por amidas con estructuras particulares como aquellas que contienen residuos acilo de aproximadamente 8 carbonos^{16,82,83} (Figura 2.4.).

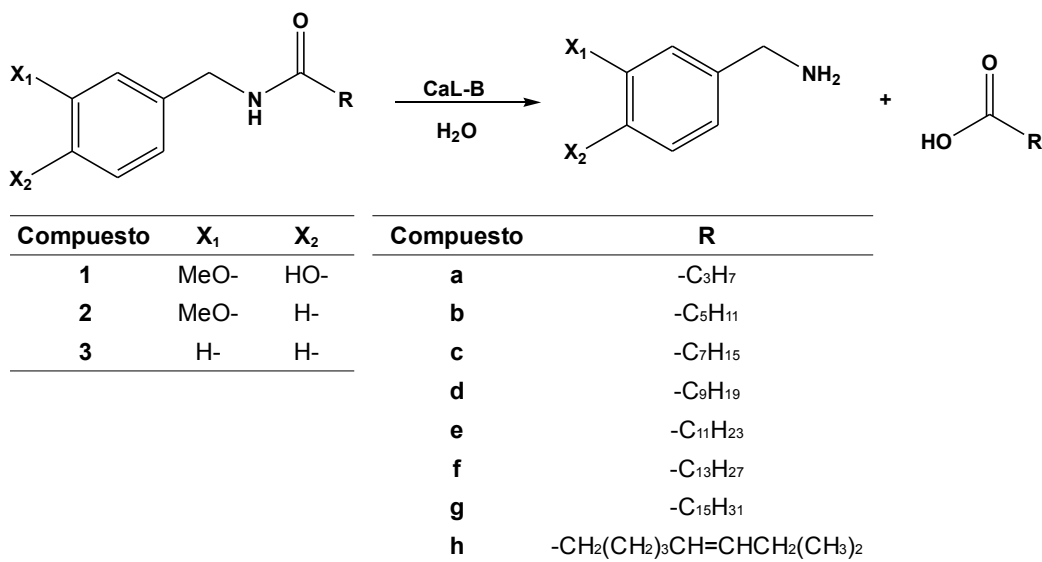
Figura 2.4. Estructuras moleculares de amidas hidrolizadas por CaL-B. La actividad amidasa se induce por sustratos que promueven la formación del complejo acil-enzima.



Compuesto	R ₁	R ₂
1	-Cl	-CH ₂ OCH ₃
2	-CH ₃	-C ₇ H ₁₅

Reportes recientes relacionados con la búsqueda de lipasas con actividad amidasa refieren a la ingeniería de proteínas. Tal es el caso de una doble mutante de la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa*, en la cual, a pesar de que las modificaciones se encontraron en la superficie de la proteína, alejadas del sitio activo, se obtuvo una actividad amidasa 2 veces mayor a la enzima nativa⁸⁴. Más aún, trabajos recientes reportan la obtención de una triple mutante de la misma enzima con la que se logró una actividad amidasa 28 veces mayor que la nativa⁸⁵. El razonamiento detrás del efecto de estas mutaciones explica que los cambios estructurales repercuten en un ajuste espacial de la histidina catalítica que influye en la habilidad de este residuo para extraer y/o donar su protón. En otras palabras, las modificaciones en la enzima producen un mejor acomodo de la histidina que facilita la etapa de acilación y/o desacilación del sustrato.

Como se expone en estos antecedentes, el desarrollo de una herramienta enzimática para la hidrólisis de amidas que contienda con la agresividad de los procesos tradicionales resulta atractivo. A pesar de ser escasos, la mayoría de los reportes exponen que los factores estructurales tanto del sitio activo de la enzima como del sustrato son determinantes para la hidrólisis de amidas por medio de enzimas. En particular, la actividad amidasa de las lipasas parece estar estrechamente relacionada con la naturaleza del residuo acilo. En este sentido, los experimentos de este capítulo están enfocados en explorar la influencia de las características estructurales del sustrato que contribuyen en provecho de la actividad amidasa en CaL-B. Para ello, se sometieron a hidrólisis distintas amidas con variaciones en la longitud del residuo acilo y modificaciones en el anillo aromático de la amina resultante. Estas reacciones fueron catalizadas por CaL-B en agua a 45 y 70°C (**Esquema 2.2.**).



Esquema 2.2. Estructuras moleculares de las amidas sometidas a hidrólisis por medio de CaL-B. Las amidas se constituyen por residuos acilo lineares saturados con distinto número de carbonos así como de anillos aromáticos con diferente grado de sustitución.

2C. MATERIALES Y MÉTODOS

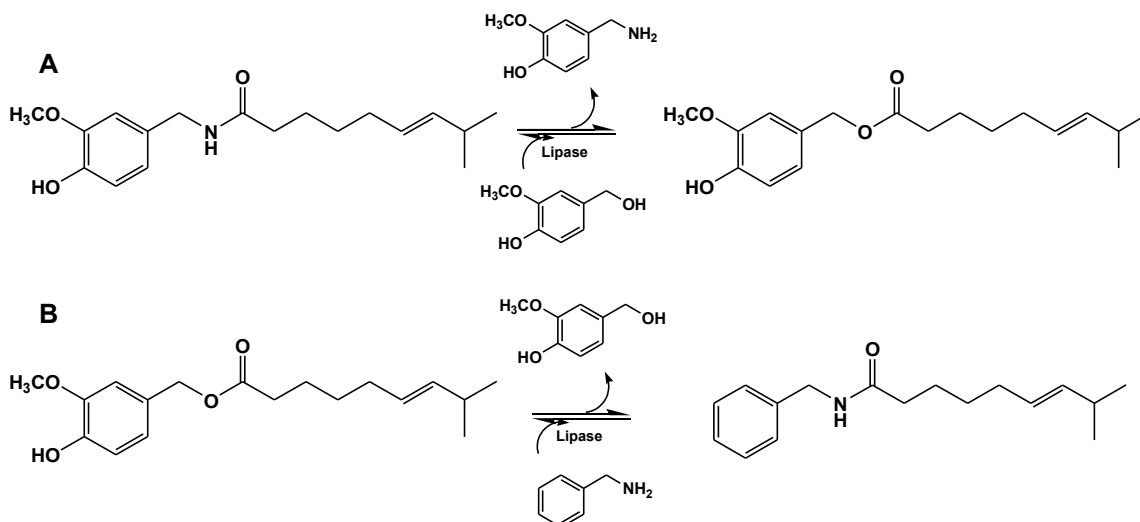
2C.1. MATERIALES

La lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada (Novozyme 435 CaL-B) fue amablemente suministrada por Novozymes A/C (México, México). El metanol y acetonitrilo (grado HPLC) se obtuvieron de J.T Backer (Edo. de México, México). El clorhidrato de vainillina (98%), la 3-metoxibencilamina (98%), el vainillinalcohol (98%), ácido cáprico (99%), etilbutirato (99%), etilcaprilato (99%) y la *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) se adquirieron de Aldrich (WI, USA). La bencilamina (99%), capsaicina (97%), el metilcaproato (99%), así como los ácidos laúrico (99%), mirístico (99%) y palmítico (99%), fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (MO, USA).

2C.2. SÍNTESIS ENZIMÁTICA Y PURIFICACIÓN DE AMIDAS

Todas las reacciones se llevaron a cabo a una temperatura de 45°C con agitación magnética controlada. Los análogos de capsaicina se sintetizaron por medio de la lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B, Novozym 435, 20mg ml⁻¹) en 5ml de 2-metil-2-butanol (2M2B) previamente deshidratado con tamiz molecular a una concentración equimolar de sustratos (20mM). En la síntesis de las vainillinamidas (**1**) se incubó la amina con DIPEA por 30min, para liberar el clorhidrato, seguida de la adición del ácido carboxílico. La relación entre DIPEA y el clorhidrato de vainillinamina fue de 18:1 en acuerdo a un reporte previo (68). En la síntesis de las 3-metoxibencilamidas (**2**) y bencilamidas (**3**) los sustratos y la enzima se agregaron simultáneamente. Con el propósito de controlar la actividad de agua en el medio de reacción se agregan 20mgml⁻¹ de tamiz molecular.

Para la (*E*)-*N*-bencil-8-metil-6-nonaneamida (**Esquema 2.3.**), primero se sintetizó el capsiato mediante una reacción de alcoholisis entre la capsaicina y el vainillinalcohol (30:15mM). Esta reacción se llevó a cabo en 10ml de *n*-hexano previamente deshidratado a 45°C por medio de CaL-B y se obtuvo un rendimiento del 96% con relación a la concentración del alcohol. Dicho ester, se purificó mediante cromatografía flash con una fase de elución compuesta por *n*-hexano y etilacetato (70:30). El capsiao purificado se sometió a una reacción de aminólisis con una concentración equimolar de bencilamina (15mM) en 10ml de 2M2B a 45°C por medio de CaL-B. Para esta etapa final, se obtuvo un rendimiento de 99% en la producción de la amida con respecto a la concentración de la bencilamina.



Esquema 2.3.A. Reacción de alcoholólisis entre la capsaicina y el vainillinalcohol en *n*-hexano catalizada por CaL-B. **B.** Reacción de aminólisis del capsiato y la bencilamina catalizada por CaL-B y llevada a cabo en 2M2B.

La recuperación de las amidas se llevó a cabo mediante un primer paso en el que se separan la enzima y el tamiz molecular por una centrifugación a 10,000 rpm por 12 min, seguida de la evaporación del disolvente (2M2B) en un rotavapor Büchi 461 (85 °C, 100 rpm, -60 Pa). Evaporado todo el disolvente, mediante extracciones en 1.5ml de *n*-hexano se induce la solubilización del ácido residual y la precipitación de la amida y amina, que son prácticamente insolubles en este disolvente. Para la separación de la amida y la amina residual, se resuspende la mezcla en 1.5ml de agua para promover la solubilización de la amina. Las estructuras de las amidas recuperadas se identificaron por espectrometría de masas y por resonancia magnética nuclear ^{13}C y ^1H (**ANEXO 1**).

2C.3. HIDRÓLISIS DE AMIDAS

Todas las reacciones de hidrólisis fueron catalizadas por CaL-B en viales sellados con 5ml de agua deionizada con un pH de 7.5, a 45 y 70°C. La concentración inicial de amida en todos los casos fue de 15mM. Las reacciones de hidrólisis se comenzaron con la adición de 6mgml⁻¹ de biocatalizador y se tomaron muestras de 50µl a intervalos regulares durante 8h.

2C.4. ANÁLISIS POR HPLC

Las reacciones de hidrólisis se analizaron mediante la cuantificación de la amina resultante. Los productos se detectaron por HPLC mediante un detector de arreglo de diodos Waters 996 (PDA, Photo Diode Array) equipado con una bomba automática Waters 600E (Waters Corp., Milford, MA). La vainillinamina y la 3-metoxibencilamina se separaron con una columna Waters Spherisorb ODS-2 (4.6 x 250mm). La vainillinamina se eluyó con una fase compuesta por metanol y agua (50:50 v/v) y se detectó a 230nm (3.5min). La 3-metoxibencilamina se separó con una fase de elución constituida por acetonitrilo y agua (70:30 v/v) y se detectó a 275nm (4.0min). Para la bencilamina se utilizó una columna Supelcosil C18 (3.9 x 300mm, Supelco, Bellefonte, PA) operada con una mezcla de acetonitrilo y buffer de fosfatos (70:30 v/v, 25mM, pH 4.2) y se detectó a 206nm (5.1min).

2D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2D.1. INFLUENCIA DE LA LONGITUD DEL RESIDUO ACILO EN LA HIDRÓLISIS DE VAINILLILAMIDAS

Para estudiar la influencia de la longitud del residuo acilo sobre la velocidad inicial de reacción se hidrolizaron en primera instancia diferentes vainillinamidas sintetizadas a partir de ácidos carboxílicos de 4 a 16 carbonos (**1a**, **1c-g**, Esquema 2.2.). Las condiciones de estas reacciones son similares a las reportadas en la hidrólisis de capsaicina¹³ (6mgml⁻¹ de enzima, 1.5mM y 70°C). Como se puede observar en la Figura 2.5., en la que se representa la velocidad inicial de hidrólisis en función del número de carbonos del residuo acilo, solo las amidas con residuos acilo de mediano tamaño fueron hidrolizadas por CaL-B de manera eficiente. En esta representación también se puede observar que existe una clara preferencia de la enzima por la amida derivada del ácido cáprico (**1d** C₁₀). Esta dependencia entre la actividad hidrolítica de las lipasas en función del tamaño de la cadena alifática también se ha observado en la hidrólisis de ésteres; más aún, se ha reportado que la capacidad hidrolítica de CaL-B aumenta con sustratos comprendidos por residuos acilo medianos^{86,87}. La ausencia de actividad hidrolítica de esta enzima, como en el caso de la vainillinamida **1a**, refiere a sustratos con cadenas alifáticas cortas. En estos casos, se ha reportado que para mejorar la actividad se recurre a amidas derivadas de ácidos 2-metoxiacéticos¹⁶; o bien mediante la activación de los sustratos empleando anillos aromáticos cloro-sustituídos⁷⁵.

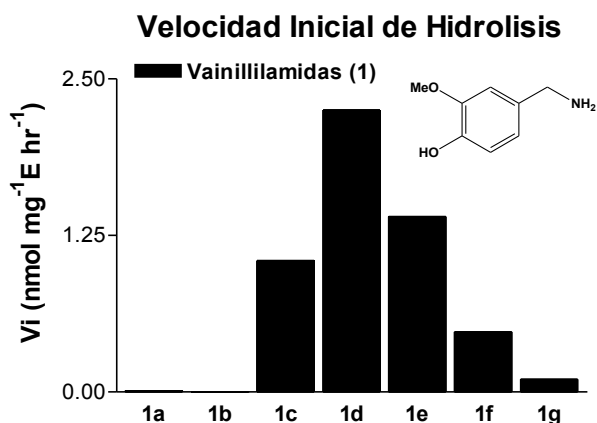


Figura 2.5. Influencia de la longitud del residuo acilo en la velocidad inicial de hidrólisis de las vainillinamidas (**1a**, **1c-g**). Las reacciones se llevaron a cabo a una concentración de sustrato de 1.5mM en 5ml a 70°C.

A pesar de que en este primer ensayo se advierte una clara influencia de la longitud del residuo acilo sobre la velocidad inicial de hidrólisis, las observaciones no son concluyentes dado que los sustratos a 70°C se encuentran en distintos estados físicos (**1a-e** líquidos, **1f-g** sólidos). Por ello, con el objetivo de discernir entre la influencia del tamaño de la cadena hidrocarbonada o la importancia en el estado físico de los sustratos en la hidrólisis de amidas, se redujo la temperatura del medio de reacción a 45°C para modificar el estado físico de al menos una de las amidas (**1e**).

2D.2. INFLUENCIA DEL ESTADO FÍSICO DE LAS AMIDAS

A diferencia de otras lipasas, CaL-B tiene permanentemente expuesto el sitio activo y el motivo estructural conocido como tapa se encuentra persistentemente abierto. Sin embargo, se ha sugerido que la función de este motivo estructural radica en el anclaje de la enzima al sustrato. En acuerdo a este posible fenómeno de anclaje, la diferencia en los estados físicos

de los sustratos podría encubrir la preferencia de CaL-B por amidas de mayor tamaño. En otras palabras, mientras que en la hidrólisis de las amidas con residuo acilo de 4 a 12 (**1a**, **1c-e**) carbonos de longitud se produce una clara bifase aceite-agua que podría inducir el anclaje de la lipasa, en la hidrólisis de las amidas con cadena alifática de mayor tamaño (**1f** y **1g**, **C₁₄** a **C₁₆**), la heterogeneidad del sistema (sólido-agua) podría dificultar el debido funcionamiento de CaL-B. Para descartar la presencia de dicho efecto en la preferencia de CaL-B por el tamaño del residuo acilo, se llevaron a cabo reacciones de hidrólisis a menor temperatura en donde se modificó el estado físico de una amida. Como se puede apreciar en la **Figura 2.6.**, a pesar de haber modificado el estado físico de la amida **1e** (de líquido a sólido), los perfiles de velocidad a 45 y 70°C en función del tamaño del residuo acilo son similares en ambas condiciones. Así, los resultados de este ensayo permiten descartar que el aumento en la actividad amidasa de CaL-B con residuos acilo de tamaños medianos está influenciada por el estado físico de las amidas. Así mismo, dado que la solubilidad de las amidas incrementa al reducir la longitud del residuo acilo, podemos concluir que la hidrólisis de amidas por medio de CaL-B tampoco depende de la solubilidad de los sustratos y que ésta depende principalmente de la longitud del residuo acilo.

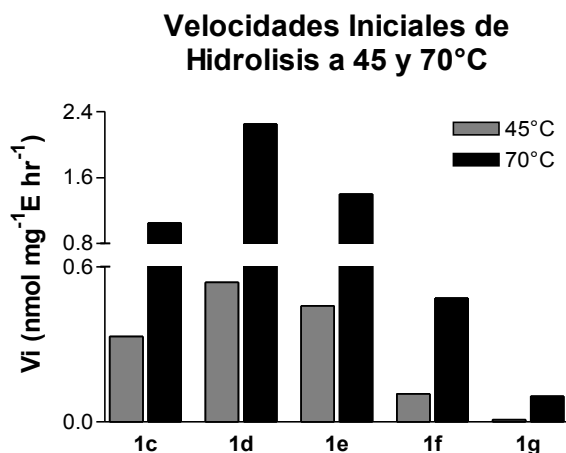


Figura 2.6. Velocidades iniciales en la hidrólisis de las vainillinamidas (**1c-g**) catalizadas por CaL-B a 45 y 70°C. La similitud entre los perfiles de preferencia demuestra que el fenómeno es independiente del estado físico de los sustratos.

2D.3. INFLUENCIA DE LAS SUSTITUCIONES DEL ANILLO AROMÁTICO

Para explorar la influencia de las sustituciones en el anillo aromático presente en las amidas a transformar se sometieron a hidrólisis amidas derivadas de la 3-metoxibencilamina (**2**) y la bencilamina (**3**). Al igual que las vainillinamidas, estas amidas están constituidas por ácidos carboxílicos de diferente longitud de cadena. Los resultados de las reacciones de hidrólisis de estas amidas se presentan en la **Figura 2.7.**

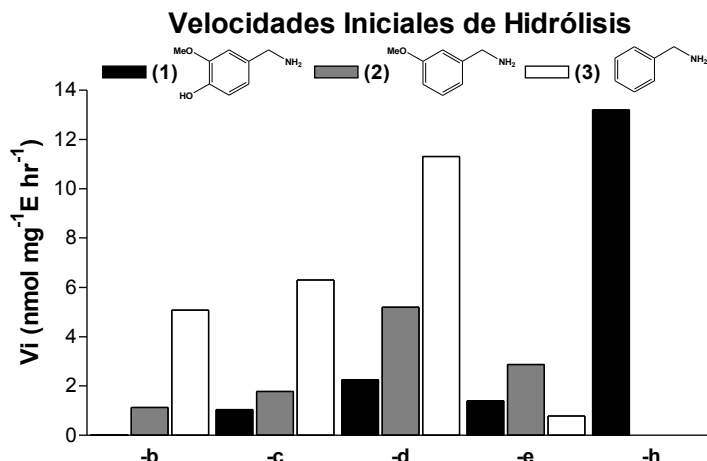


Figura 2.7. Velocidades iniciales de hidrólisis de (1) vainillin-, (2) 3-metoxibencil- y (3) bencilamidas con diferente longitud en el residuo acilo (b- e). Las reacciones se llevaron a cabo a una concentración de 1.5mM en 5ml a 70°C.

Es interesante notar que independientemente de la naturaleza del anillo aromático presente en la amida, las mayores velocidades de hidrólisis se obtienen con aquellas amidas derivatizadas con el ácido de 10 carbonos (**1d**, **2d**, **3d**). En este sentido, se puede observar que el perfil de hidrólisis en función de la longitud del residuo acilo, en todos los casos, tiene un máximo con las amidas de 10 carbonos (**Figura 2.7.**), y en efecto, reducir o incrementar la cantidad de carbonos en la cadena produce un drástico decremento en la velocidad inicial de hidrólisis. Por otro lado, en términos de las sustituciones del anillo aromático, se puede apreciar que la mayor velocidad de hidrólisis se obtiene con amidas carentes de sustituciones en el anillo vainilloide. De hecho, la velocidad de hidrólisis de las amidas reduce a mayor número de sustituciones se encuentren en el anillo aromático, por lo tanto, las velocidades de las bencilamidas (**3**) son mayores que las obtenidas para las 3-metoxibencilamidas (**2**) y a su vez, mayores que las de las vainillinamidas (**1**). Reportes previos confirman la influencia de la posición y número de sustituciones en la velocidad de hidrólisis. Por ejemplo, en la hidrólisis de fenilbutanoatos *orto*-, *meta*- y *para*-sustituídos se ha observado un fuerte efecto inductivo en la velocidad de hidrólisis dependiente de la posición de la sustitución⁸⁸, sugiriendo que las diferencias en la velocidad de reacción se deben a la interacción de los sustituyentes del anillo con el sitio activo de la enzima^{75,5,88}. De manera similar a lo observado en las reacciones de síntesis de estos capsaicinoides expuestas en el capítulo anterior (**CAPÍTULO 1.**), se puede confirmar que la velocidad inicial decrece indirecta y proporcionalmente al número de sustituciones en el anillo vainilloide, y se propone que estas diferencias se deben a impedimentos estéricos entre los sustratos y el sitio activo de la enzima.

A pesar de que la bencilamida acilada con el ácido cáprico (**1d**) cuenta con las características estructurales que favorecen la velocidad inicial de hidrólisis (**C**₁₀ y anillo sin sustituyentes), un caso particular resultó la hidrólisis de la capsaicina ya que la rapidez con la que se hidroliza esta amida es superior a las obtenidas con las demás amidas aquí estudiadas¹³ (**Figura 2.7.**). Con el fin de estudiar este resultado inesperado, se sintetizó, purificó e hidrolizó una amida compuesta por la bencilamina y el ácido carboxílico no-lineal insaturado y ramificado de la capsaicina (ácido 8-metil-6-nonanoico). De este ensayo se observó que la velocidad de hidrólisis de esta amida “híbrida” (**3h**) fue 3.7 veces mayor a la observada para la capsaicina (**1h**), 4 veces mayor que su correspondiente amida cáprica (**3d**) y 8.8 y 20 veces mayor que **2d** y **1d**, respectivamente (**Figura 2.8.**). Esto confirma que la capacidad de CaL- B

para hidrolizar amidas se encuentra estrechamente relacionada con las características estructurales de los sustratos y en particular con las del residuo acilo.

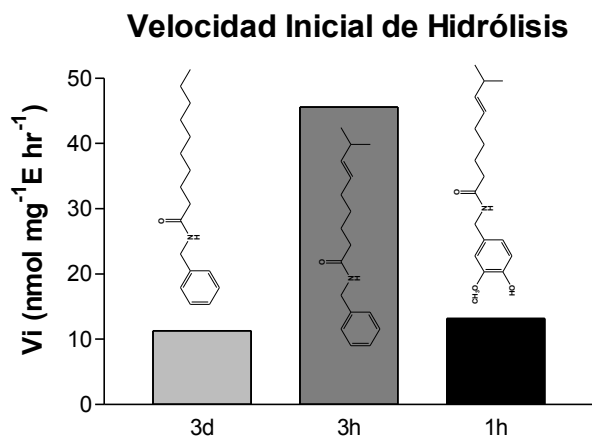


Figura 2.8. Incremento en la velocidad inicial de hidrólisis de la benzamida derivatizada con el ácido carboxílico de la capsaicina. En todos los casos la concentración de sustratos fue de 1.5mM en 5ml a 70°C.

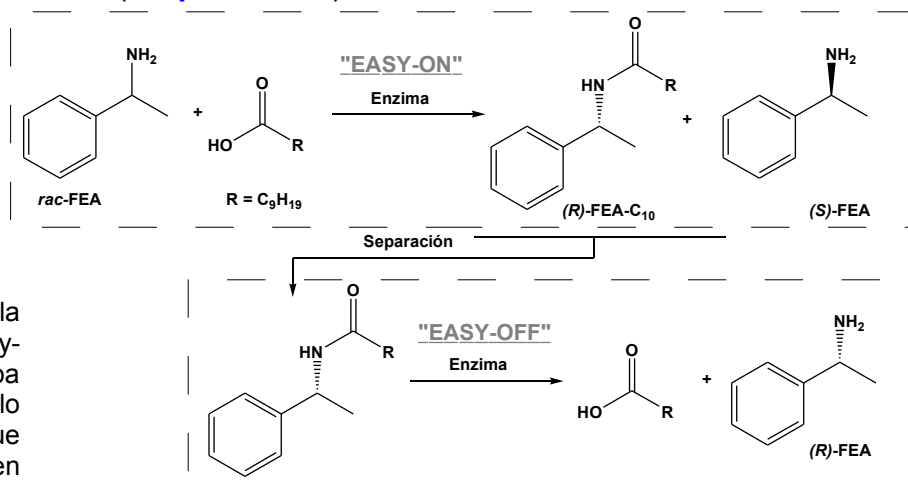
2E. CONCLUSIONES

Debido a la estabilidad termodinámica del enlace, las amidas requieren de condiciones drásticas tanto de temperatura como de pH para su hidrólisis. Aunado a ello, la reversibilidad en la hidrólisis de amidas está favorecida dado el poder nucleofílico de las aminas generadas. Es bien sabido que la catálisis enzimática disminuye la energía de activación de las reacciones mediante interacciones entre el sitio activo y los sustratos que estabilizan el estado de transición de la reacción. Así, los resultados que aquí se exponen demuestran que la actividad amidasa de la lipasa B de *Candida antarctica* está relacionada con características estructurales específicas de las amidas, aun cuando a las lipasas se les ha atribuido nula actividad amidasa. En particular, se observó que la velocidad inicial de hidrólisis está influenciada por la longitud del residuo acilo así como por la cantidad de sustituciones en el anillo aromático de la amina resultante. Se encontró que para amidas constituidas por ácidos carboxílicos lineares saturados la velocidad de hidrólisis es mayor para sustratos derivados con ácidos de 10 carbonos (**1-3d**) independientemente de las sustituciones en el fenilo. En cambio, en términos del número de sustituciones en el anillo aromático se observó que la velocidad inicial de hidrólisis es mayor con las amidas carentes de sustituciones. Es decir, que las amidas benzílicas se hidrolizaron a mayor velocidad que las 3-metoxi- y 3-metoxi-4-hidroxi-sustituidas (**1>2>3**). A pesar de la combinación de estas características estructurales, la velocidad de hidrólisis de la amida benzílica **C**₁₀ (11.3 nmol mg⁻¹E hr⁻¹) fue menor que la observada con la capsaicina (13.2 nmol mg⁻¹E hr⁻¹) (**3d<3h**). Sin embargo, se demostró que la hidrólisis de una amida híbrida formada por el residuo acilo no-lineal insaturado de la capsaicina y la benzilamina se hidroliza 3.7 veces más rápido que la capsaicina (**3h>1h**) y 4 veces más que su correspondiente amida derivada del ácido cáprico (**3h>3d**). En resumen, con estos resultados se demuestra que CaL-B presenta actividad amidasa y que esta depende de las características estructurales de las amidas. Además, con el empleo de esta estrategia se abre la posibilidad de utilizar a las lipasas como herramientas para la obtención de aminas quirales a partir de amidas proquirales o bien para la resolución de amidas quirales. Incluso, la hidrólisis de amidas por medio de lipasas puede ser empleada para la resolución efectiva de mezclas racémicas de aminas ópticamente activas.

MÉTODO “EASY-ON, EASY-OFF” PARA LA RESOLUCIÓN EFECTIVA DE AMINAS QUIRALES

3A. RESUMEN

Una aplicación de los resultados obtenidos en los dos capítulos anteriores radica en la resolución efectiva de mezclas racémicas mediante la síntesis e hidrólisis de amidas catalizadas por lipasas. Recientemente se acuñó el término “Easy-on, Easy-off”, refiriéndose a la resolución enzimática efectiva de mezclas racémicas. Este proceso consiste en transformar y reformar enantioselectivamente un solo isómero de una mezcla racémica mediante el uso de la misma enzima (**Esquema 3.1.**).



Esquema 3.1. Diagrama de la estrategia acuñada como “Easy-on, Easy-off”. En la primera etapa enantioselectiva se acila un solo estereoisómero, mismo que después de una separación, en una segunda etapa se hidroliza.

En este capítulo se presenta la resolución efectiva de la (\pm)-1-Feniletilamina (*rac*-FEA) mediante el empleo de la lipasa B de *C. antarctica* (CaL-B). El procedimiento para la resolución de dicha aril-alquil-amina comprende una primera etapa de condensación enantioselectiva entre la amina y el ácido cáprico. La síntesis de la amida (*R*)-FEA-C₁₀ se llevó a cabo en 2-metil-2-butanol (2M2B), y de manera similar a lo reportado en el **CAPÍTULO 1.**, en este medio de reacción se obtuvo una alta conversión de la amina (99% del enantiómero *R*, <24h) y un elevado exceso enantiomérico (ee>99%). La separación de la amida transformada y la amina que no reaccionó fue facilitada gracias a la incorporación del ácido cáprico como componente hidrofóbico del producto. Posteriormente, a partir del producto purificado y empleando el mismo biocatalizador (CaL-B), se llevó a cabo la hidrólisis de la amida transformada. Esta reacción se llevó a cabo en un buffer de fosfatos (50mM, pH 7) a 70°C de la cual se obtuvo una conversión del 98%. Como resultado de este eficiente

procedimiento enzimático se obtienen ambos estereoisómeros de la FEA con alta enantioselectividad y elevados rendimientos:

. A partir de los resultados de esta sección se publicaron los artículos:

Torres-Gavilán A., Escalante J., Regla I., López-Munguía A., Castillo E.

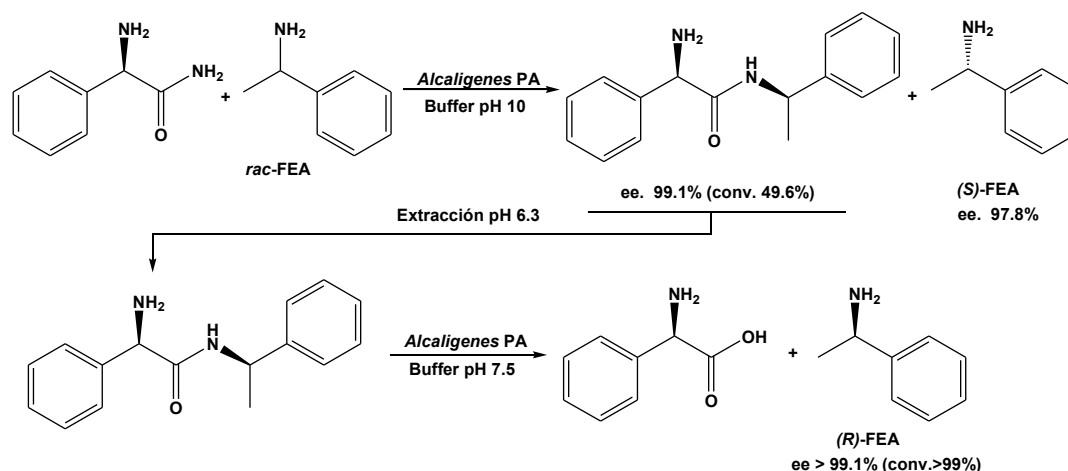
“Easy-on, easy-off” resolution of chiral 1-phenylethylamine catalyzed by Candida antarctica lipase B.
Tetrahedron: Asymmetry **18** (2007) 2621-2624. (**ANEXO 3**)

Regla I., Luviano-Jardón A., Demare P., Hong E., **Torres-Gavilán A.**, López-Munguía A., Castillo E.

Chemoenzymatic synthesis of the potential antihypertensive agent (2R,2'S)-b-hydroxyhomometoprolol.
Tetrahedron: Asymmetry **19** (2008) 2439-2442. (**ANEXO 4**)

3B. INTRODUCCIÓN

Uno de los requerimientos indispensables en la industria farmacéutica es la obtención de compuestos con elevada enantiopureza debido a que en la mayoría de los casos mientras que un enantiómero presenta la propiedad farmacológica deseada el estereoisómero contrario produce efectos secundarios adversos e incluso nocivos. Además, las moléculas ópticamente activas también son ampliamente utilizadas como sintones y agentes auxiliares en la co-cristalización de enantiómeros²⁴. Consecuentemente, se han dedicado grandes esfuerzos en el desarrollo de tecnologías económica y ambientalmente amigables para la producción de compuestos con altos excesos enantioméricos². Particular atención se ha puesto en la resolución de aminas y amidas quirales ya que dentro del grupo de moléculas farmacológicamente activas, éstas tienen una representación de ~26%⁶. Tal es el caso de la (±)-1-feniletilamina (*rac*-FEA), amina cuyo uso industrial es diverso, destacando su utilización como poderoso intermediario en síntesis asimétrica y como auxiliar quiral^{89,90}. Se han reportado una extensa variedad de métodos tanto químicos como enzimáticos, de elevada capacidad enantioselectiva (ee>99), para la obtención de estereoisómeros de múltiples aril-alquil aminas. Sin embargo, la mayoría de estos procesos constan de varias etapas de transformación de baja eficiencia e implican varios pasos de recristalización fraccionada⁹¹. Un método enzimático comúnmente utilizado en la resolución de aminas es la acilación de mezclas racémicas de estos compuestos. De hecho, en beneficio de la alta capacidad enantioselectiva de las lipasas, la amidación de estos compuestos ha sido extensamente empleada como estrategia para la resolución enantiomérica^{24,92,93}. Sin embargo, el mayor inconveniente de ello es la obtención de un solo enantiómero (la amina que la lipasa no reconoce). Para la desacilación del estereoisómero transformado y de esta manera obtener el segundo enantiómero, normalmente se recurre a la hidrólisis química tradicional en la que se requieren condiciones de reacción severas (9<pH<2, T>200°C) incompatibles con grupos funcionales sensibles^{94,77}. Recientemente, se reportó un proceso enzimático para la resolución efectiva total de la *rac*-FEA. Esta estrategia fue denominada como “Easy-on, Easy-off”⁵⁵ (**Esquema 3.2.**). La metodología consiste en la síntesis y subsecuente hidrólisis de la amida catalizadas por la penicilacilasa de *Alcaligenes faecalis*. En dicho proceder se obtienen, para ambas reacciones, elevadas conversiones y altos excesos enantioméricos. Sin embargo, la mayor desventaja radica en el reducido número de sustratos que esta enzima es capaz de transformar y sobre todo, de la necesidad de emplear como agente acilante a la (*R*)-fenilglicinamida (compuestos quiral que requiere previa resolución).



Esquema 3.2. Resolución efectiva de la rac-FEA mediante la acilación y desacilación catalizadas por la penicilinaclilasa de *Alcaligenes faecalis*. Como donador de acilo se emplea la (*R*)-fenilglicinamida.

Con base en los resultados reportados en el [CAPÍTULO 1.](#) y [CAPÍTULO 2.](#), considerando la amplia especificidad de las lipasas por sustratos de diversas estructuras y su estabilidad en presencia de disolventes orgánicos, proponemos que la integración de las lipasas en este proceso de resolución efectiva permitiría la transformación de un mayor espectro de sustratos. Como se enfatiza en el primer capítulo las reacciones de acilación por medio de lipasas se han aplicado ampliamente en la síntesis de amidas^{95,12,71}, además, gracias a su alta capacidad enantioselectiva, las reacciones de amidación hacen posible la resolución parcial de un gran número de aminas^{53,96,97}. En particular, se ha demostrado que mediante la acilación de la FEA con la lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B) tanto en líquidos iónicos como en disolventes orgánicos se obtienen elevados excesos enantioméricos del producto (ee>95%)^{98,99,24}. A pesar de ello, en la mayor parte de los medios de reacción empleados en la producción de amidas quirales, los rendimientos de la reacción no exceden el 40% de conversión^{100,68}. En consecuencia, para estas reacciones el parámetro de proporción enantiomérica empleado para la evaluación global del proceso enantioselectivo (E) es relativamente mediocre (E<70). En este trabajo se demostró que la producción de amidas al equilibrio en 2-metil-2-butanol (2M2B) excede en prácticamente todos los casos el 90% de conversión ([CAPÍTULO 1.](#)). Más aún se comprobó que para la acumulación de compuestos hidrofílicos como las amidas, en 2M2B las características estructurales de los productos no son determinantes y que dicho efecto está principalmente influenciado por una relación termodinámica entre el medio de reacción y la naturaleza del enlace ([Figura 3.1.](#)). En efecto, en este trabajo y en anteriores reportes, se ha demostrado que la naturaleza del disolvente está estrechamente relacionada con la acumulación de los productos y se ha propuesto que son los coeficientes de actividad de los productos lo que determina la acumulación de los mismos al equilibrio^{10,11}. Por ejemplo, en la síntesis de poli-ésteres del glicerol y xilitol, se ha demostrado que el grado de esterificación puede ser modulado en función de la naturaleza del disolvente. En este sentido, se ha observado que la producción de di- y tri-oleinas (moléculas hidrofóbicas) se favorece en disolventes de carácter hidrofóbico como el *n*-hexano, mientras que la acumulación de mono-ésteres (moléculas polares) se produce en disolventes polares como 2M2B, 2M2P y mezclas de 2M2B y 2M2P con DMSO. En este contexto se propone para este estudio la incorporación del 2M2B para la resolución parcial

de aminas racémicas a través de una reacción de acilación en presencia de CaL-B (“Easy-on”). Sin embargo, para satisfacer la segunda parte de la estrategia, la desacilación (“Easy-off”) del enantiómero transformado, es necesario tomar en cuenta la influencia de longitud del donador de acilo en la hidrólisis de amidas. De hecho, pese a la idea generalizada de que las lipasas no tienen actividad amidasa^{101,21,54,55,52}, una de las mayores contribuciones de este proyecto reside en haber demostrado que la hidrólisis de amidas por medio de lipasas, en particular la de CaL-B, se promueve por determinadas características estructurales del sustrato (**CAPÍTULO 2**). En este sentido, se comprobó que con sustratos carentes de sustituciones en el anillo aromático, como en el caso de la FEA, la velocidad de hidrólisis se incrementa. Aunado a lo anterior, también se encontró que este factor cinético se favorece aún más, descartando ácidos no-lineares insaturados, con amidas derivadas del ácido cáprico (**C₁₀**) (**Figura 3.1**). En consecuencia, tomando en cuenta estos antecedentes, en este capítulo se desarrolló la resolución efectiva de la *rac*-FEA en la que se implementó a CaL-B como herramienta catalítica en la estrategia conocida como “Easy-on, Easy-off”. Esta contribución tecnológica permite, gracias a la promiscuidad catalítica de CaL-B, ampliar la diversidad estructural en la resolución efectiva de aminas.

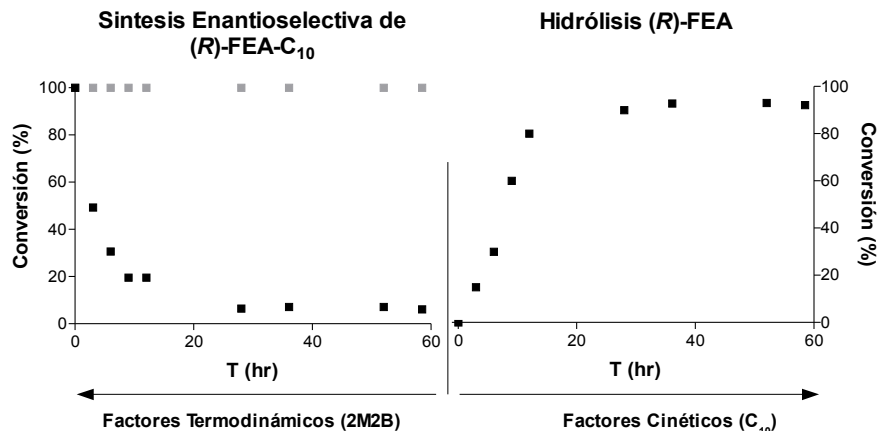


Figura 3.1. En esta figura se presentan los aspectos predominantes en la estrategia “Easy-on, Easy-off”. Los cuadros en gris representan el consumo de (S)-FEA y en negro los de (R)-FEA.

3C. MATERIALES Y MÉTODOS

3C.1. MATERIALES

El metanol (99%) y 2-metil-2-butanol (2M2B 99.7%) se adquirieron de J.T. Baker (Edo. de México, México). El Tetrahidrofurano (>99%), la (±)-1-feniletilamina (*rac*-FEA, 99%), la (S)-(-)-feniletilamina (>98%), el ácido cáprico (99%) y el tamiz molecular (8-12 mesh) se compraron en Aldrich (WI, USA). La lipasa B de *Candida antarctica*, Novozym 435 (CaL-B) se obtuvo de Novozymes-México A/C (México).

3C.2. ANÁLISIS POR HPLC

Previo al análisis por HPLC, se separan la enzima y el tamiz molecular mediante una centrifugación a 1,700g por 3min. Para la cuantificación por HPLC se utilizó una columna Waters Spherisorb 80-5 ODS-2 (4.6 x 250mm). Se empleó un controlador de flujo Waters 600E a 1ml min⁻¹. La fase de elución se compone de una mezcla con metanol y buffer de fosfatos (20mM, pH 3.8) a 70:30 (v/v). El consumo o producción de la amina en la síntesis e hidrólisis, respectivamente, se cuantificó con un equipo de arreglo de diodos Waters 996 (PDA) a 206nm.

3C.3. ANÁLISIS POR HPLC QUIRAL

El exceso enantiomérico de la amida se cuantificó mediante un análisis por HPLC con una columna CHIRALCEL OJ-H (4.6 x 250mm) (Chiraltechnologies Inc., West Chester PA, USA). La fase de elución se compuso por una mezcla de *n*-heptano y etanol a 97:3 (v/v) con un flujo de 1ml min⁻¹. A estas condiciones el tiempo de retención para la *N*-[(*S*)-(-)-1-feniletil]decanamida es de 8.7min y de 7.5min para la *N*-[(*R*)-(-)-1-feniletil]decanamida. Para identificar cada enantiómero un estándar de la *N*-[(*S*)-(-)-1-feniletil]decanamida se sintetizó químicamente.

3C.4. SÍNTESIS QUÍMICA DE LA *N*-[(*S*)-(-)-1-FENILETIL]DECANAMIDA

Una solución agitada de ácido cáprico (1.0g, 1.1ml, 5.8mmol) en diclorometano se trató con dicitlohexilcarbodiimida (DCC 1.29g 6.3mmol), dimetilaminopiridina (DMAP 0.04g, 0.4mmol) y (*S*)-(-)-1-feniletilamina (0.76g, 6.3mmol). La mezcla se agitó durante toda una noche para después filtrarla y concentrarla al vacío. Por cromatografía tipo Flash empacada con silica gel 230-400 (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) eluida a 90:10 (v/v) hexano/etanol se obtuvo un polvo blanco que correspondía a la *N*-[(*S*)-(-)-1-feniletil]decanamida con alta pureza.

3C.5. REACCIONES ENZIMÁTICAS

3C.5.1. SÍNTESIS DE LA *N*-[(*R*)-(+)-1-FENILETIL]DECANAMIDA

Las reacciones se llevaron a cabo a 45°C en viales agitados de 7ml de 2M2B previamente deshidratado, con una mezcla de *rac*-FEA (12.1mg, 0.01mmol) y ácido cáprico (17.2mg, 0.01mmol) con tamiz molecular (50mg) para controlar la actividad de agua. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de CaL-B (50mg). Al cabo de 24h se detuvo la reacción y se recuperaron la *N*-[(*R*)-(+)-1-feniletil]decanamida y la amina que no reaccionó mediante cromatografía tipo Flash. La columna se empacó con silica gel 230-400 (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) eluida con hexano/etanol 90:10 (v/v).

3C.5.2. HIDRÓLISIS DE LA *N*-[(*R*)-(+)-1-FENILETIL]DECANAMIDA

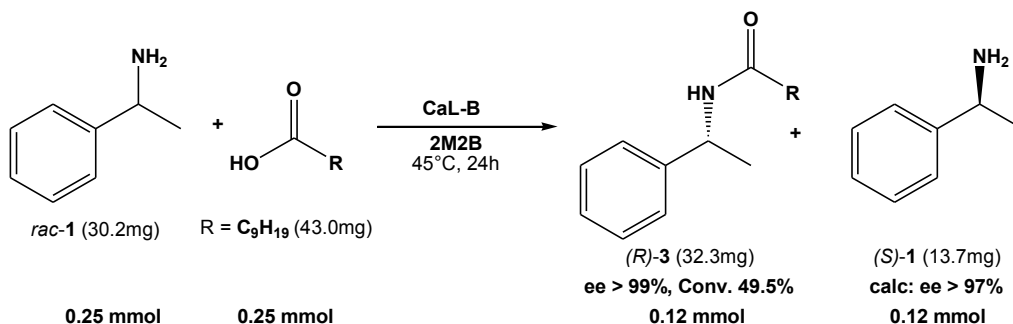
El procedimiento general involucra un medio de reacción compuesto por un buffer de fosfatos (25mM, pH 7) en el que se incubaba la *N*-[(*R*)-(+)-1-feniletil]decanamida (2.06mg, 0.0075mmol) obtenida en el proceso de síntesis, a una temperatura de 70°C. La reacción inicia con la adición de CaL-B (6mg ml⁻¹) y se alcanza el equilibrio al cabo de 48h de transcurrida la reacción. El rendimiento de la (*R*)-(+)-FEA liberada se cuantificó por HPLC.

3C.6. DETERMINACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS

Se obtuvieron los espectros de resonancia ¹H NMR y ¹³C NMR en un espectrómetro Bruker Ultra Shield a 300 y 75MHz. El análisis elemental se llevó a cabo en un instrumento Thermofinnigan EA 112. Los espectros de masas de alta resolución (FAB+) se realizaron en un espectrómetro de masas Jeol JMS-SX 102A. El gas Xenón con una energía de 10kV fue empleado para bombardear las muestras y se utilizó como estándar PEG 600 y 3-nitrobencil alcohol como matriz. La rotación óptica de las amidas enantiopuras se obtuvo en un polarímetro Perkin-Elmer-341 con celdas de 1ml. Todos los puntos de fusión se determinaron en un aparato Electrothermal MEL-TEMP. Los datos estructurales se pueden encontrar en el ANEXO 3 y 4.

3D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La metodología “Easy-on, Easy-off” primero contempla la acilación enantioselectiva de la *rac*-FEA (*rac*-1) con el ácido cáprico (**C**₁₀) en 2M2B (**Esquema 3.3.**). En una segunda etapa se lleva a cabo la hidrólisis del enantiómero transformado (*R*)-(+)-FEA-C₁₀ ((*R*)-3) en buffer de fosfatos a pH 7 y 70°C. Ambas reacciones son catalizadas por CaL-B.



Esquema 3.3. Resolución enantioselectiva de la *rac*-1 catalizada por CaL-B. En este primer paso se obtienen la amida (*R*)-3 y la amina (*S*)-1, ambos con alta enantioselectividad.

En una primera aproximación se llevó a cabo la acilación enantioselectiva de la *rac*-FEA (*rac*-1, 12.1mg, 0.01mmol) con el ácido cáprico (17.2mg, 0.01mmol) catalizada por CaL-B (50mg) en 7ml de 2M2B a 45°C. A la reacción se le adicionaron 50mg de tamiz molecular con el objetivo de controlar la actividad de agua. Al cabo de 24h se detuvo la reacción en la cual se obtuvo una conversión del 49.5% de la *rac*-1 determinada por HPLC. La mezcla de reacción se filtró para remover la enzima y el tamiz molecular, después se evaporó todo el 2M2B y por último se separaron los productos de la reacción por cromatografía tipo Flash. De estos productos de separación se obtuvo a la amida (*R*)-3 con una alta enantioselectividad en forma de polvo blanco (12.8mg, rendimiento del 95%) y la amina (*S*)-1 como un líquido incoloro (5.5mg, rendimiento del 90%). Se encontró que el exceso enantiomérico de la amida (*R*)-3, determinado por HPLC quiral, fue del 99%. Además del beneficio que la alta capacidad de CaL-B ofrece por el enantiómero (*R*)-, la incorporación de una fracción hidrofóbica a la molécula como lo es el ácido cáprico facilitó la separación de los productos. De hecho, se desarrolló un proceso similar para la producción quimio-enzimática de análogos del metoprolol (**Figura 3.2.**). En esta estrategia, mediante la alcoholisis enantioselectiva catalizada por CaL-B entre la clorohidrina y varios vinil-ésteres, se demostró que el uso de un donador de acilo como el vinil-estearato facilitaba la separación de los productos en una mezcla de *n*-hexano y acetato (95:5 v/v) gracias a la hidrofobicidad del estearato transformado y a la polaridad del alcohol enantioselectivamente discriminado (**Esquema 3.4.**).

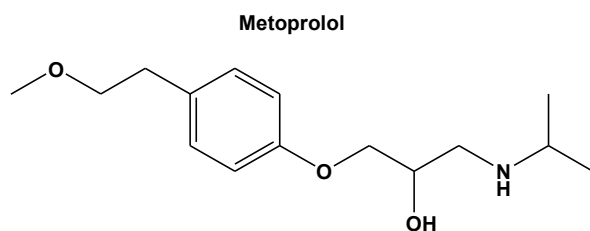
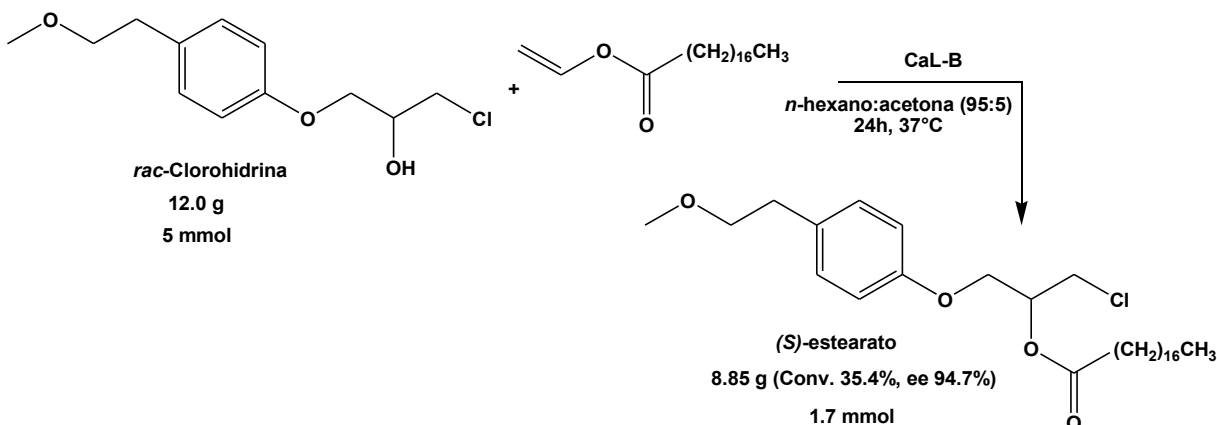


Figura 3.2. Estructura molecular del metoprolol.



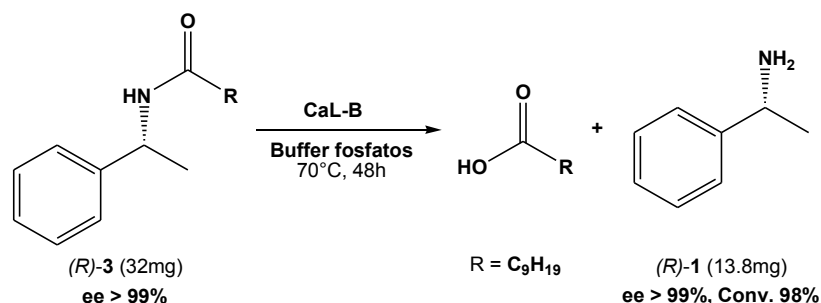
Esquema 3.4. Reacción de alcoholisis enantioselectiva catalizada por CaL-B entre la mezcla racémica de la clorohidrina y el vinil-estearato.

Con estos resultados se comprueba que CaL-B tiene una alta capacidad enantioselectiva para la resolución de alcoholes secundarios y aminas estructuralmente análogas. Además, es importante mencionar que de acuerdo a la alta conversión de la amida **3**, se concluye una vez más que el 2M2B (disolvente polar) es un medio propicio para la acumulación de amidas (**CAPÍTULO 1.**). De hecho, en reportes en los que se realiza esta reacción de amidación catalizada por CaL-B en otros medios de reacción de naturaleza hidrofóbica como el hexano, el etil- o di-isopropil éter, los rendimientos de la reacción son significativamente menores^{102, 94}. En cambio, se ha reportado que en la amidación de la FEA con el ácido dodecanóico se obtiene una conversión del 97% con el uso de líquidos iónicos como medios de reacción. Es importante notar que los altos índices de producción de las amidas en líquidos iónicos y 2M2B son una consecuencia de la alta solubilidad de las amidas en disolventes polares, lo que favorece la acumulación al equilibrio de estos productos de características polares^{10,12}.

Hasta ahora la resolución de amidas estaba limitada al uso de amidasas o proteasas, o bien, a procesos de hidrólisis por química tradicional. Sin embargo, es sabido que tanto las amidasas como proteasas son sumamente específicas en cuanto a la estructura del sustrato y de baja estabilidad en disolventes orgánicos, por lo que su aplicación queda restringida a un número reducido de sustratos. Por otro lado, la hidrólisis química de amidas requiere condiciones agresivas tanto de pH como de temperatura ($2 > \text{pH} > 11$, $T > 100^\circ\text{C}$) por lo que se aumenta la susceptibilidad de las moléculas a estas condiciones. Como consecuencia, una atractiva alternativa es la hidrólisis de amidas por medio de lipasas. Aunque se ha reportado que estas enzimas tienen nula o escasa actividad amidasa^{55,52}, se han propuesto varias estrategias para promover dicha actividad. Una de estas estrategias se refiere al uso de sustratos activados como amidas derivadas del metoxiacetato^{16,92}. En cambio, en este proyecto se demostró que en la hidrólisis de amidas mediadas por CaL-B, la actividad enzimática está favorecida para amidas sin sustituciones en el anillo aromático con ácidos lineares saturados de mediana longitud (**C₈** y **C₁₀**) (**CAPÍTULO 2.**). En base a ello, se llevó a cabo un ensayo de hidrólisis a pequeña escala con la amida (*R*)-**3** (2.06mg, 0.0075mmol) obtenida de la primera etapa, en 5ml de buffer de fosfatos a 70°C mediante CaL-B (30mg). Al cabo de 48h se obtuvo una conversión del 71%, determinada por HPLC. La enzima y la

amida que no reaccionó se filtraron del medio de reacción y la solución se ajustó a un pH de 11 mediante NaOH. Finalmente la amina (*R*)-1 enantioméricamente pura se recuperó mediante extracciones con etil acetato con un rendimiento del 80%. De acuerdo con los resultados anteriores, se obtuvo una reacción de hidrólisis eficiente mediante el empleo de una amida derivada del ácido cáprico (**C**₁₀).

Para evaluar el proceso global a mayor escala, primero se llevó a cabo la síntesis de la amida (Easy-on) en 2.5ml de 2M2B con 30.2mg de *rac*-1 a concentración equimolar del ácido cáprico (43.0mg, 100mM) y 25mg de CaL-B. Después de 24h de reacción se obtuvo una conversión del 49.5% de la cual se recuperaron 32.2mg de (*R*)-3 y 13.7mg de (*S*)-1 mediante cromatografía Flash (**Esquema 3.3**). En un primer intento para hidrolizar (Easy-off) los 32mg de (*R*)-3 en volúmenes inferiores a 20ml se encontraron severos problemas de agitación y difusión. Por tal motivo, para escalar el proceso a condiciones hidrodinámicas constantes, la hidrólisis de los 32mg de (*R*)-3 se llevó a cabo en 82ml del buffer de fosfatos a 70°C con 495mg de CaL-B. Bajo estas condiciones, al cabo de 48 horas de transcurrida la reacción, se obtuvo una conversión (98%) incluso mayor a la observada en la hidrólisis a pequeña escala (71%)(**Esquema 3.5**). El rendimiento obtenido a estas condiciones de escalamiento es superior al ya reportado en la literatura en donde solo se obtienen conversiones similares a tiempos de reacción entre 7 y 10 días ⁷⁵.



Esquema 3.5. Hidrólisis de la amida (*R*)-3 por medio de CaL-B. Mediante esta hidrólisis se obtuvo la amina (*R*)-1 enantioméricamente pura.

3E. CONCLUSIONES

Con los antecedentes de los capítulos anteriores se desarrolló una herramienta enzimática para la resolución efectiva de una mezcla de aminas quirales. La estrategia “Easy-on, easy-off” constituida por una integración de la síntesis-hidrólisis de amidas por medio de CaL-B concluye en la obtención de ambos estereoisómeros, (*S*)-1 y (*R*)-1, enantioméricamente puros y con alto rendimiento. Al utilizar una lipasa en esta metodología (CaL-B) se amplía la diversidad estructural de aminas a resolver. De hecho, a partir de la publicación de este trabajo, grupos interesados en la resolución efectiva de aminas han incorporado a CaL-B como biocatalizador en procesos similares ⁸³. En particular, el éxito de este trabajo es la consecuencia de estudios dirigidos tanto a la acumulación de amidas al equilibrio como de resultados orientados a la exploración de factores estructurales de los sustratos que promueven la actividad amidasa de las lipasas. De los primeros destaca la formulación de un sistema de reacción que permite la producción de amidas en altos rendimientos. El empleo del 2M2B como medio de reacción favorece la acumulación de amidas al equilibrio incluso a concentraciones mayores de las que se han utilizado en este proyecto. La alta solubilidad de las amidas en este disolvente polar no solo promueve la selectividad hacia la acumulación de

estos compuestos sino que imposibilita la síntesis de aductos como por ejemplo los productos correspondientes a reacciones de adición¹⁰³. En particular los resultados correspondientes a la conversión de la *rac*-1 en 2M2B (49.5%) mostraron niveles superiores a los experimentados en disolventes de menor polaridad y de naturaleza hidrofóbica (~35%). Esto conlleva a la obtención del estereoisómero (S)-1 con alto índice de enantiopureza (ee>97%). Por otro lado, la derivatización de la (*R*)-1 con el ácido cáprico (C₁₀) aunado a la ausencia de sustituciones en el anillo aromático de la *rac*-FEA permitieron promover la actividad hidrolítica de CaL-B. De hecho, la elección de una amida constituida por la combinación de ambas características estructurales contenidas en la amida (*R*)-1, son el resultado del estudio de los factores que favorecen la hidrólisis de amidas por medio de CaL-B. En consecuencia, de esta reacción se obtuvo un alto rendimiento en la producción de la (*R*)-1 así como un elevado exceso enantiomérico (Conv. 98%, ee>99%). Incluso, efectuar la reacción de hidrólisis con la amida compuesta por dichas características estructurales derivaron en un proceso más atractivo que los encontrados en la literatura⁷⁵.

CONTROL TERMODINÁMICO DE LA QUIMIOSELECTIVIDAD ENZIMÁTICA

4A. RESUMEN

En esta sección se presenta el diseño de herramientas para el control y manipulación de las reacciones enzimáticas quimioselectivas, considerando la hidrofobicidad tanto del medio de reacción como de los productos de la reacción. El objetivo se dirige hacia la síntesis quimio- y enantioselectiva de moléculas bifuncionales (amino-alcohol). En particular, se presenta la síntesis selectiva de amidas y ésteres mediante una estrategia a la que denominamos “Equilibrium Polarity-Tuning” (EPT). Las observaciones experimentales fueron complementadas con el cálculo teórico cuántico de los coeficientes de actividad termodinámica de los productos mediante un modelo teórico conocido como “Conductor-like Screening Model for Real Solvents” (COSMO-RS). El análisis detallado de ambos resultados nos permitió generar herramientas para la manipulación y control de la quimioselectividad enzimática al equilibrio de la reacción. Estas herramientas pueden ser empleadas como instrumentos para la predicción de los escenarios posibles en las rutas de transformación de moléculas bifuncionales determinadas por la hidrofobicidad del disolvente y para el diseño de un medio de reacción apropiado que permita controlar la acumulación preferencial de los productos de la reacción.

En los primeros apartados de esta sección se demuestra que, para una variedad de estructuras moleculares el 2-metil-2-butanol (2M2B) favorece la producción de amidas (~96%) sobre aquella de los ésteres correspondientes (< 42% [Figura 4.1.](#)), y que por el contrario, en un disolvente hidrofóbico como el *n*-hexano la producción está favorecida hacia la acumulación de los ésteres (~96%) y no así para la de amidas (< 38%).

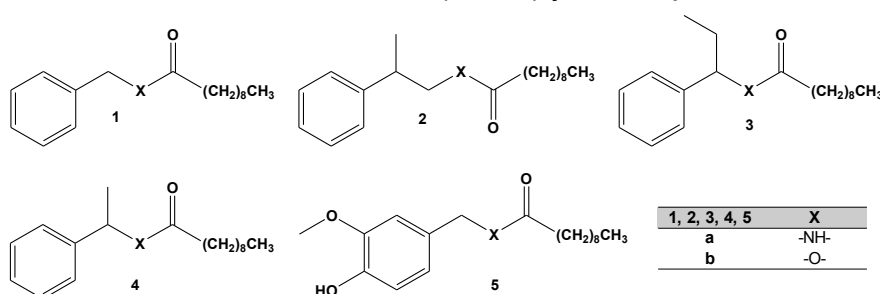


Figura 4.1. Estructura molecular de los ésteres y amidas sintetizadas en 2M2B y hexano por medio de CaL-B.

En un estudio más detallado acerca de la influencia de la hidrofobicidad del medio de reacción sobre la quimioselectividad de la reacción se realizó la acilación de mezclas entre aminas y alcoholes en un mismo disolvente a varias temperaturas. Como era de esperarse,

en estas reacciones “mezcladas” se encontró que en 2M2B la acumulación de las amidas es mayor que la de los ésteres, independientemente de la temperatura de la reacción y de la longitud del donador de acilo (ácido butírico C_4 y ácido cáprico C_{10}). En términos de los rendimientos de las reacciones llevadas a cabo en hexano encontramos que, si bien la producción de los ésteres es favorecida en este disolvente, la producción de las amidas incrementa de manera significativa. De hecho, en la mayoría de los casos, la producción de las amidas fue similar a la de los ésteres incluso con amidas, que por sus características estructurales resultan de carácter hidrofóbico reducido dado que se encuentran constituidas por el ácido butírico (C_4). Esta pérdida de quimioselectividad nos llevó a suponer que en *n*-hexano se generan interacciones cooperativas entre los productos que promueven la acumulación de las amidas.

Al efectuar una cuantificación teórica de este tipo de interacciones mediante el uso del modelo COSMO-RS, los cálculos de los coeficientes de actividad termodinámica nos permitieron concluir que en 2M2B la acumulación selectiva de las amidas sobre la de los ésteres se debe principalmente a que en este disolvente los coeficientes de actividad de las amidas son menores que los de los ésteres correspondientes. De hecho, los coeficientes de actividad en 2M2B mostraron que independientemente de la temperatura del medio y de la longitud del residuo acilo, las amidas presentan un coeficiente menor que los de los ésteres correspondientes. Además se observó que en ninguna circunstancia los valores de los coeficientes de actividad de los ésteres en este disolvente hidrofílico se modificarán por la presencia de la amida producida. En consecuencia, esta diferencia entre los coeficientes de actividad de los productos permite una mayor acumulación de las amidas que la de los ésteres y en función de ello concluimos que en 2M2B la acumulación preferencial de las amidas está termodinámicamente más favorecida que la de los ésteres. Por otro lado, si bien los cálculos de los coeficientes de actividad de las amidas y de los ésteres en hexano muestran que los de las amidas son superiores a los de los ésteres y por consiguiente, validan los rendimientos obtenidos en las reacciones independientes en donde hay una acumulación preferencial de los ésteres, éstos son inconsistentes con la producción de las amidas en las reacciones mezcladas. En este caso, los cálculos mediante COSMO-RS mostraron que a causa de la generación de interacciones cooperativas entre los ésteres y las amidas, los coeficientes de actividad de las amidas se reducen de manera significativa al incrementar la fracción molar de los ésteres. Dicho de otra manera, en hexano la acumulación de amidas incrementa en las reacciones mezcladas debido a que la generación de interacciones cooperativas con el éster producido disminuyen los coeficientes de actividad de las amidas, lo que a su vez promueve su acumulación al equilibrio.

Los análisis tanto de las reacciones experimentales como el de los cálculos teórico cuánticos nos permitieron concluir en el diseño de medios de reacción apropiados para la manipulación de la quimioselectividad en la acilación de moléculas bifuncionales (**Figura 4.2.**).

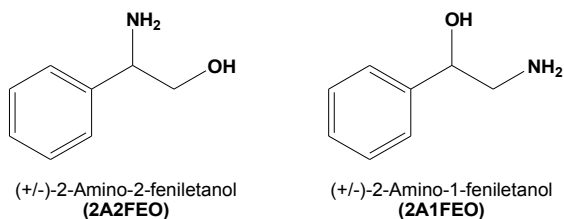


Figura 4.2. Estructura molecular de los sustratos bifuncionales (amino-alcohol).

Sin embargo, estas reacciones resultaron en modelos poco demostrativos del fenómeno en cuestión debido a que estas moléculas son susceptibles a reacciones de acil-migración. Para contener con este proceso intramolecular se propuso el uso del ácido piválico para evitar la migración del acilo, desafortunadamente, la lipasa (CaL-B) fue incapaz de reconocer a este ácido como donador de acilo. Bajo este panorama y al no contar en esta etapa con un modelo de estudio experimental eficiente, se recurrió al uso de datos experimentales reportados en la literatura relacionados con la acilación selectiva de amino-alcoholes y al uso del modelo COSMO-RS. De esta manera demostramos que los resultados reportados para la acilación del 6-amino-1-hexanol y el ácido oleico catalizada por CaL-B se explican mediante los valores obtenidos en los cálculos de los coeficientes de actividad. Es decir que, en función de la hidrofobicidad del medio de reacción, los menores coeficientes de actividad correspondieron a los productos para los cuales se reporta una mayor acumulación al equilibrio.

Con estos resultados concluimos que la quimioselectividad enzimática puede ser manipulada por medio de la apropiada elección de la hidrofiliidad/hidrofobicidad del medio de reacción. En particular, encontramos que la acumulación preferencial de los productos está determinada por diferencias entre los valores de los coeficientes de actividad termodinámica de los productos, mismos que a su vez están determinados por las interacciones entre los productos y los medios de reacción. En este sentido, demostramos que en disolventes hidrofílicos como el 2M2B las amidas tiene valores de coeficientes de actividad menores que los de los ésteres y en consecuencia las amidas se acumulan en mayor proporción que los ésteres. Por el contrario, en disolventes hidrofóbicos como el *n*-hexano los coeficientes de actividad termodinámica de los ésteres son menores que los de las amidas y por ello, el equilibrio está favorecido hacia la acumulación preferencial de ésteres.

4B. INTRODUCCIÓN

Hasta ahora, los resultados de este proyecto han mostrado que la versatilidad catalítica de la lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B) no se restringe a la transformación de ésteres, sino que su diversidad se extiende a la resolución efectiva de alcoholes y aminas quirales mediante la combinación de reacciones de acilación e hidrólisis. Una gran parte de las moléculas de interés industrial contienen varios grupos funcionales. En el caso de los compuestos de aplicación farmacológica, además del componente quiral, la variabilidad estructural aumenta la complejidad de las reacciones de síntesis pues están constituidos por un alto porcentaje de moléculas polifuncionales. De hecho, los grupos funcionales más representativos son las aminas y/o amidas y los alcoholes y/o ésteres, que en conjunto abarcan el 45% del total de moléculas con actividad farmacológica. Resulta importante subrayar entonces que desde el punto de vista del desarrollo de nuevas herramientas biocatalíticas para la síntesis de este tipo de compuestos, estos procesos no solo tienen que contemplar la capacidad enantioselectiva de los catalizadores sino que deben considerar aspectos que permitan el debido control de la quimioselectividad.

Como se ha establecido con anterioridad la capacidad estereoselectiva de las enzimas es considerada como una característica intrínseca a la estructura del sitio activo y su vecindad. Así, en años recientes, el avance de las metodologías de biología molecular y de ingeniería de proteínas han permitido manipular dicha selectividad a través de la modificación de la arquitectura del sitio activo o del sustrato. Por lo contrario, el control de la quimioselectividad, uno de los principales inconvenientes en síntesis orgánica, ha sido muy poco abordado en el área de las biotransformaciones. De hecho, es frecuente que cuando los sustratos contienen varios grupos funcionales susceptibles a la transformación por una enzima promiscua, normalmente el resultado de las reacciones concluye en mezclas complejas de productos indeseados. Por ejemplo, en la acilación de moléculas bifuncionales, tales como los aminoalcoholes, la nucleofilicidad del grupo amino y la estabilidad termodinámica de la amida, hacen de la esterificación del hidroxilo una tarea realmente complicada. Para conseguir selectividad química en moléculas bifuncionales la estrategia más recurrida es la protección y desprotección los grupos amino; esto conlleva a metodologías de varias etapas que resultan en producciones con rendimientos discretos.

Para contender con este problema los métodos enzimáticos han propuesto dos estrategias distintas. Por un lado, algunos reportes describen que modificaciones entre la relación ácido:base (agente acilante:amina) cambian el estado de ionización del grupo amino por medio de la formación de sales, lo que deriva en la protección aparente de la amina. En otras palabras, el objetivo de este tipo de estrategias está dirigido a aumentar o disminuir el poder nucleofílico del grupo amino lo que favorece o previene la N- sobre la O-acilación, respectivamente^{95,8,9}. Por otro lado, diferentes reportes han demostrado que el 2- metil- 2- butanol (2M2B) es un disolvente propicio para la síntesis de amidas y no así para la síntesis de ésteres^{12,64} (**CAPÍTULO 1**). Inversamente, en la síntesis de ésteres por medio de lipasas se obtiene altos rendimientos en disolventes hidrofóbicos como el *n*-hexano^{10,64}.

Bajo este panorama, en este capítulo se presenta un estudio de la manipulación de la quimioselectividad abordado desde un enfoque termodinámico. En efecto, se propone que es

posible controlar la quimioselectividad a través de alteraciones al equilibrio termodinámico mediante la ingeniería de disolventes, cambios en la temperatura e incluso con modificaciones en la polaridad del producto. Es importante destacar que en esta estrategia no se altera la naturaleza de las especies ni se recurre a la protección directa o indirecta de los nucleófilos. Nuestra propuesta toma como punto de partida la definición de la constante de equilibrio termodinámico (K_{eq} **Ec.11**), que para cualquier reacción puede ser expresada como el producto de K_γ y K_x (**Ec.13**). De esta manera se sugiere que mediante cambios específicos sobre la composición del medio de reacción se generarán alteraciones en K_γ (236) y en consecuencia sobre K_x .

$$K_{eq} = \frac{a_{ester} * a_{agua}}{a_{alcohol} * a_{acido}}, \text{ en donde } a_i = \gamma_i * X_i \quad \text{Ec. 11}$$

entonces,

$$K_{eq} = K_\gamma * K_x$$

dado que

$$K_\gamma = \frac{\gamma_{ester} * \gamma_{agua}}{\gamma_{alcohol} * \gamma_{acido}} \text{ y } K_x = \frac{X_{ester} * X_{agua}}{X_{alcohol} * X_{acido}} \quad \text{Ec. 13}$$

Particularmente, modificaciones en el valor de K_γ son el reflejo de cambios en las interacciones específicas entre los reactivos y productos con el medio de reacción. Estas interacciones entre los solutos y el disolvente son determinadas entre otros factores por las cargas, polaridad e hidrofobicidad de los componentes de la solución. De tal manera que para cada especie, las interacciones que pueda generar, comprendidas en el coeficiente de actividad termodinámica, estarán en función de la estructura molecular, los grupos funcionales y los tipos de enlace internos tanto del soluto como del solvente. Una manera práctica y cómoda de comprender el sentido del coeficiente de actividad de un compuesto en un disolvente puede ser interpretada como analogía a la solubilidad de una especie en otra. En este sentido, muchos de los factores que promueven la solubilidad de un soluto como lo son los puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e incrementos en la temperatura, reflejan disminuciones en el coeficiente de actividad de la especie. El objetivo central de este capítulo está orientado al desarrollo de herramientas que permitan manipular la acumulación preferencial al equilibrio de amidas o ésteres al reducir (o aumentar) el coeficiente de actividad termodinámico de la especie deseada (o indeseada). Para este propósito, se modificaron los coeficientes de actividad termodinámica de los productos en reacciones de amidación y esterificación por medio de cambios en la polaridad y temperatura del medio de reacción. Además, se exploraron cambios en la acumulación selectiva de los productos al equilibrio mediante alteraciones en la polaridad de los productos con el uso de diferentes nucleófilos y ácidos carboxílicos. Lo anterior se apoya en la generación de interacciones más convenientes que permiten la acumulación preferencia al equilibrio de los productos. Esta estrategia puede definirse como “Equilibrium Polarity-Tuning” (EPT) y puede ser interpretada como una estrategia para modular el equilibrio termodinámico mediante la modificación de la polaridad del medio de reacción. Finalmente, los resultados experimentales de esta sección se explican mediante cálculos de química cuántica y termodinámica estadística. Estos cálculos se emplearon para obtener los valores de las energías de interacción entre los productos de las reacciones y los disolventes. Se calcularon energías debidas a, puentes de hidrógeno (HB), fuerzas de Van der Waals (VDW), acomodo (Misfit) y la suma de ellas (E-

Total). Así mismo, la contribución de cada energía se empleó para calcular el potencial químico de las especies en el medio de reacción para entonces estimar los coeficientes de actividad termodinámica de cada producto en el medio de reacción. El cálculo de los parámetros anteriores se llevó a cabo mediante el uso del modelo teórico conocido como “Conductor-like Screening Model for Real Solvents” (COSMO-RS)¹⁰⁴. Este modelo resulta una aproximación confiable a la solución de problemas reales dado que integra cálculos de química cuántica, interacciones electrostáticas, modelos de continuidad dieléctrica y termodinámica estadística. Con el análisis de los resultados derivados de los cálculos cuánticos en combinación con los obtenidos experimentalmente, se provee de un nuevo panorama alternativo para la manipulación de la quimioselectividad y más aún, se proponen estrategias para la predicción y control de esta selectividad.

4C. MATERIALES Y MÉTODOS

4C.1. MATERIALES

Novzyme 435 (la lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada CaL-B) fue amablemente suministrada por Novozymes A/C (México). El etanol (HPLC), 2-propanol (HPLC), 2-metil-2-butanol (99.7%) y *n*-hexano (99%) fueron adquiridos de J.T. Baker (Xalostoc, México). La (*rac*)- y (R)-(+)-1-fenil-etilamina, el (*rac*)- y (R)-(+)-1-fenil-etanol, la (*rac*)- y (R)-(+)- β -metilfenetilamina (99%), el (*rac*)- y (R)-(+)-2-fenil-1-propanol (97 y 98%), (*rac*)- y (R)-(+)-1-fenil-1-propanol (97 y 99%), el clorhidrato de vainillinamina (98%), el 4-hidroxi-3-metoxibencilalcohol (98%), la bencilamina (99%), el bencilalcohol (99%), el ácido cáprico (99%) y butírico (99%) así como el tamiz molecular (5 A, 8-12 mesh) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Madison, WI, USA).

4C.2. REACCIONES ENZIMÁTICAS

Todas las reacciones se llevaron a cabo en viales de 15ml sellados con teflón con agitación magnética controlada. En las reacciones con un solo sustrato monofuncional, los nucleófilos y el donador de acilo se adicionaron a concentraciones equimolares (20mM) en 10ml de 2-metil-2-butanol (2M2B) ó *n*-hexano, ambos previamente deshidratados con tamiz molecular. Para las reacciones en las que los nucleófilos (amina:alcohol) se encuentran mezclados, se estableció una concentración del donador de acilo (40mM) correspondiente a la suma de la molaridad de ambos nucleófilos. Las reacciones se iniciaron mediante la adición de 10mgml⁻¹ de Novozyme 435 y se tomaron muestras de 200 μ l en intervalos de 3, 6, 9, 12, 24, 36 y 48h. En la mayoría de los casos el equilibrio se alcanzó antes de las 48h de transcurrida la reacción. Para las reacciones realizadas a 10°C o temperaturas inferiores, se prepararon muestras de 1ml de volumen de reacción para cada tiempo. Una vez transcurrido el tiempo correspondiente se adicionaron 0.5ml de etanol para evitar la precipitación de los productos. Antes de la adición del etanol es preciso filtrar el medio de reacción para remover la enzima de tal manera que se evite la esterificación de este alcohol.

4C.3. ANÁLISIS POR HPLC

Previo al análisis por HPLC las muestras se centrifugaron a 16g durante 5min para precipitar la enzima y el tamiz molecular. La conversión de las reacciones se estimó al determinar la concentración residual de los sustratos por HPLC mediante una curva de calibración. Para ello, se utilizó un controlador Waters 600E a un flujo de 1ml min⁻¹ equipado con un detector

Waters 996 PDA. La bencilamina ($t_r = 3.2\text{min}$) y el bencilalcohol ($t_r = 3.8\text{min}$) se detectaron a 210nm y se separaron con una columna Spherisorb 80-5 ODS-2 (4.6 x 250mm, Waters Corp. Milford, MA, USA), utilizando una fase de elución compuesta por metanol:agua (80:20 v/v). Todos los alcoholes quirales se separaron con una columna Chiralcel OB-H (4.6 x 250mm, ChiralTech) con una fase de elución compuesta por *n*-hexano:2-propanol (90:10 v/v). Los estereoisómeros de las aminas se separaron mediante una columna Crownpak CR+ (4.0 x 150mm, ChiralTech), para lo que se utilizó agua a pH 1.5 (HClO_4) y una temperatura de columna ajustada a 10°C mediante una bomba de enfriamiento Lauda Ecoline RE-106.

4C.4. TEORÍA COSMO-RS

La teoría conocida como “Conductor-like Screening Model for Real Solvents” (COSMO-RS) se ha descrito en detalle en varias publicaciones^{104,105,106}. De manera general, COSMO-RS comienza con la representación de una estructura molecular en 2 dimensiones y concluye con el cálculo del potencial químico en casi cualquier disolvente o mezcla de disolventes. COSMO-RS es una teoría que permite calcular por métodos químico cuánticos (QM) la energía de interacción entre superficies moleculares. La teoría COSMO-RS parte del planteamiento QM-COSMO, el cual proporciona una estimación del potencial químico simulando la superficie discreta de la especie embebida en un conductor virtual. Para esta superficie, cada segmento i está caracterizado por un área (a_i) y una densidad de carga de apantallamiento (screening charge density SCD, σ_i Figura 4.3.).

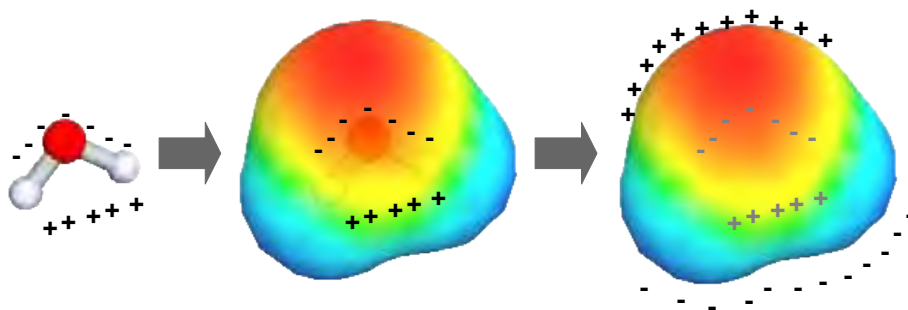


Figura 4.3. Ilustración del proceso del modelo COSMO-RS. De izquierda a derecha, se muestra a la molécula de agua con sus respectivas cargas, después a la molécula con sus cargas embebida en una cavidad de un medio continuo y por último una imagen con la densidad de carga de apantallamiento (SCD) de la superficie de la cavidad, generada por las interacciones electrostáticas entre la molécula y el medio.

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

$$E_{misfit}(\sigma, \sigma') = a_{eff} \frac{\alpha'}{2} (\sigma + \sigma')^2 \quad \text{Ec. 14}$$

En donde a_{eff} es el área efectiva de contacto entre segmentos de las superficies moleculares del soluto y el disolvente con densidades de carga σ y σ' . En esta ecuación α' es un parámetro de interacción ajustable. Así mismo, COSMO-RS considera la energía de interacción generada por puentes de hidrógeno (E_{HB}) entre las especies del sistema; misma que también depende de las densidades de carga (SCD):

$$E_{HB} = a_{eff} c_{HB} \min(0; \min(0; \sigma_{donor} + \sigma_{HB}) \max(0; \sigma_{acceptor} - \sigma_{HB})) \quad \text{Ec. 15}$$

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

$$E_{vdW} = a_{eff} (\tau_{vdW} + \tau'_{vdW}) \quad \text{Ec. 16}$$

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

$$\mu_s(\sigma) = -\left(\frac{RT}{a_{eff}}\right) \ln \left[\int p_s(\sigma') \exp \left\{ \frac{a_{eff}}{RT} [\mu_s(\sigma') - E_{misfu}(\sigma, \sigma') - E_{HB}(\sigma, \sigma')] \right\} d\sigma' \right] \quad \text{Ec. 17}$$

Por medio de esta ecuación (Ec.17) el potencial químico del compuesto X_i en el sistema S_i está disponible para la integración del potencial (σ -potential) sobre la superficie de X_i , el cual puede ser empleado para calcular el coeficiente de actividad γ_{xi} en S :

$$\gamma_{xi}^S = \exp \left[\frac{\mu_s^{X_i} - \mu^X}{RT} \right] \quad \text{Ec. 18}$$

En esta ecuación, μ_s y μ_x son los potenciales químicos de la especie X en S y en X puro, respectivamente.

4C.5. CÁLCULOS COSMO-RS

Las estructuras moleculares de los compuestos empleados en este estudio, incluidos los disolventes, se esquematizaron como estructuras de dos dimensiones y subsecuentemente se transformaron en geometrías de 3 dimensiones mediante el software Marvin 5.2 (v.2008 ChemAxon <http://www.chemaxon.com/>). Con este programa también se calcularon 20 confómeros para cada estructura con diferencias energéticas de $1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ entre cada confómero. Los cálculos COSMO se realizaron con el paquete TURBOMOLE 5.7 a un nivel de teoría de funcionales de la densidad BP (B88-VWN-P86) con un set de valencia triple-z polarizada (TZVP). Todos los cálculos COSMO-RS se llevaron a cabo en el software

COSMOthermX-2.1 (COSMO/logic GmgH & Co, KG, Leverkusen, Alemania). La parametrización BP_TZVP_C21_0105 se empleó para obtener la mejor calidad en la predicción.

4D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la discusión de los siguientes resultados se debe considerar que el coeficiente de actividad termodinámica (γ) de una molécula es una relación que expresa la compatibilidad de esa molécula con un disolvente determinado. En otras palabras, es una representación de la diferencia entre la energía de interacción con más moléculas como ella y con moléculas de otra especie. Dicho de otra manera, el coeficiente de actividad termodinámica de un compuesto en un disolvente se considera como una medida de las interacciones que se generan entre ellos. Un valor bajo de γ indica mayor fuerza entre las interacciones del soluto y el disolvente. Considerando a la definición de la constante de equilibrio en términos de la actividad termodinámica (**Ec. 11**), si el soluto es el producto de una reacción enzimática, entonces al disminuir el valor del coeficiente de actividad (γ) por un efecto de estabilización mediado por el disolvente, se favorecerá de manera importante la acumulación de dicha especie en el medio de reacción (**X**). Por el contrario, para evitar la síntesis de un producto se busca un medio de reacción que aumente el coeficiente de actividad de dicha especie y disminuya en consecuencia su fracción molar en el equilibrio. Bajo este razonamiento, en este capítulo se propone una estrategia para manipular la quimioselectividad en la síntesis de ésteres y amidas. Dado que el enlace amida es de naturaleza hidrofílica y la del éster hidrofóbica, se analizará el efecto del 2M2B (disolvente hidrofílico) y del hexano (disolvente hidrofóbico) en la transformación selectiva de amidas y ésteres.

4D.1. SÍNTESIS DE AMIDAS Y ÉSTERES EN HEXANO Y 2M2B

La primera aproximación en el desarrollo de herramientas quimioselectivas consistió en reacciones de amidación y esterificación con un solo sustrato monofuncional (reacciones independientes), en dos disolventes de polaridad contraria (*n*-hexano y 2M2B). Las reacciones de acilación de varios compuestos (**1-5** **Figura 4.4.**) se llevaron a concentraciones equimolares de ácido cáprico (**C**₁₀) y nucleófilo (20mM) en 10ml de disolvente a 45°C. En todos los casos se empleó CaL-B como catalizador (10mg ml⁻¹). Las conversiones al equilibrio se muestran en la **Figura 4.5**. En las reacciones en la que intervienen sustratos quirales (**2**, **3** y **4**) se utilizaron mezclas racémicas como material de inicio. Para estos casos, la enantioselectividad se calificó en términos del exceso enantiomérico (**ee**) y el valor de **E** (**Tabla 4.1.**).

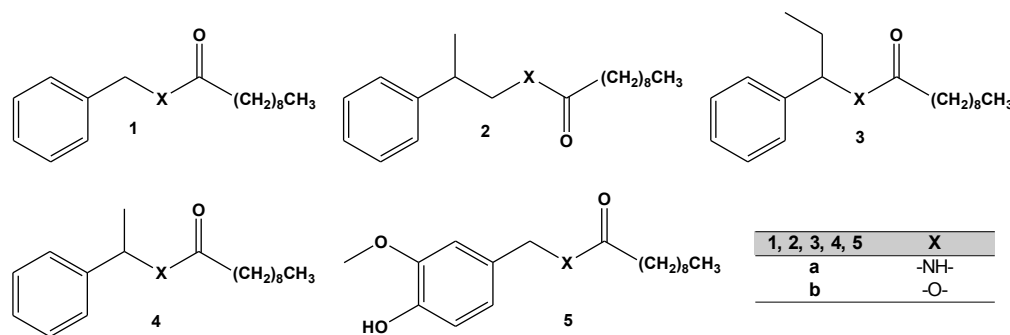


Figura 4.4. Estructura molecular de los productos de las reacciones de acilación con el ácido cáprico (**C**₁₀) catalizadas por CaL-B. **X** refiere a la amida (a: -NH-) ó el éster (b: -O-).

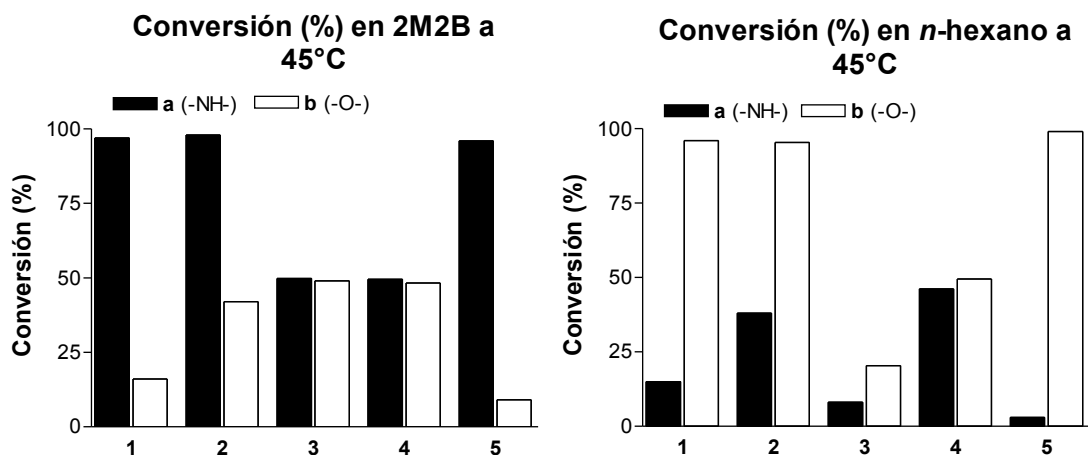


Figura 4.5. Conversiones de las reacciones de amidación (negro) y esterificación (blanco) en 2M2B (izq.) y n-hexano (der.).

De los resultados que se muestran en la figura anterior, se pueden hacer algunas inferencias sobre la dependencia de la quimioselectividad en función de la polaridad del medio de reacción para reacciones independientes. Como se esperaba, en 2M2B se obtuvo una alta producción de amidas (**1a**, **2a** y **5a**) y escasos rendimientos en la síntesis de los ésteres correspondientes (**1b**, **2b** y **5b**). Contrariamente, en el disolvente hidrofóbico y aprótico (*n*-hexano), la producción de ésteres es mucho mayor que la obtenida para las amidas. Como se describió en el [CAPÍTULO 3.](#), CaL-B es una lipasa altamente enantioselectiva en el reconocimiento de alcoholes secundarios y aminas estructuralmente análogas. Por esta razón, la producción de **3** y **4** tanto para ésteres como amidas en 2M2B y en hexano no excede el 50%. Es probable que debido a ese límite restringido por la enantioselectividad de la lipasa, la conversión no permite observar la preferencia quimioselectiva que se obtiene con los demás productos. Es interesante notar que la alta conversión de los ésteres **3b** y **4b** en 2M2B, comparada con la moderada producción de los mismo en hexano, sugieren que la hidrofiliidad de estas moléculas les permite acumularse en el 2M2B y no así en el disolvente hidrofóbico. La intensidad de este efecto es más clara al comparar entre las reacciones llevadas a cabo en 2M2B y hexano para los derivados **3** en donde podemos observar que la hidrofiliidad tanto de la amida (**3a**) como del éster (**3b**) no les permite acumularse en hexano y si en 2M2B. Estos resultados sugieren que, tanto las amidas como los ésteres, tienen un carácter hidrofílico y que las interacciones de estas moléculas con el 2M2B promueven su acumulación al equilibrio, contrario a lo que sucede en hexano. En otras palabras, podemos suponer que no existe una diferencia significativa entre los coeficientes de actividad termodinámica de los ésteres y las amidas **3** y **4** en 2M2B, de tal forma que se promueva la acumulación preferencial de alguna de las dos especies. Más aún, de acuerdo a que la acumulación de estos ésteres y amidas en 2M2B se encuentra favorecida, también es posible suponer que los coeficientes de actividad de estos compuestos en este disolvente son moderados. Dado que las producciones tanto de la amida (**3a**) como del éster (**3b**) en hexano no son superiores al 25% y que en 2M2B llegan al límite que la enantioselectividad de CaL-B les permite (50%), podemos suponer que los compuestos son de carácter hidrofílico; es decir, que los coeficientes de actividad de estos compuestos son bajos o moderados en 2M2B y elevados en hexano.

En términos de la enantioselectividad, independientemente de la naturaleza del disolvente y del grupo funcional de la molécula, se puede observar que en las reacciones de los sustratos **3** y **4** se obtienen altos excesos enantioméricos (ee_s). Sin embargo, se obtienen mayores valores de **E** en 2M2B como resultado de las altas conversiones alcanzadas para ambos grupos funcionales en dicho disolvente (Tabla 4.1.). Más aún, cabe notar que en acuerdo al modelo de Kazlauskas, cuando el grupo funcional no participa como sustituyente del carbono quiral, CaL-B pierde sus capacidades enantioselectivas (**2a** y **2b** Tabla 4.1.).

Tabla 4.1. Conversión y parámetros enantioselectivos para la condensación del ácido cáprico (**C**₁₀) y sustratos quirales (**2**, **3** y **4**) catalizadas por CaL-B.

Prod.	2M2B			<i>n</i> -hexano		
	Conv (%) ¹	ee (%) ²	E value	Conv (%) ¹	ee (%) ²	E value
2a	98.1	-	-	38.3	-	-
2b	42.1	-	-	95.4	-	-
3a	49.8	99	587	8.1	99	4
3b	49.1	98	150	20.4	99	6
4a	49.5	99	350	46.2	99	60
4b	48.3	98	100	49.5	99	350

¹ Conversiones al equilibrio obtenidas en función del 100% de la mezcla racémica.

² Exceso enantiomérico de los sustratos. En todos los casos se obtuvo una selectividad por el enantiómero (*R*).

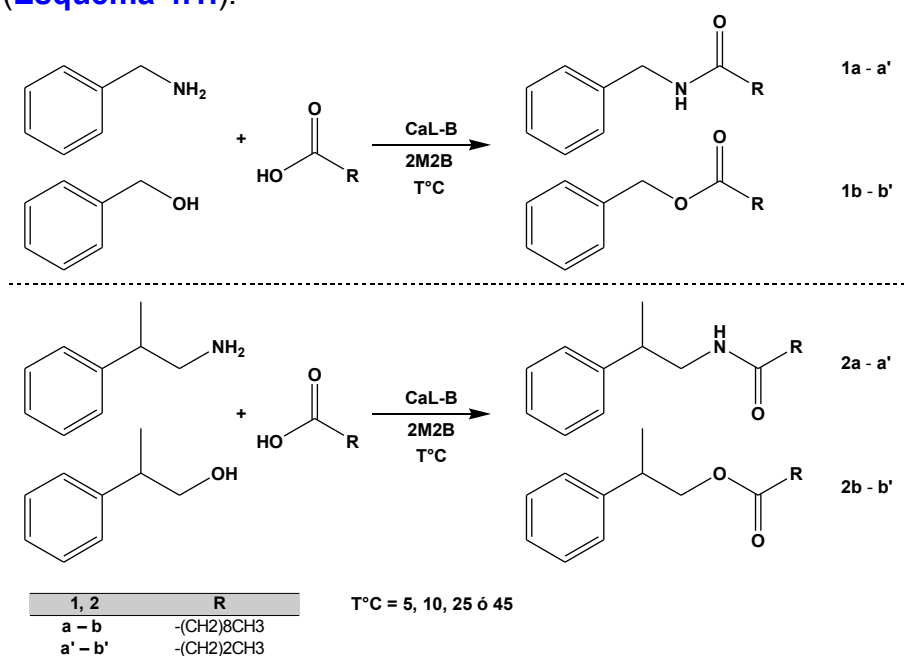
En los resultados que se han mostrado hasta ahora, incluidos los del **CAPÍTULO 1.**, se ha manifestado que el 2M2B es un disolvente propicio para la acumulación de compuestos polares e hidrofílicos; y en particular, para la producción de amidas dada su naturaleza hidrofílica. En cambio, se ha mencionado que el hexano, disolvente de naturaleza hidrofóbica, es un medio adecuado para la síntesis de ésteres. Es importante mencionar que el tipo de enlace en muchas ocasiones no es suficiente para clasificar la naturaleza hidrofílica o hidrofóbica de las moléculas y que para ello deben tomarse en cuenta todas las características estructurales de la especie. Si bien hasta ahora se ha expresado que las amidas por su tipo de enlace pueden considerarse como moléculas de naturaleza hidrofílica, existen amidas que por su estructura adquieren características hidrofóbicas (*p.e.* amidas poliaromáticas o con cadenas alifáticas con alto contenido de carbonos). Así mismo, se pueden encontrar ésteres que, pese al tipo de enlace, sean de naturaleza hidrofílica como al parecer, por sus conversiones al equilibrio en 2M2B, resultan los productos **3b** y **4b**.

Dado que las reacciones de amidación y esterificación hasta ahora presentadas se han llevado a cabo de manera independiente, en 2M2B o hexano, solo podemos describir una quimioselectividad aparente determinada por la polaridad del disolvente. Por tanto, la exploración en el control de la quimioselectividad nos condujo a realizar ensayos de competencia entre ambos productos por el mismo disolvente. Dado que el propósito de este proyecto refiere a una estrategia para la manipulación de la quimioselectividad al equilibrio por medio de ingeniería de disolventes, la transformación de ambos nucleófilos debe acercarse a la potencial producción total. Por tal motivo, se llevó a cabo la síntesis de ésteres y amidas en reacciones de acilación con mezclas de aminas y alcoholes que comparten la misma estructura molecular (**Esquema 4.1.**). Para determinar la capacidad discriminatoria del disolvente al equilibrio, en estas reacciones la cantidad del donador de acilo (40mM) se ajustó a la suma de las concentraciones de amina (20mM) y alcohol (20mM). Además, para modular los coeficientes de actividad termodinámica de los productos y modificar los perfiles

de producción de estas reacciones mezcladas, se empleó una estrategia que denominamos “Equilibrium Polarity-Tuning Strategy” (EPTS). Con esta metodología se realizó un análisis en el que se manipula el equilibrio por modificaciones en la temperatura y la polaridad tanto los disolventes como de los productos.

4D.2. SÍNTESIS QUIMIOSELECTIVA DE AMIDAS

Los resultados que se reportan en las secciones anteriores manifiestan que en 2M2B se obtienen altos rendimientos en la producción de amidas. Sin embargo esto solo puede ser interpretado como una quimioselectividad aparente debido a la falta de información de reacciones en la que ésteres y amidas compiten por las interacciones con un mismo disolvente. Para comprender con mayor profundidad los factores que permiten controlar y manipular la quimioselectividad en 2M2B hacia la acumulación preferencial de amidas se exploró la influencia en la quimioselectividad por la presencia del éster correspondiente (**Esquema 4.1.**).



Esquema 4.1. Reacciones de amidación y esterificación mezcladas en el que se emplea al 2M2B como medio de reacción. Como donadores de acilo se utilizaron el ácido butírico (C₄) y el ácido cáprico (C₁₀). Las reacciones se llevaron a cabo a varias temperaturas (10-45°C).

La estrategia EPT seleccionada fue aplicada en la acilación de mezclas de amina (20mM) y alcohol (20mM) (**Esquema 4.1.**) con dos donadores de acilo (40mM) de distinto tamaño (C₄ ó C₁₀). Las reacciones se llevaron a cabo en 2M2B (10ml) a distintas temperaturas y fueron catalizadas por medio de CaL-B (10mg ml⁻¹). De las reacciones se cuantificó la conversión de ambos nucleófilos al equilibrio (~48h). Los resultados de estos ensayos se muestran en la **Tabla 4.2.**

Tabla 4.2. Conversiones de las reacciones de acilación de las aminas (**1-2**, **a-a'** 20mM) y alcoholes (**1-2**, **b- b'** 20mM) catalizadas por CaL-B en 2M2B. Las reacciones se llevaron a cabo con dos agentes acilantes, el ácido cáprico (**C₁₀**) y butírico (**C₄**) (40mM).

Conversión (%)						Conversión (%)					
T °C	Prod.	a	b	Total ¹	che ²	T °C	Prod.	a'	b'	Total ¹	che ²
45	1	96.08	29.84	0.63	0.53	45	1	92.59	28.65	0.61	0.53
25	1	93.68	18.25	0.56	0.67	25	1	88.64	21.61	0.55	0.61
						10	1	63.40	19.21	0.41	0.53
						5	1	19.01	3.20	0.11	0.71

Conversión (%)						Conversión (%)					
T °C	Prod.	a	b	Total ¹	che ²	T °C	Prod.	a'	b'	Total ¹	che ²
45	2	84.63	4.22	0.44	0.91	45	2	74.45	22.99	0.49	0.53
25	2	83.11	16.58	0.50	0.67	25	2	72.34	18.24	0.45	0.60
10	2	74.51	25.66	0.50	0.49	10	2	66.74	35.29	0.51	0.31
						5	2	63.27	30.94	0.47	0.34

¹ La conversión total está expresada como (a+b)/200.

² che es el exceso químico del producto expresado como (a-b)/(a+b). Este valor tiene similitud con el exceso enantiomérico para las reacciones enantioselectivas. El rango de este valor es de -1.0 para la producción de ester puro, y de 1.0 para la producción de amida pura.

En estas reacciones, la quimioselectividad hacia la producción de amidas es persistente a cualquier temperatura e independiente de la naturaleza del producto (**1** ó **2**, **a** ó **a'**) como lo refleja el valor positivo del exceso químico (**che** **Tabla 4.2.**). Es interesante notar que independientemente de la estructura del producto, la producción de las amidas (**1a-a'** y **2a-a'**) a 25 y 45°C es elevada y que solo a temperaturas inferiores los rendimientos decrecen pero siguen siendo favorables para la formación de amidas. Al igual que los resultados observados en el **CAPÍTULO 1**, para una gran gama de amidas análogas a la capsaicina así como en las reacciones independientes de la sección anterior, en la síntesis de las amidas tanto **1a** y **a'** como **2a** y **a'** en 2M2B a 45°C se obtienen rendimientos por arriba del 90%. Esto confirma que independientemente de la estructura de los productos, la síntesis de amidas en 2M2B está ampliamente favorecida (**Figura 4.6.**), y sobre todo que la estrategia termodinámica planteada para el control de la quimioselectividad resulta por demás apropiada. Además, lo anterior sugiere que los coeficientes de actividad termodinámica de las amidas son suficientemente bajos de tal forma que el equilibrio está fuertemente desplazado hacia la acumulación de estos productos. Por otro lado, los decrementos en la producción de las amidas a temperaturas inferiores a 25°C pueden ser interpretados como una consecuencia de la ley de Arrhenius (**Ec. 19**), misma que describe el decaimiento exponencial de cualquier constante, incluida la de equilibrio, en función de la temperatura.

$$K = Ae^{\frac{-Ea}{RT}} \quad \text{Ec. 19}$$

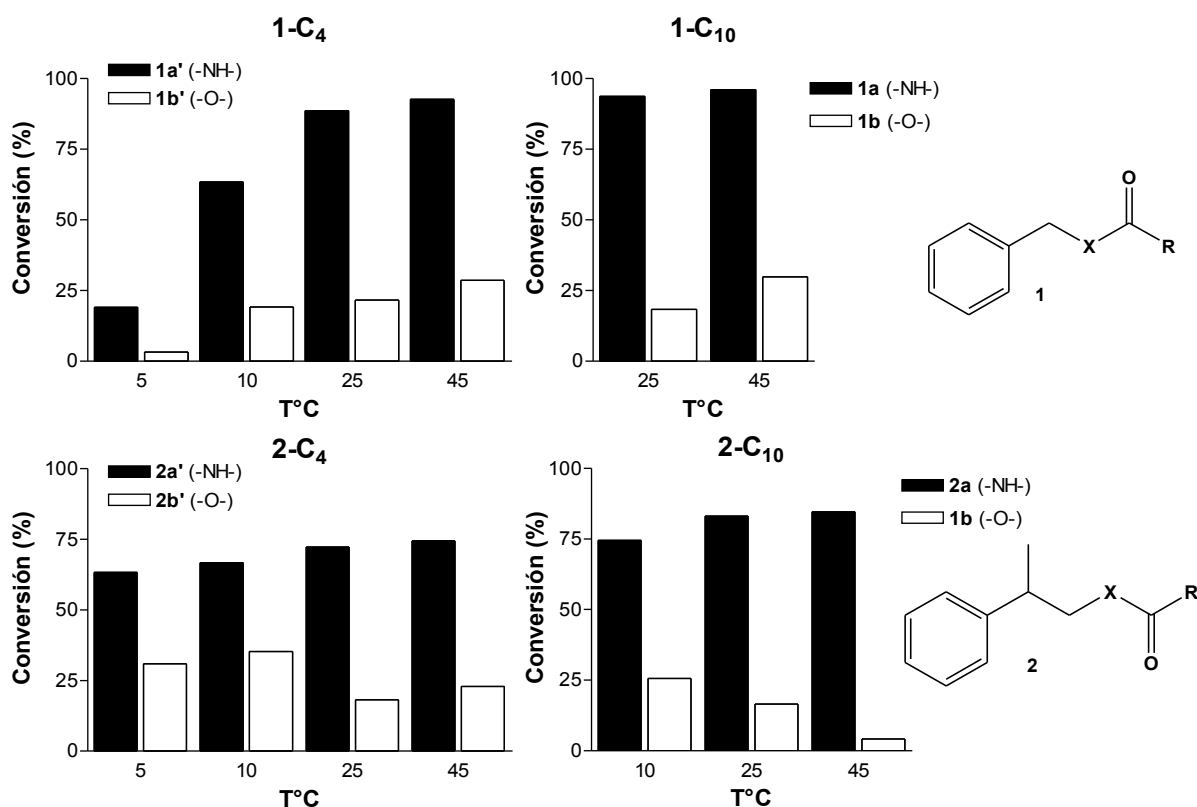


Figura 4.6. Producción de amidas (**a-a'** negro) y ésteres (**b-b'** blanco) comprendidas por nucleófilos con diferentes estructuras moleculares y ácidos carboxílicos de distinta longitud. Todas las reacciones fueron catalizadas por Cal-B y se llevaron a cabo en 2M2B a diferentes temperaturas.

En términos de la producción de los ésteres, se puede observar que en la mayoría de las reacciones la síntesis de los ésteres (**1b-b'** y **2b-b'**) no excede el 25% de conversión. Estos escasos rendimientos pueden ser interpretados como coeficientes de actividad termodinámica elevados que limitan la acumulación de los ésteres en 2M2B. De hecho, las bajas conversiones de los ésteres **1b'** y **2b'**, en los que a pesar de haber disminuido su hidrofobicidad con la incorporación de un residuo acilo pequeño (**C₄**), sugieren que la naturaleza hidrofóbica del enlace es más que suficiente para restringir su acumulación en el 2M2B.

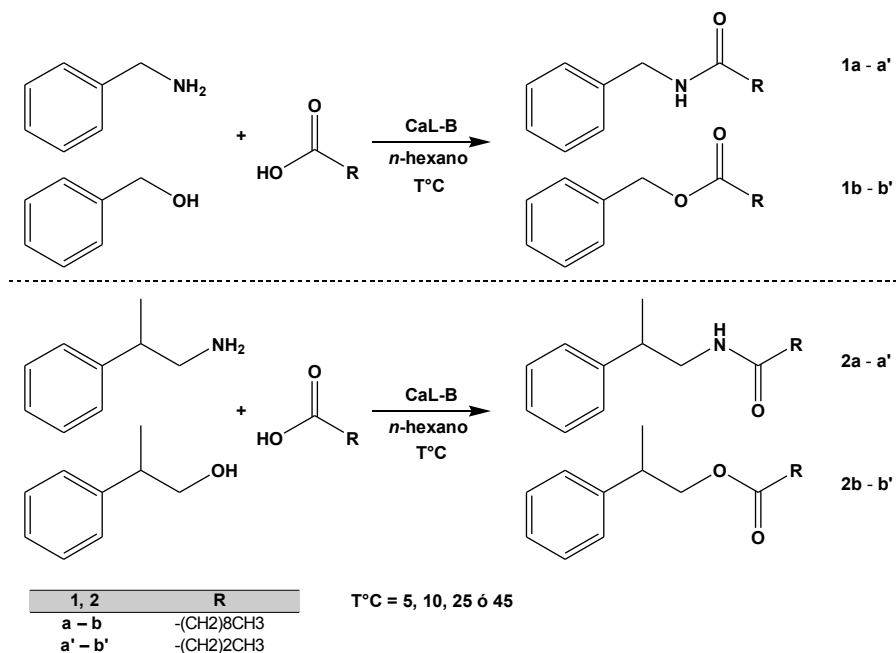
Las consideraciones anteriores nos permiten reafirmar que en 2M2B la producción de las amidas que hemos presentado está ampliamente favorecida. Los resultados que hasta ahora se han mostrado permiten suponer que los coeficientes de actividad termodinámica de las amidas en 2M2B son suficientemente bajos de tal forma que el equilibrio se encuentra ampliamente desplazado hacia la producción de las mismas. De hecho, independientemente de la estructura del producto, tanto del nucleófilo como del tamaño del donador de acilo y la temperatura, en el 2M2B se favorece claramente la quimioselectividad hacia la producción de amidas sobre aquella de los ésteres correspondientes. Los resultados de las reacciones independientes y mezcladas nos llevan a suponer que en 2M2B los coeficientes de actividad termodinámica de las amidas son sistemáticamente menores que aquellos de los ésteres

correspondientes y que por lo tanto la acumulación de las amidas se encuentra termodinámicamente más favorecida que la de los ésteres. Más aún, dado que los productos comparten la misma estructura molecular podemos inferir que son las diferencias en la hidrofiliidad de los enlaces lo que en este caso promueve la quimioselectividad hacia la producción de las amidas. Dicho de otra manera, es muy probable que sea la hidrofiliidad del enlace amida y la hidrofobicidad del éster lo que resulta favorable para la producción preferencial de las amidas en 2M2B.

Es importante enfatizar que con estas herramientas, desarrolladas para controlar la quimioselectividad, ahora somos capaces de resolver una mezcla alcohol:amina mediante la acumulación preferencial de amidas. La observación experimental de esta sección contribuye a fortalecer la hipótesis que se refiere a la manipulación de la quimioselectividad mediante la modificación de los coeficientes de actividad de los productos como consecuencia de la modulación de la hidrofiliidad del medio de reacción. Así, sugerimos que al disminuir los coeficientes de actividad de las amidas con el empleo del 2M2B como medio de reacción resulta en una posibilidad para llevar a cabo resoluciones quimioselectivas de amino-alcoholes dirigidas a la producción de la amida. Si bien esta herramienta enzimática podría ser suficiente para controlar la quimioselectividad en amino-alcoholes mediante la transformación selectiva del amino, en el contexto de este trabajo resulta interesante desarrollar las herramientas necesarias para manipular la quimioselectividad en ambos sentidos, tanto para la N- como para la O-acilación. Por tal motivo, en los ensayos de la siguiente sección se exploró la capacidad del *n*-hexano para discriminar la producción de amidas y favorecer la síntesis de los ésteres. Este razonamiento considera que, por los resultados obtenidos en las reacciones independientes, es probable que los coeficientes de actividad de las amidas en *n*-hexano sean superiores a los de los ésteres y que en consecuencia se favorezca la producción de los ésteres al equilibrio cuando esta estrategia se aplique a mezclas alcohol:amina.

4D.3. SÍNTESIS QUIMIOSELECTIVA DE ÉSTERES

Los resultados de las reacciones independientes llevadas a cabo en *n*-hexano presentados en este capítulo muestran una alta producción de ésteres (**1b**, **3b** y **5b**), mientras que para las amidas (**1a**, **3a** y **5a**) la acumulación se encuentra restringida (**Figura 4.5**). Estos resultados, complementados con información de la literatura, sugieren que el *n*-hexano es un medio apropiado para la acumulación de moléculas de carácter hidrofóbico. En consecuencia, en esta sección se aplica la estrategia EPT con el objetivo de obtener una herramienta quimioselectiva para la producción preferencial de ésteres en *n*-hexano. Para el desarrollo de esta metodología, al igual que en la sección anterior, se empleó a CaL-B (10mg ml⁻¹) como biocatalizador en la producción de amidas y ésteres mediante la acilación de mezclas de amina (20mM) y alcohol (20mM) con dos ácidos carboxílicos distintos (40mM **C₄** ó **C₁₀**). Todas las reacciones se llevaron a cabo en *n*-hexano a diferentes temperaturas (**Esquema 4.2**). La conversión de los nucleófilos se cuantificó hasta alcanzar el equilibrio (~48h). Los resultados de estas reacciones se muestran en la siguiente tabla.



Esquema 4.2. Reacciones de amidación y esterificación mezcladas en el que se emplea al *n*-hexano como medio de reacción. Como donadores de acilo se utilizaron el ácido butírico (**C₄**) y el ácido cáprico (**C₁₀**). Las reacciones se llevaron a cabo a varias temperaturas (10-45°C).

Tabla 4.3. Conversiones de las reacciones de acilación de las aminas (**1,2a** 20mM) y alcoholes (**1,2b** 20mM) catalizadas por CaL-B en *n*-hexano. Las reacciones se llevaron a cabo con dos agentes acilantes, el ácido cáprico (**C₁₀**) y butírico (**C₄**) (40mM).

T °C	Prod.	Conversión (%)			
		a	b	Total ¹	che ²
45	1	99.27	92.87	0.96	-0.03
25	1	56.12	63.17	0.60	0.06

T °C	Prod.	Conversión (%)			
		a'	b'	Total ¹	che ²
45	1	90.85	91.58	0.91	0.00
25	1	61.65	65.81	0.64	0.03
10	1	53.40	59.21	0.56	0.05
5	1	40.51	73.79	0.57	0.29

T °C	Prod.	Conversión (%)			
		a	b	Total ¹	che ²
45	2	99.13	93.08	0.96	-0.03
25	2	49.82	80.04	0.65	0.23
10	2	38.27	71.74	0.55	0.30

T °C	Prod.	Conversión (%)			
		a'	b'	Total ¹	che ²
45	2	80.57	84.21	0.82	0.02
25	2	39.33	84.68	0.62	0.37
10	2	65.76	93.10	0.79	0.17
5	2	74.16	92.58	0.83	0.11

¹ La conversión total está expresada como (a+b)/200.

² che es el exceso químico del producto expresado como (b-a)/(b+a). Este valor tiene similitud con el exceso enantiomérico para las reacciones enantioselectivas. El rango de este valor es de -1.0 para la producción de amida pura, y de 1.0 para la producción de ester puro.

De la tabla anterior resalta la alta producción de las amidas a 45°C, particularmente la producción de las amidas **1a** y **2a**. Los rendimientos obtenidos para la síntesis de amidas de estas reacciones resultan inconsistentes con los obtenidos para las reacciones independientes llevadas a cabo en hexano a las mismas condiciones (**Figura 4.5**). De hecho, en las reacciones mezcladas llevadas a cabo en *n*-hexano a 45°C se obtiene una producción elevada de amidas independientemente de la estructura molecular del producto (**Figura 4.7**). Es interesante notar que la quimioselectividad en *n*-hexano hacia la producción de ésteres, referida como pureza química (**che**), se incrementa al emplear como donador de acilo al ácido butírico (**C₄**). Esto puede deberse a un aumento de la hidrofiliidad de las

amidas al estar constituidas por un acilo, que comparado con el ácido cáprico (C_{10}), es de menor hidrofobicidad, que a su vez puede ser interpretado como un aumento en los coeficientes de actividad de las amidas butíricas en *n*-hexano. Es importante notar que incluso los rendimientos en la síntesis de las amidas menos hidrofóbicas ($1a'$ y $2a'$), son superiores que los obtenidos en las reacciones independientes en las que se producen amidas de mayor hidrofobicidad dado que se comprenden por una cadena hidrocarbonada de mayor tamaño (C_{10}). En términos de la elevada acumulación de las amidas en *n*-hexano cuando las reacciones se encuentran mezcladas, dado que en las reacciones independientes la producción de estos compuestos no excede el 40%, suponemos que en las reacciones mezcladas se generan interacciones cooperativas entre el éster y la amida tales que repercuten en una disminución de los coeficientes de actividad de las amidas y que en consecuencia, incrementan la capacidad de las amidas para acumularse en el *n*-hexano. En otras palabras, sugerimos que la presencia del éster en el *n*-hexano reduce el coeficiente de actividad de la amida por medio de interacciones cooperativas que no suceden en las reacciones independientes de amidación, y que son esos decrementos en los coeficientes de actividad lo que promueve la producción de las amidas.

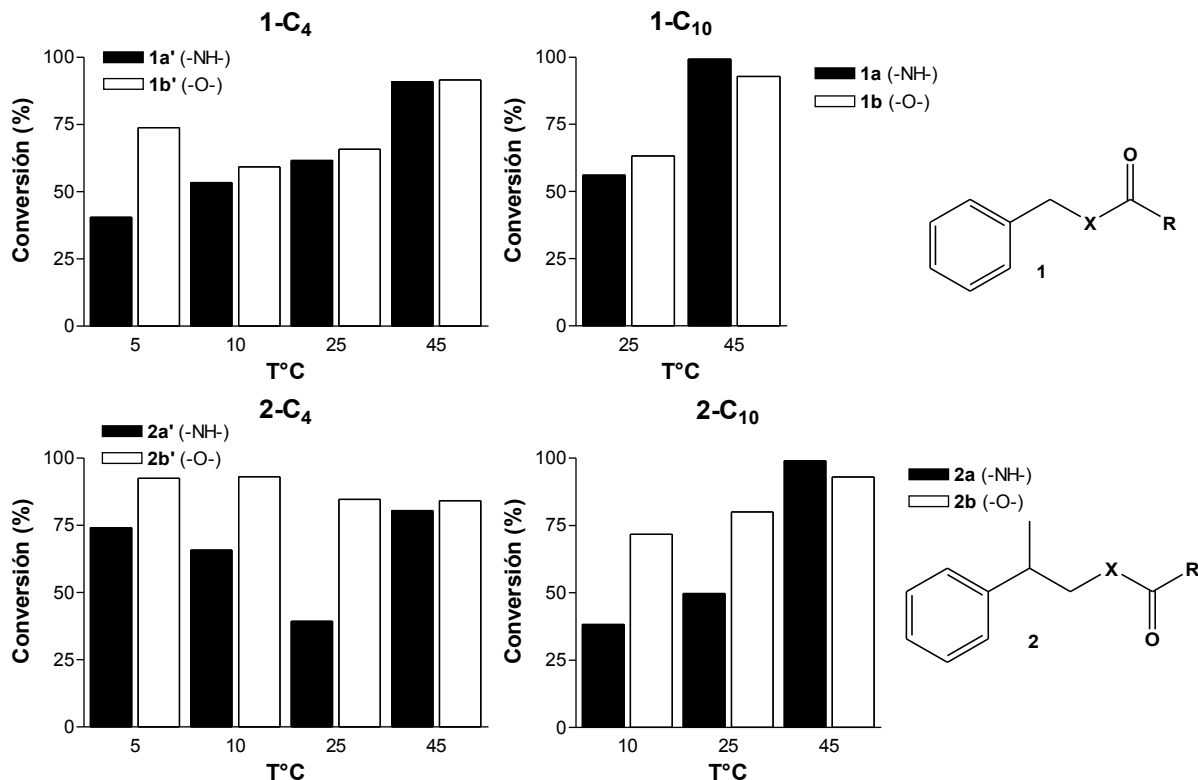


Figura 4.7. Producción de amidas (**a-a'** negro) y ésteres (**b-b'** blanco) comprendidas por nucleófilos con diferentes estructuras moleculares y ácidos carboxílicos de distinta longitud. Todas las reacciones fueron catalizadas por Cal-B y se llevaron a cabo en *n*-hexano a diferentes temperaturas.

Si bien los niveles de quimioselectividad en *n*-hexano no fueron los esperados, el espacio explorado con nuestra estrategia de EPT permitió encontrar condiciones de reacción en las cuales la cantidad de éster sintetizado es considerablemente mayor que la acumulación de amida. En términos de la influencia de la temperatura sobre la quimioselectividad de la reacción se puede notar que los mayores valores de pureza química (**che**) se obtienen a

bajas temperaturas. Considerando que en la mezcla de las reacciones de amidación y esterificación en el *n*-hexano se pueden generar interacciones cooperativas entre los productos (éster-amida), al obtener quimioselectividad hacia la acumulación del éster a bajas temperaturas nos lleva a suponer que a esas condiciones, mientras que la energía de las interacciones cooperativas se reduce, los coeficientes de actividad de las amidas incrementa de manera tal que pese a la cooperatividad entre el éster y la amida, el elevado coeficiente de la amida disminuye su acumulación al equilibrio. Dicho de otra manera, se propone que al descender la temperatura del *n*-hexano disminuye la energía de interacción entre las amidas y el disolvente (interpretado como incremento en el coeficiente de actividad de las amidas) y que la magnitud de ese decremento es superior a las alteraciones en la energía de las interacciones cooperativas.

De acuerdo a estos resultados, se puede concluir que la acumulación preferencial de ésteres en *n*-hexano requiere de un control termodinámico más estricto dada la probable generación de interacciones cooperativas entre el éster y la amida correspondiente. Es importante resaltar que estas interacciones cooperativas entre las especies promueven la síntesis de productos indeseados. En particular, la presencia de los ésteres en el hexano produce un aumento en la síntesis de las amidas que no sucede cuando la reacción de amidación se lleva a cabo de manera independiente. Ello nos conduce a sugerir que dada esta cooperatividad entre las especies, los coeficientes de actividad de las amidas en hexano sufren una reducción y que en consecuencia estos productos se acumulan en mayor proporción que cuando las reacciones de amidación en hexano se llevan a cabo de manera independiente. Desde un punto de vista cinético, observamos que en la mayoría de las reacciones con mezclas de nucleófilos llevadas a cabo en hexano, la síntesis de los ésteres es mucho más rápida que la de las amidas, independientemente del nucleófilo, del donador de acilo y de la temperatura (**Figura 4.8.**). Esta diferencia entre la cinética de amidación y esterificación se observó incluso a condiciones en las que resulta difícil controlar la selectividad al equilibrio, tales como las reacciones llevadas a cabo a 25°C en las que se emplea al ácido cáprico como donador de acilo (**Figura 4.7.**). Cabe notar que la síntesis del éster alcanza el equilibrio en cuestión de minutos (~40min) mientras que a la amidación tarda algunas horas en llegar al equilibrio (<30h **Figura 4.8.**). Más aún, se observó que en algunos casos la producción de la amida sufre una fase *Lag*, probablemente debida a que la producción de la amida no inicia hasta que se sintetiza una concentración determinada del éster. Este retardo en las reacciones de amidación sugiere que la producción de las amidas inicia una vez que la cantidad del ester sintetizado es suficiente para favorecer la acumulación de las amidas. Estas observaciones proponen, una vez más, que en las reacciones mezcladas se producen interacciones cooperativas entre los ésteres y las amidas, y que la formación de esas interacciones promueven la acumulación de las amidas.

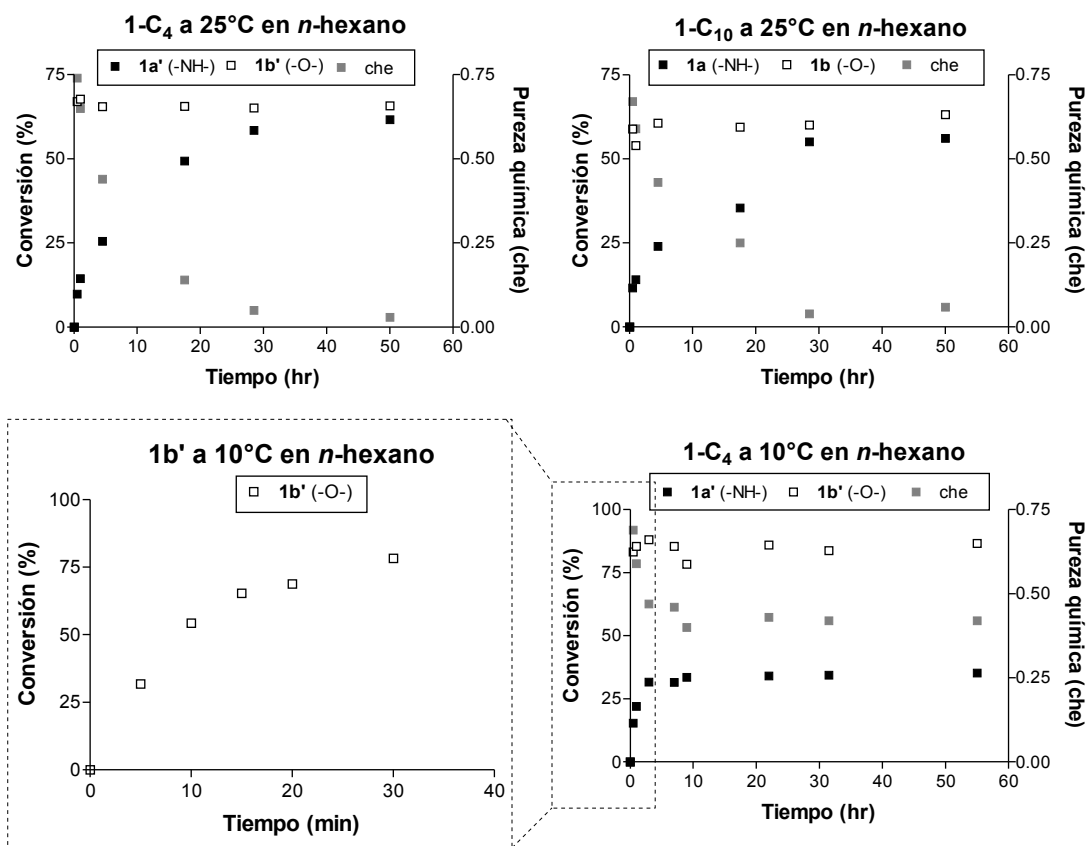


Figura 4.8. Perfil cinético de las reacciones de amidación (cuadros negros) y esterificación (cuadros blancos) en las reacciones con mezclas de nucleófilos llevadas a cabo en *n*-hexano a 10 y 25°C con los donadores de acilo C_4 y C_{10} . El gráfico de la esquina inferior izquierda es un acercamiento a los primeros 40min de la reacción de esterificación a 10°C con el ácido butírico (C_4).

A pesar de los resultados inesperados obtenidos en la producción de amidas en *n*-hexano, la estrategia para modular la quimioselectividad mediante modificaciones a la polaridad del medio (EPT), permitió desarrollar herramientas para la producción preferencial de ésteres al equilibrio. Se mostró que un proceso quimioselectivo puede estar constituido por herramientas dirigidas a la modificación de los coeficientes de actividad termodinámica de los productos para modular su acumulación al equilibrio y por estrategias que refieren al control cinético. Al igual que en la síntesis preferencial de amidas en 2M2B, la síntesis quimioselectiva de ésteres en hexano resulta en una herramienta útil para la transformación selectiva de moléculas bifuncionales como los amino-alcoholes.

4D.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS COEFICIENTES DE ACTIVIDAD TERMODINÁMICA POR COSMO-RS

La estrategia EPT propuesta en esta sección del proyecto permitió explorar la influencia de las condiciones del medio sobre la quimioselectividad de la reacción. Esta metodología permitió observar experimentalmente el efecto de la polaridad del disolvente, la hidrofobicidad de los productos y la temperatura del medio para manipular y controlar procesos enzimáticos quimioselectivos. Con el fin de generalizar las conclusiones que refieren a la apropiada elección (o diseño) del medio de reacción para controlar la

quimioselectividad enzimática a un mayor espectro de moléculas, a continuación se presenta un enfoque teórico cuántico. Esta aproximación permite calcular el potencial químico y el coeficientes de actividad termodinámica (γ) de las especies químicas a las condiciones experimentales mostradas anteriormente. En consecuencia, estos cálculos teóricos se integrarán y discutirán en términos de los resultados experimentales obtenidos en las secciones anteriores. Es preciso recordar que el coeficiente de actividad termodinámica de una molécula es un parámetro que expresa la compatibilidad de esa molécula en un disolvente determinado y que bajo la definición de la constante de equilibrio, aumentar o disminuir el coeficiente de actividad de los productos restringe o favorece la acumulación de esa especie al equilibrio, respectivamente.

En términos de la quimioselectividad observada experimentalmente en las reacciones independientes llevadas a cabo en 2M2B (Figura 4.5.), la conclusión fue que los valores de los coeficientes de actividad termodinámica de las amidas deberían ser inferiores a los de los ésteres en todos los casos en donde la acumulación de amidas se encuentra favorecida. En efecto, al realizar los cálculos correspondientes mediante el método COSMO-RS, los resultados muestran estar de acuerdo con lo obtenido experimentalmente (Figura 4.9.). Es decir, dado que en todos los casos, salvo para los productos **5a** y **5b**, los coeficientes de actividad de las amidas son menores que aquellos de los ésteres correspondientes en 2M2B a 45°C, la acumulación de las amidas al equilibrio está favorecida. En otras palabras, dado que los coeficientes de las amidas son menores que los de los ésteres, la acumulación preferencial de la amidas en 2M2B se encuentra termodinámicamente favorecida. En este sentido, la quimioselectividad observada en 2M2B, en la que se favorece la producción de las amidas sobre la de los ésteres, debe estar fuertemente determinada por las diferencias entre los coeficientes de actividad.

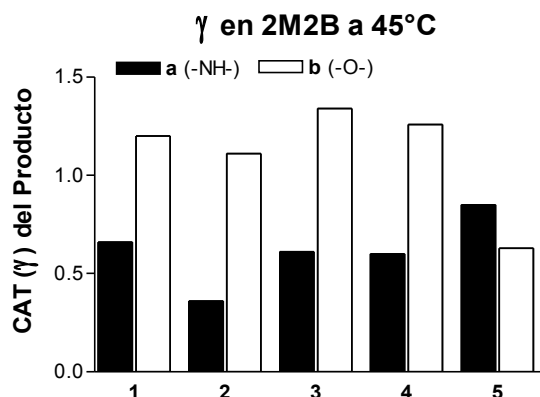


Figura 4.9. Coeficientes de actividad termodinámica (CAT) de las amidas (**a-a'**, negro) y ésteres (**b-b'**, blanco) calculados en 2M2B a 45°C.

En acuerdo a la definición de la constante de equilibrio y en congruencia con los valores de los coeficientes de actividad termodinámica de los productos calculados en 2M2B a 45°C, se puede concluir que a menor coeficiente de actividad (γ) mayor será la fracción molar de la especie (X_i) al equilibrio de la reacción, y que esta relación corresponde a una actividad termodinámica (a_i) requerida para satisfacer el valor de la constante de equilibrio (K_{eq}).

$$K_{eq} = \frac{a_{ester} * a_{agua}}{a_{alcohol} * a_{acido}} \quad a_i = \gamma_i * X_i \quad \text{Ec. 11}$$

Así mismo, para las reacciones llevadas a cabo en 2M2B con la mezcla de nucleófilos, el coeficiente de actividad termodinámica de las amidas (**1a-a'** y **2a-a'**) también resultó menor que el de los ésteres (**1b-b'** y **2b-b'**) a todas las condiciones evaluadas experimentalmente (Figura 4.10.). Así entonces estos resultados están de acuerdo con la acumulación preferencial observada en 2M2B (Figura 4.6.), debido a las diferencias entre los coeficientes de actividad de las amidas y de los ésteres. Estas diferencias son consistentes independientemente de la estructura del producto (**1a-a'** ó **2a-a'**) así como de la temperatura del medio de reacción. Resulta interesante notar que los valores de los coeficientes de actividad de los productos (ésteres y amidas) no se modifican significativamente en función de la temperatura. Por ello, en acuerdo a la definición de la constante de equilibrio termodinámico (K_{eq} Ec. 11) y en congruencia con los valores de los coeficientes de actividad de los productos, se puede concluir que en 2M2B los cambios proporcionales en K_x obedecen la ley de Arrhenius. Es decir que a mayor temperatura, el rendimiento en la producción de amidas aumenta y como resultado se obtienen mayores valores de quimioselectividad (che Tabla 4.2.). Esta robustez de los coeficientes de actividad observada en 2M2B permite entonces controlar los procesos quimioselectivos por medio de variaciones en la temperatura. Estos resultados muestran entonces que COSMO-RS proporciona, por medio de los cálculos de los coeficientes de actividad termodinámica, información útil para la predicción cualitativa de aspectos quimioselectivos en 2M2B.

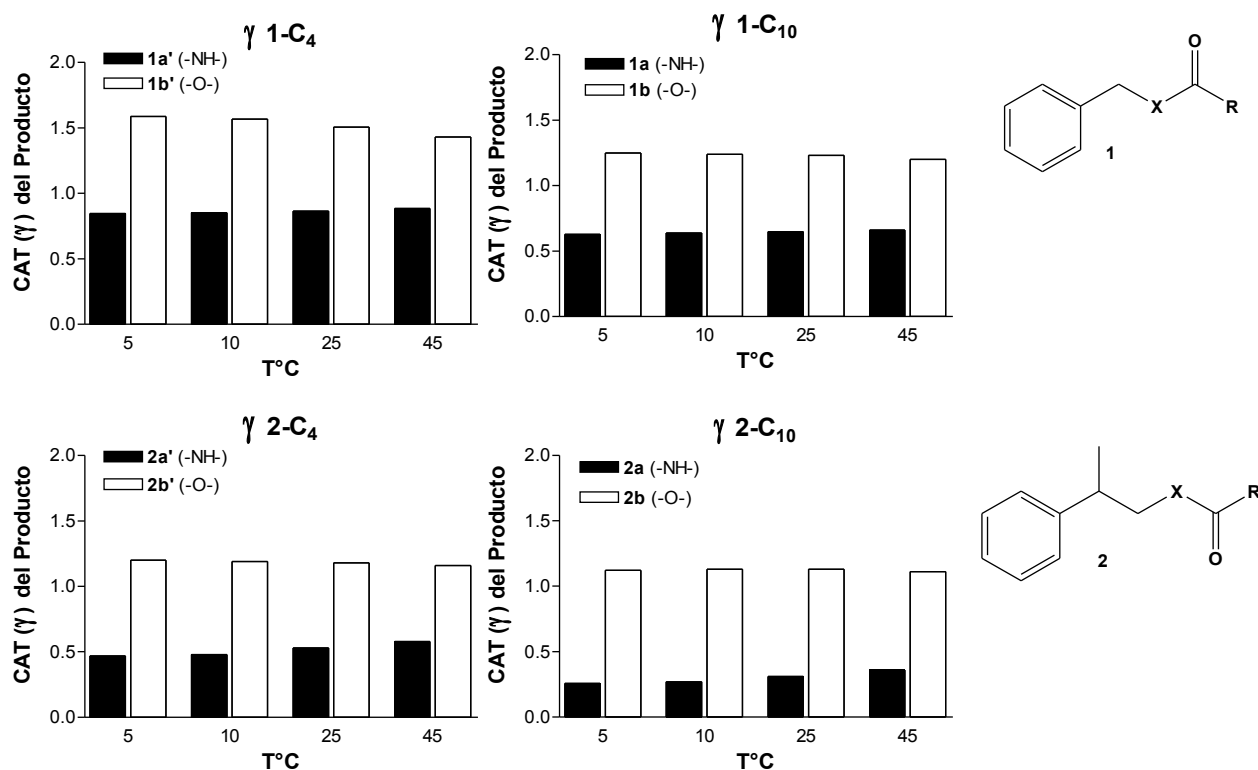


Figura 4.10. Coeficientes de actividad termodinámica (CAT) de amidas (**a-a'**, negro) y ésteres (**b-b'**, blanco) en 2M2B. Los coeficientes de actividad termodinámica se calcularon a dilución infinita a diferentes temperaturas.

Por otro lado, la correlación entre los coeficientes de actividad termodinámica de los productos calculados en *n*-hexano y los resultados experimentales para las reacciones llevadas a cabo en este disolvente no es tan claro como en el caso del 2M2B. Sin embargo, los cálculos COSMO-Rs de los valores de los coeficientes de actividad permiten realizar algunas suposiciones. En este sentido es interesante notar que los coeficientes de actividad de los productos calculados en hexano a 45°C (Figura 4.11.), muestran que los coeficientes de actividad de los ésteres, independientemente de la estructura nucleofílica, son menores que los de las amidas correspondientes. En consecuencia, en este medio de reacción cuando las reacciones se llevan a cabo de manera independiente, la acumulación de los ésteres se encuentra termodinámicamente favorecida y la de las amidas se vuelve totalmente desfavorecida (Figura 4.5.)

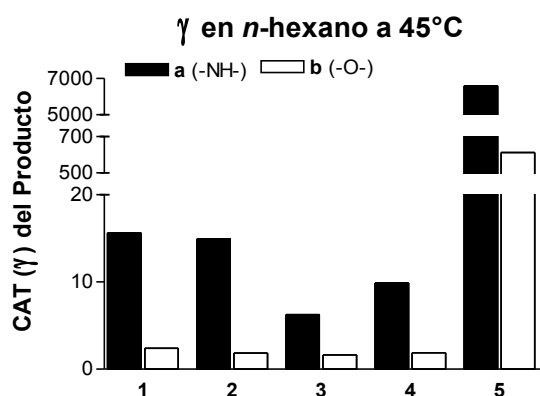


Figura 4.11. Coeficientes de actividad termodinámica (CAT) de las amidas (**a-a'**, negro) y ésteres (**b-b'**, blanco) calculados en *n*-hexano a 45°C

Con respecto a las reacciones llevadas a cabo con la mezcla de nucleófilos en *n*-hexano, se observa que para las amidas comprendidas por la estructura nucleofílica **1**, al comparar los coeficientes de actividad a una misma temperatura, se obtienen amplias diferencias con el cambio de donador de acilo (Figura 4.12.). A pesar de estas diferencias, la acumulación preferencial de los ésteres con este tipo de nucleófilo (**1**) solo se obtiene a 5°C y cuando se emplea el ácido butírico (**C₄**) como donador de acilo (Figura 4.7.). Cabe mencionar que a estas condiciones (*n*-hexano a 5°C), y con estos derivados (**1C₄**), las diferencias entre los coeficientes de la amida y del ester son hasta de 2 órdenes de magnitud.

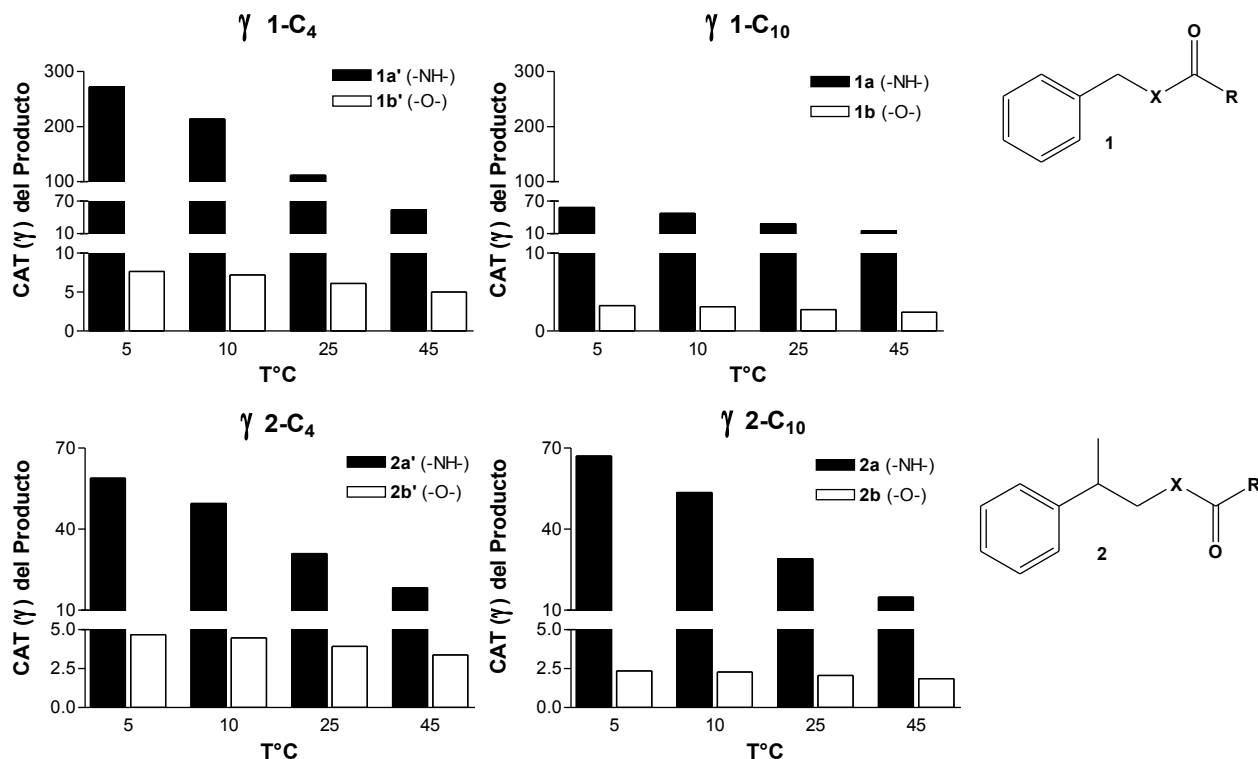


Figura 4.12. Coeficientes de actividad termodinámica (CAT) de amidas (**a-a'**, negro) y ésteres (**b-b'**, blanco) en *n*-hexano. Los coeficientes de actividad termodinámica se calcularon a dilución infinita a diferentes temperaturas.

Por otro lado, para los productos de la estructura nucleofílica **2**, aunque las diferencias entre los coeficientes de actividad es menor que para aquellos con la estructura **1**, la producción quimioselectiva de ésteres se logra en un mayor rango de condiciones. En la mayoría de los casos, los coeficientes de actividad termodinámica de las amidas tienen un comportamiento inversamente proporcional a la temperatura; es decir, el valor de los coeficientes de actividad de las amidas aumenta al disminuir la temperatura del *n*-hexano. Esto sugiere que al disminuir la temperatura del *n*-hexano la energía de las interacciones de la amida con el disolvente disminuyen y este efecto puede ser interpretado como una disminución de la solubilidad de las amidas al disminuir la temperatura del medio. En cambio, los coeficientes de actividad de los ésteres en función de la temperatura permanecen constantes. Esto propone que la energía de las interacciones entre el *n*-hexano y los ésteres son muy estables y que estas no se perturban al disminuir la temperatura. En otras palabras, que los coeficientes de actividad de los ésteres en *n*-hexano sean constantes en función de la temperatura nos habla de la alta solubilidad de los ésteres en este medio y que la compatibilidad entre las especies es tan alta que ésta no se modifica sustancialmente ni al disminuir la temperatura. En este sentido, contrariamente a lo observado para las reacciones en 2M2B, para obtener un mayor grado de quimioselectividad hacia la producción de ésteres, se propone que en las reacciones en *n*-hexano no es necesario incrementar la temperatura del medio. De hecho, para este sistema, el mayor grado de quimioselectividad hacia la

producción de ésteres, entendida como mayor pureza química (**che**), se obtiene en hexano a bajas temperaturas (**Tabla 4.3.**). Desde otro punto de vista, dado que la interacción entre estos ésteres y el *n*-hexano son estables y robustas, la manipulación de la quimioselectividad dirigida hacia la síntesis preferencial de ésteres sobre la de las amidas puede ser dirigida hacia la búsqueda o diseño de un medio de reacción más hidrofóbico que el *n*-hexano. El concepto de esta aproximación se basa en incrementar el coeficiente de actividad de las amidas por medio de un disolvente de mayor hidrofobicidad en el que se mantengan reducidos los coeficientes de actividad de los ésteres, en una estrategia que simule el efecto observado al reducir de la temperatura del *n*-hexano.

Como se ha mencionado con anterioridad, los incrementos en la producción de las amidas en *n*-hexano producidas en las reacciones mezcladas sugieren interacciones cooperativas por la presencia de ambos productos en el medio. Para corroborar este fenómeno se realizaron los cálculos de los coeficientes actividad de las amidas en los que se varió la fracción molar del éster en el medio. Estos cálculos se realizaron con los compuestos **1-** y **2C₁₀** a 25°C en *n*-hexano a distintas fracciones molares de los ésteres dentro de las que se incluye la fracción molar experimental obtenida al equilibrio. En estos cálculos, la fracción molar de los ésteres se magnificó con el objetivo de resaltar el efecto de la incorporación de los productos en el medio. Así, las modificaciones de los coeficientes de actividad resultaron en decrementos en los coeficientes de actividad de las amidas (**Figura 4.13.**). Al incorporar en los cálculos distintas fracciones de los ésteres se describen alteraciones en el medio tales que favorecen la interacción de las amidas con el *n*-hexano. En otras palabras, los decrementos en los coeficientes de las amidas sugieren la generación de interacciones cooperativas que contribuyen a la estabilización de estos compuestos en *n*-hexano por medio de la presencia de los ésteres. Analizando los datos experimentales obtenidos para la producción de amidas y los ésteres correspondientes en *n*-hexano y comparando con los valores de los coeficientes de actividad para estas reacciones se puede sugerir que las interacciones entre las especies de la reacción y el medio, contribuyen de manera sustancial a la acumulación de las amidas en este disolvente.

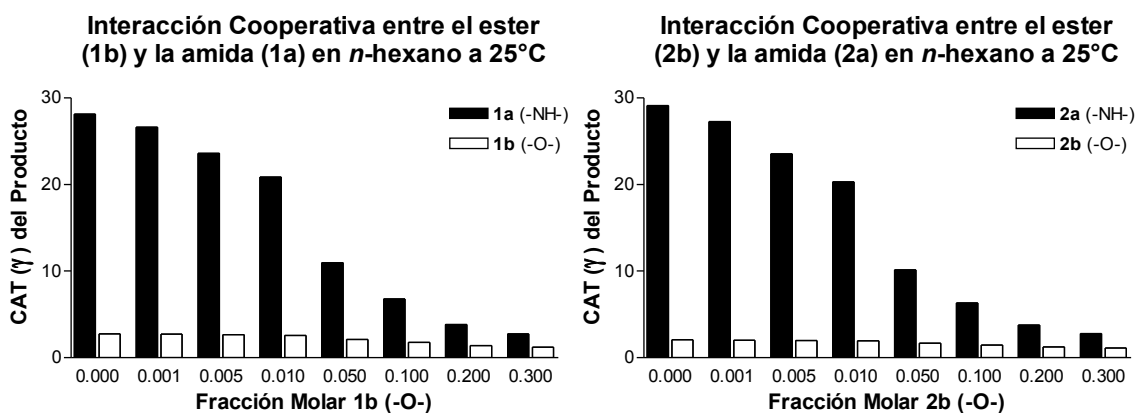


Figura 4.13. Coeficientes de actividad termodinámica (CAT) de las amidas (**a**, negro) y ésteres (**b**, blanco) en función de distintas fracciones molares del éster **1b** (izq) y **2b** (der) en *n*-hexano a 25°C.

Por otro lado, es importante subrayar que los coeficientes de actividad de los ésteres no se modifican sustancialmente al incrementar su fracción molar en *n*-hexano. Lo que puede interpretarse como una alta capacidad del *n*-hexano para interaccionar con los ésteres. En

este sentido, que los coeficientes de actividad de los ésteres sean constantes por la presencia de ellos en hexano es el reflejo de la alta solubilidad de estos compuestos en dicho medio. Un análisis detallado en relación a la disminución de los coeficientes de actividad de las amidas por la presencia de los ésteres en el medio de reacción, nos permite determinar que las interacciones cooperativas que se generan entre los compuestos se reflejan como incrementos en la energía de interacción debidas principalmente a la formación de puentes de hidrógeno (**E_{HB}** **Tabla 4.4.**). De acuerdo a los cálculos COSMO-RS, la energía de interacción entre la amida y el sistema (*n*-hexano:éster), en particular aquella que se debe a la generación de puentes de hidrógeno, aumenta a medida que la fracción molar del éster incrementa. Esto sugiere que cuando las reacciones de esterificación y amidación se llevan a cabo simultáneamente en *n*-hexano, se forman puentes de hidrógeno entre los productos que contribuyen a la solubilidad de la amida. En consecuencia, cuando las reacciones se mezclan, la presencia del éster permite una mayor acumulación de la amida que aquella que se produce cuando la síntesis de la amida se lleva a cabo de manera independiente en hexano. Este fenómeno, aunque solo presentado para la amida **1a**, también se observa con los derivados **2a**.

Tabla 4.4. Potencial químico (**μ**), energía de interacción total (energía interna **ET**), energía de misfit (**E_{Mis}**), energía por puentes de hidrógeno (**E_{HB}**) y energía de van der Waals (**E_{VDW}**) de la amida **1a** en función de la fracción molar del éster correspondiente (**1b**) en *n*-hexano a 25°C. Todas las energías y el potencial químico se encuentran en kcal mol⁻¹.

	Fracción Molar 1b (-O-) en <i>n</i> -hexano a 25°C						
	0.0000	0.0016	0.0100	0.0500	0.1000	0.2000	0.3000
Potencial Químico (μ)	-6.86	-6.91	-7.04	-7.42	-7.71	-8.04	-8.24
Energía de Interacción Total (ET)	-13.82	-13.93	-14.22	-14.60	-14.69	-14.64	-14.55
Energía de Misfit (E_{Mis})	3.78	3.76	3.72	3.74	3.82	3.98	4.13
Energía por Puentes de H (E_{HB})	0.00	-0.10	-0.38	-0.84	-1.04	-1.20	-1.28
Energía de van der Waals (E_{VDW})	-18.22	-18.23	-18.23	-18.21	-18.20	-18.17	-18.15

En términos de los cálculos de los coeficientes de actividad termodinámica realizados en *n*-hexano, podemos concluir que la presencia de los ésteres en el medio de reacción contribuyen de manera significativa a la estabilización de las amidas en este disolvente. De hecho, se sugiere que estas contribuciones son el reflejo de puentes de hidrógeno que se forman entre los ésteres y las amidas. Estas generalizaciones se fundamentan en el hecho de que la producción de las amidas en *n*-hexano se altera cuando en el medio también se lleva a cabo la síntesis de los ésteres análogos. Dado que *a priori* es imposible conocer la fracción molar resultante de las reacciones, la predicción de K_x para cualquier K_{eq} en hexano mediante el cálculo de K_γ puede resultar inapropiada. Sin embargo, el comportamiento de los coeficientes de actividad termodinámica de los productos en función de la temperatura del medio de reacción provee de una referencia para el control y manipulación de la quimioselectividad en *n*-hexano.

4D.5. RESOLUCIÓN ENZIMÁTICA QUIMIO- Y ENANTIOSELECTIVA DE MOLÉCULAS BIFUNCIONALES

Para esta sección se propone la resolución efectiva de moléculas bifuncionales quirales mediante el apropiado control termodinámico para manipular la quimioselectividad en provecho de la alta enantioselectividad de CaL-B. En el desarrollo de estas herramientas quimio- y enantioselectiva se plantearon dos moléculas bifuncionales modelo cuya

arquitectura molecular es una mezcla de las características estructurales de las aminas y alcoholes con los que se ha trabajado a lo largo del proyecto (**Figura 4.14.**)

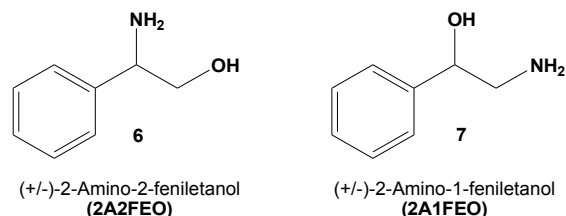


Figura 4.14. Moléculas bifuncionales empleadas para el desarrollo de herramientas quimio- y enantioselectivas.

Para la resolución del 2-amino-2-feniletanol (**6**) se propone manipular la quimioselectividad hacia la transformación del amino dado que es el grupo funcional que participa en el carbono quiral y es en la transformación de ese grupo cuando CaL-B es altamente enantioselectiva. En cambio, para la resolución quimio- y enantioselectiva del 2-amino-1-feniletanol (**7**), la acilación tendrá que dirigirse hacia la transformación selectiva del hidroxilo. Dado que estas moléculas contienen dos grupos funcionales susceptibles a ser transformados por CaL-B, la acilación de estos amino-alcoholes puede dar lugar a tres diferentes productos: la amida (**6a**, **7a**), el éster (**6b**, **7b**) y el producto diacilado (**6c**, **7c**) (**Figura 4.15.**).

Producto	X	Y	R1	R2
6a	-NH-	-O-	COO(CH ₂) ₈ CH ₃	-H
6b	-NH-	-O-	-H	COO(CH ₂) ₈ CH ₃
6c	-NH-	-O-	COO(CH ₂) ₈ CH ₃	COO(CH ₂) ₈ CH ₃
7a	-O-	-NH-	COO(CH ₂) ₈ CH ₃	-H
7b	-O-	-NH-	-H	COO(CH ₂) ₈ CH ₃
7c	-O-	-NH-	COO(CH ₂) ₈ CH ₃	COO(CH ₂) ₈ CH ₃

Figura 4.15. Estructuras de los posibles productos de la acilación de las moléculas bifuncionales y el ácido cáprico (**C₁₀**).

Para la resolución quimio- y enantioselectiva de los amino-alcoholes se diseñaron medios de reacción en los que los cálculos de los coeficientes de actividad mediante el modelo COSMO-RS sugirieran la acumulación preferencial al equilibrio de los productos interés (**6a** y **7b**). En este sentido, para la resolución del amino-alcohol **6**, la estrategia se orientó a buscar un medio de reacción en el que el coeficiente de la amida (**6a**) fuera inferior que el del éster (**6b**) y que el del producto diacilado (**6c**). Como se ha manifestado a lo largo de este capítulo, la acumulación preferencial de las amidas (moléculas hidrofílicas) se logra en medios de reacción de naturaleza hidrofílica como el 2M2B. Sin embargo, en este caso el 2M2B y el 2- metil-2-propanol (2M2P, disolvente ligeramente más hidrofílico que el 2M2B) no fueron suficientemente hidrofílicos para que el coeficiente de actividad de la amida (**6a**) fuera inferior que el de los otros dos posibles productos (**6b** y **6c**) (**Figura 4.16. A y B**). En efecto, para que esto ocurriera, se tuvo que diseñar un medio de reacción de extrema hidrofílicidad compuesto por una mezcla de 2M2P y 20% de dimetilsulfoxido (DMSO, **Figura 4.16. C y D**). Si bien incrementar la cantidad de DMSO en la mezcla resulta en una mayor diferencia entre los coeficientes de actividad de los productos, termodinámicamente favorable para la acumulación de la amida al equilibrio, a porcentajes de DMSO mayores que el 20% CaL-B pierde su actividad catalítica¹¹. Por esta razón, en la resolución quimio- y enantioselectiva del amino-alcohol **6**, los ensayos experimentales se limitaron al uso del 2M2B, 2M2P y 2M2P:DMSO (80:20).

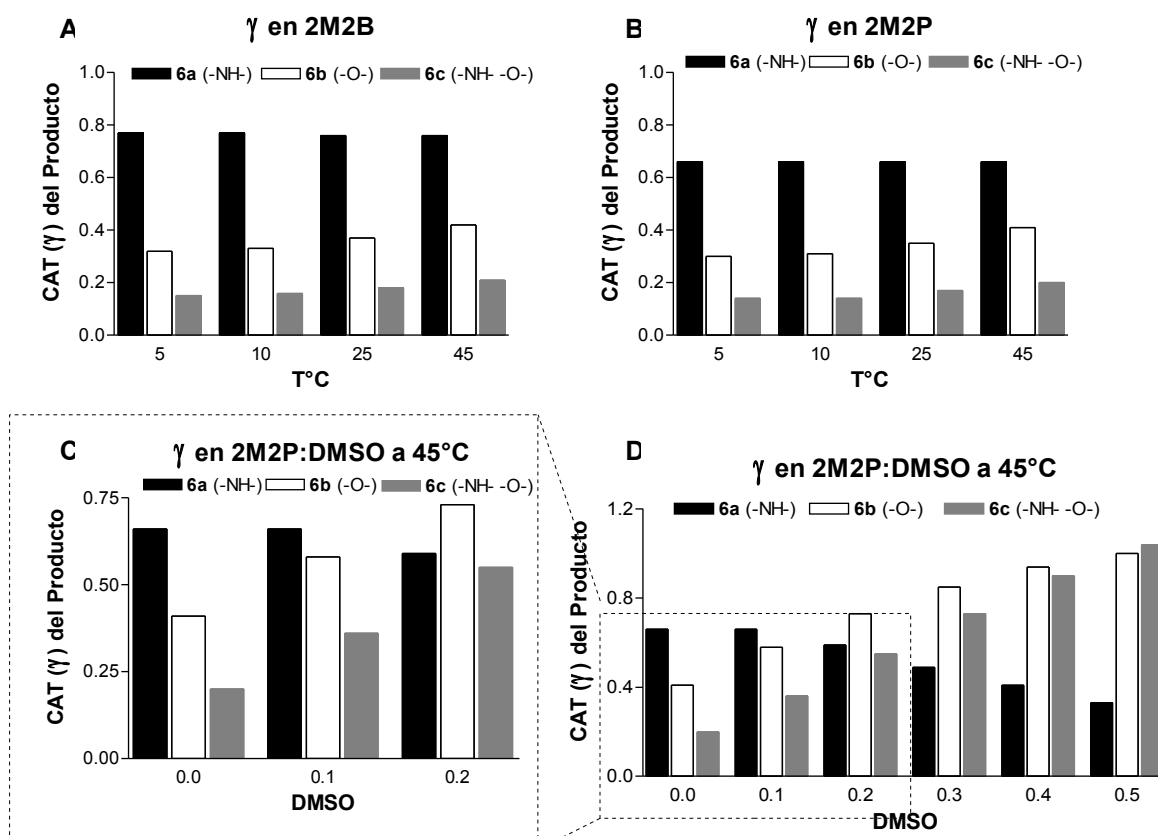


Figura 4.16. Coeficientes de actividad termodinámica (CAT) calculados en 2M2B (A), 2M2P (B) y mezclas de 2M2P con DMSO (C y D) de los tres posibles productos enzimáticos de Cal-B en la acilación del 2-amino-2-feniletanol (6) y el ácido cáprico (C₁₀). La amida (6a, negro), el éster (6b, blanco) y el producto diacilado (6c, gris).

Por otro lado, para la resolución quimio- y enantioselectiva del 2-amino-1-feniletanol (7), lo que se requiere es un medio de características hidrofóbica que permita la acumulación preferencial del éster (7b), en el que, aunado a lo anterior, se restrinja la producción de moléculas hidrofílicas como la amida (7a) y el producto diacilado (7c). En este sentido, en las secciones anteriores hemos demostrado que los coeficientes de actividad de las amidas en *n*-hexano son superiores que los de los ésteres, y que en consecuencia la acumulación preferencial de los ésteres al equilibrio se encuentra termodinámicamente más favorecida que la de las amidas. Como los cálculos de los coeficientes de actividad lo sugieren (Figura 4.17.), para la resolución del amino-alcohol 7 el *n*-hexano resulta, una vez más, en un medio de reacción apropiado para la acumulación preferencial del éster (7b) dado que en este disolvente el coeficiente de actividad del éster 7b es inferior que el de la amida 7a y que el del producto diacilado 7c. En otras palabras, los coeficientes de actividad de los posibles productos del amino-alcohol 7 en *n*-hexano proponen que al equilibrio la acumulación preferencial se encuentra favorecida hacia la síntesis del éster de interés (7b).

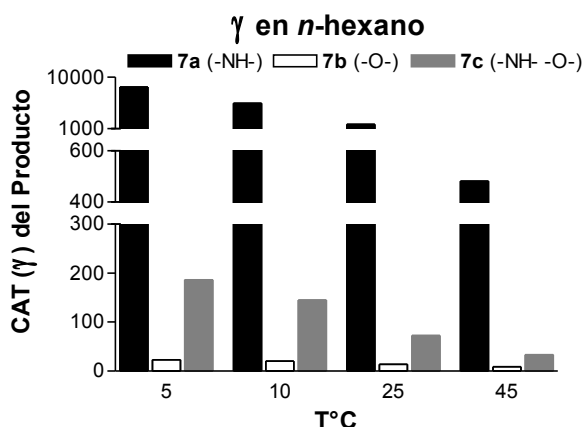


Figura 4.17. Coeficientes de actividad termodinámica (CAT) calculados en *n*-hexano de los tres posibles productos enzimáticos de CaL-B en la acilación del 2-amino-1-feniletanol (**7**) y el ácido cáprico (**C**₁₀): la amida (**7a**, negro), el éster (**7b**, blanco) y el producto diacilado (**7c**, gris).

Una vez que se diseñaron los medios de reacción que en función de los resultados de los cálculos de los coeficientes de actividad resultan apropiados para la resolución quimio- y enantioselectiva de ambos amino-alcoholes (**6** y **7**) se llevaron a cabo las reacciones de condensación de las moléculas bifuncionales (**6** y **7**) con el ácido cáprico (**C**₁₀) en 10ml de 2M2B, 2M2P, 2M2P:DMSO (90:10), 2M2P:DMSO (80:20) ó *n*-hexano. Todas las reacciones se llevaron a cabo a 45°C y fueron catalizadas por CaL-B (10mg ml⁻¹). Para llevar a cabo la potencial transformación total de ambos grupos funcionales y medir la cantidad de amida, éster y producto diacilado al equilibrio, la concentración del donador de acilo (40mM) fue dos veces mayor que la de la molécula bifuncional (20mM). Se cuantificó la desaparición de los amino-alcoholes así como la aparición de los productos en intervalos de tiempos regulares hasta alcanzar el equilibrio. Por lo general, las reacciones llegan a un estado estacionario al cabo de 24h. En un resultado inesperado, en todos los casos, al cabo de 24h de reacción, se obtuvieron amidas (**6a** y **7a**) como únicos productos. Un análisis detallado por HPLC quiral mostró que ambas amidas se encontraban como mezclas racémicas. Este resultado, en particular para la amida **6a**, es completamente inconsistente con la enantioselectividad que exhibe CaL-B e incoherente con el modelo de Kazlauskas. Como se puede observar en la **Figura 4.18.**, la reacción de amidación del enantiómero (*S*)-**6** no puede ser llevada a cabo por CaL-B dado que se generan impedimentos estéricos entre el sitio de reconocimiento y el anillo bencílico o bien, se rompen puentes de hidrógeno del intermediario tetraédrico fundamentales para la estabilización del estado de transición (**Figura 4.18. A y B**). En cambio, con el enantiómero (*R*)-**6**, aunque teóricamente se puede generar un acomodo improductivo a causa de impedimentos estéricos, existe un arreglo espacial que cumple tanto con los puentes de hidrógeno indispensables para la catálisis así como con el acomodo correcto de los sustituyentes del carbono quiral en los sitios de reconocimiento específicos (**Figura 4.18. C y D**).

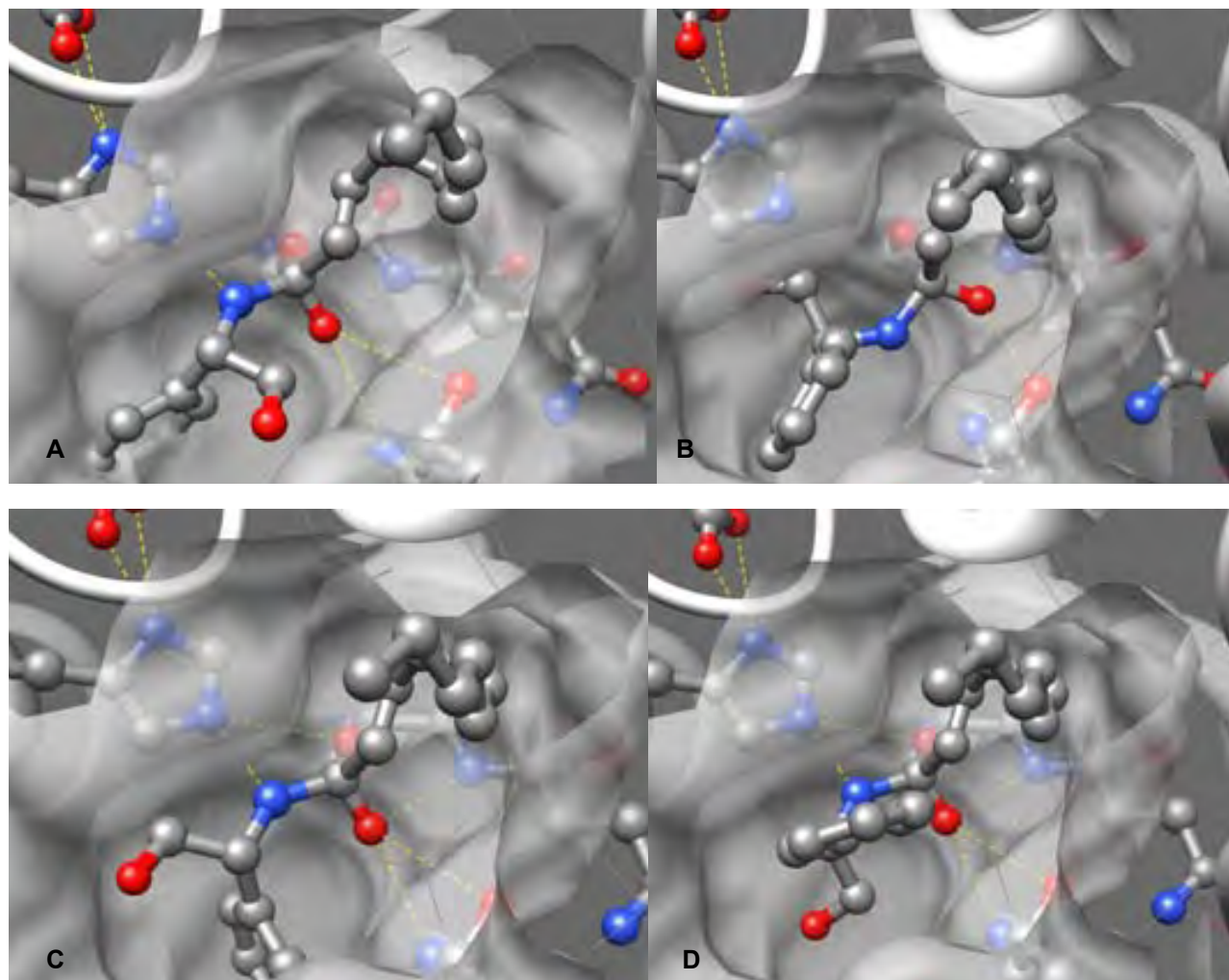
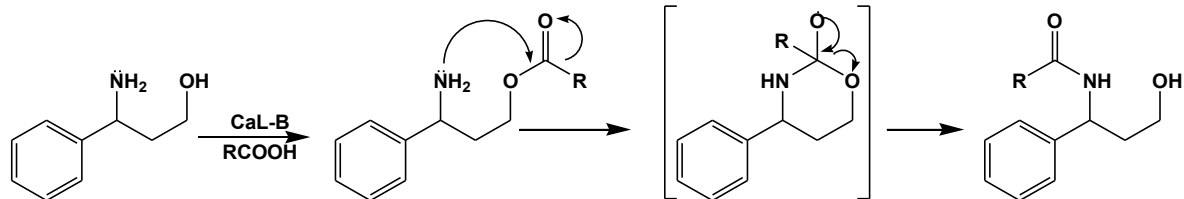


Figura 4.18. **A.** Amida (*S*)-**6a** en donde existen claros impedimentos estéricos a pesar de que se generan los puentes de hidrógeno indispensables para la catálisis. **B.** El enantiómero (*S*)-**6a** con el acomodo espacial de los sustituyentes en los sitios de reconocimiento correcto pero sin los puentes de hidrógeno que estabilizan el estado de transición. **C.** Amida (*R*)-**6a** en donde se generan los puentes de hidrógeno indispensables para la catálisis pero los sustituyentes del carbono quiral no se encuentran en los sitios de reconocimiento adecuados. **D.** Correcto acomodo de los sustituyentes del (*R*)-**6a** en los sitios de reconocimiento en el que se mantienen los puentes de hidrógeno necesarios para estabilizar el estado de transición.

Dada esta incongruencia obtenida para la enantioselectividad observada en la producción de ambos estereoisómeros de la amida **6a**, se sospechó de la presencia de un fenómeno conocido como acil-migración. En efecto, tanto en las reacciones de acilación del aminoalcohol **6** como en la transformación de **7**, se confirmó la presencia del fenómeno intramolecular espontáneo e independiente del biocatalizador conocido como acil-migración. De hecho, esta migración se ha observado incluso con moléculas bifuncionales cuyos nucleófilos se encuentran alejados por más átomos de carbono que en las moléculas modelo (**6** y **7**)¹⁰⁷ (**Esquema 4.3.**), y esta migración ocurre por un ataque nucleofílico del amino hacia el carbonilo del éster.



Esquema 4.3. Diagrama de la reacción de acil-migración para el producto de esterificación del 3-amino-3-fenilpropanol tomada de: Torre, O. y col. (2006) *Tet-Asymm.*, **17**, 860-866.

La migración del acilo de los productos esterificados (**6b** y **7b**) se comprobó mediante la protección y desprotección química de los grupos amino con Cbz. Para ello, posterior a la protección de los amino, se esterificó el hidroxilo con el cloruro de ácido cáprico para posteriormente remover el grupo protector mediante la hidrogenación empleando un catalizador de paladio sobre carbono (Pd-C). En la desprotección de los grupos amino, se procuró mimetizar las condiciones de las reacciones a las cuales se llevaron a cabo las transformaciones enzimáticas (concentración, disolvente y temperatura). Al cabo de 4h de iniciada la hidrogenación o remoción del grupo protector del amino, se encontró como único producto a las amidas cáprica (**6a** y **7a**). Para contender con este fenómeno se propuso el empleo de un ácido ramificado (ácido piválico) que por impedimentos estéricos imposibilita la migración del acilo hacia el amino libre. Aunque químicamente se comprobó que efectivamente la esterificación de **6** con el ácido piválico impide la migración del acilo, CaL-B fue incapaz de reconocer a este ácido como donador de acilo. De hecho, dentro de la amplia gama de donadores de acilo que CaL-B es capaz de reconocer, se ha observado que los ésteres derivados del ácido piválico son de los pocos sustratos que CaL-B no hidroliza. Incluso, este residuo acilo se ha empleado como protector de ésteres susceptibles a la transformación por CaL-B^{108,109}. En este sentido, el análisis estructural del sitio activo de CaL-B en el que se mimetiza el estado de transición de la reacción correspondiente a la esterificación del **2A2FEO** y el ácido piválico, revela que las ramificaciones del ácido se empalman con la superficie del sitio activo de la lipasa y dan lugar a fuertes impedimentos estéricos (**Figura 4.19.**).

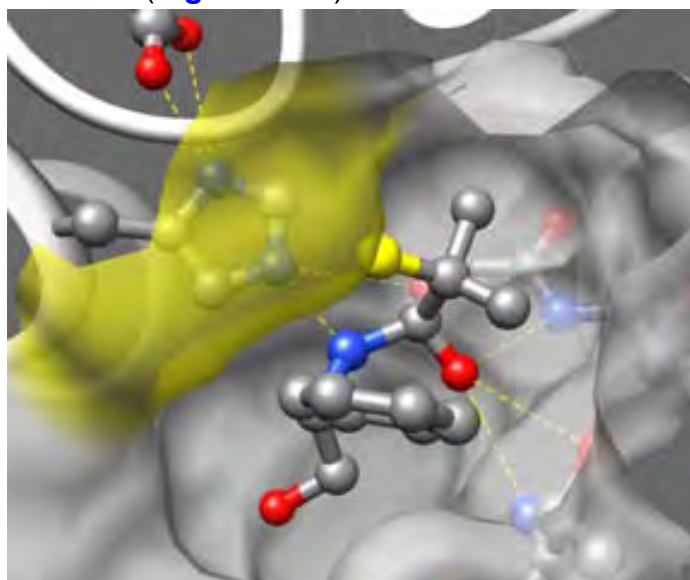


Figura 4.19. (*R*)-enantiómeros del **2A2FEO** esterificados con el ácido piválico posicionado en el sitio activo de CaL-B mimetizando el estado de transición. La zona de color amarillo indica las partes de la proteína y el sustrato en donde se generan choques entre sus átomos.

Bajo este panorama y al no contar en esta etapa con un modelo de estudio experimental eficiente, se recurrió al uso de datos experimentales reportados en la literatura relacionados con la acilación selectiva de amino-alcoholes que nos permitieran confirmar que la transformación enzimática quimioselectiva de moléculas bifuncionales se encuentra en función de la capacidad de los productos para interaccionar con el medio de reacción o dicho de otra manera, que la quimioselectividad corresponde a diferencias entre los coeficientes de actividad de los productos. Para ello se recurrió a resultados reportados para la acilación del 6-amino-1-hexanol (**8**) y el ácido oleico. Esta reacción se llevó a cabo por medio de CaL-B y se emplearon como medios de reacción al 2M2B, *n*-hexano, ácido oleico y oleato de etilo⁹ (Figura 4.20.).

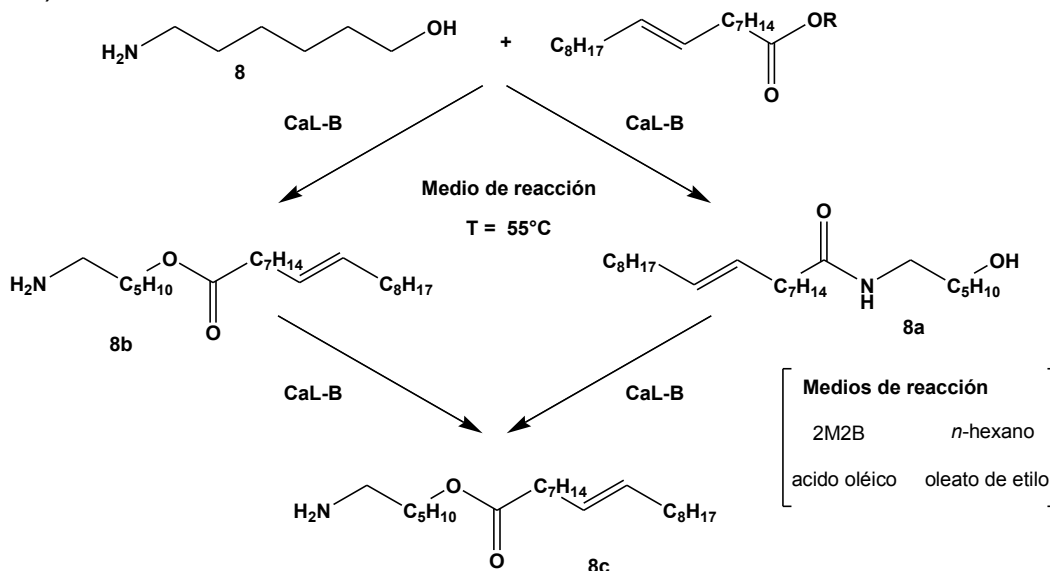


Figura 4.20. Reacción de acilación del amino-alcohol **8** con el ácido oleico ($C_{18}:1\Delta^9$) catalizada por CaL-B en varios medios de reacción.

Los rendimientos de los productos (**8a**, **8b** y **8c**) reportados para las reacciones de acilación entre el 6-amino-1-hexanol (**8**) y el ácido oleico ($C_{18}:1\Delta^9$) nos permite mostrar que la acumulación preferencial de los productos al equilibrio puede ser predicha o estimada en función de los coeficientes de actividad de los productos en el medio de reacción.

En el reporte que se menciona anteriormente, los autores llevan a cabo la acilación del amino-alcohol **8** y el ácido oleico en dos disolventes de polaridad contraria (2M2B y *n*-hexano), así como en sistemas libre de disolvente en los que se usa como medio de reacción al ácido oleico y el oleato de etilo. Todas las reacciones se llevan a cabo a $55^\circ C$ y se emplea a CaL-B como catalizador⁹. En este reporte, los autores argumentan que la selectividad de la reacción depende de la protección aparente del grupo funcional amino por medio de alteraciones al estado de ionización del mismo. Aunque efectivamente demuestran que en función de la polaridad del medio y de la naturaleza del donador de acilo la amina puede encontrarse parcialmente protegida en un estado protonado que impide el ataque nucleofílico al complejo acil-enzima y por consiguiente la producción de la amida es nula o limitada, ello no explica el hecho de encontrar, como producto mayoritario en al equilibrio de la reacción, al producto diacilado. Más aún, este punto de vista no explica la falta de producción de la amida cuando el donador de acilo está impedido para formar la sal dado que se encuentra como

oleato de etilo. De hecho, las estrategias dirigidas a modificar el estado de protonación de la amina por la protección aparente debida a la formación de un complejo entre la amina y el ácido (donador de acilo), resultan, principalmente, en alteraciones a la cinética de la reacción. En otras palabras, dado que en la formación del complejo amina:ácido existe un equilibrio, incluso favorecido hacia la protonación del grupo amino, la poca amina nucleofílicamente activa que logre producir la amida, romperá entonces con el equilibrio parcial de la sal y en consecuencia la compensación al equilibrio producirá más amina libre nucleofílicamente activa. Además, las perturbaciones al equilibrio de la amina ionizada también pueden ser consecuencia de la pérdida de ácido debida a la producción del éster. Por consiguiente, en este razonamiento dinámico, la modificación del estado de ionización de la amina repercute solo en aspectos cinéticos y no en los factores termodinámicos que predominan en el equilibrio de la reacción. Sin embargo, es importante mencionar que al emplear al ácido oleico como medio de reacción, debido al exceso de este, el equilibrio entre la sal y la amina libre está ampliamente favorecido hacia la protonación del grupo amino y por ende no se produce ni la amida ni el producto diacilado. En cambio, en los ejemplos restantes, mediante el cálculo de los coeficientes de actividad termodinámica de los productos de la acilación correspondiente al **6A-Hex-1OL** y el ácido oleico se observa una correlación cualitativa que explica la ausencia de amida en el medio de reacción así como la acumulación preferencial del producto diacilado (Figura 4.21.).

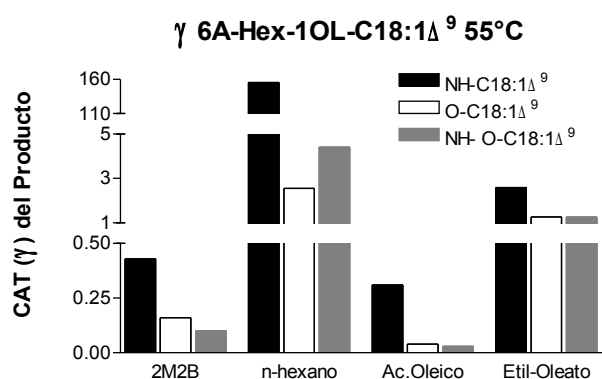
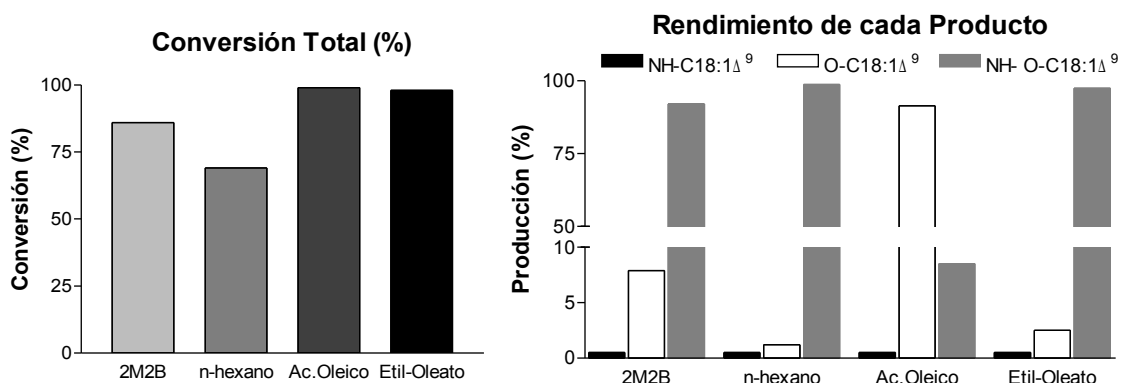


Figura 4.21. Coeficientes de actividad (CAT) de la amida, éster y producto diacilado de la reacción de acilación entre el 6A-Hex-1OL y el ácido oleico catalizadas por CaL-B. Debajo, la conversión total del amino-alcohol y el rendimiento de cada producto de las transformaciones llevadas a cabo en distintos medios de reacción. Estos datos se tomaron de: Husson, E, et al. (2008) *J.Mol.Cat-B: Enzymatic*, **55**, 110-117.



En todos los cálculos de los coeficientes de actividad de los productos en 2M2B, *n*-hexano, ácido oleico y oleato de etilo, realizados a dilución infinita, podemos observar que el producto termodinámicamente menos favorecido para su acumulación al equilibrio es la amida dado que es la especie con el coeficiente de actividad mayor. De hecho, consecuente con los

resultados experimentales, la amida es la especie que en ninguno de los medios de reacción se produce. Así mismo, la acumulación preferencial del producto diacilado se justifica dado que, en la mayoría de los medios de reacción experimentados, se observa que el coeficiente de actividad del producto diacilado es inferior que el de la amida y similar al del éster. En este sentido, la producción preferencial de la especie diacilada, a pesar de la similitud con el coeficiente de actividad del éster, puede ser interpretada debido al exceso de ácido presente en la reacción y dado que la lipasa está cinéticamente disponible, entonces lo produce. Con estos ejemplos de moléculas bifuncionales, aunque escasos, se demuestra el extenso potencial de los cálculos de los coeficientes de actividad termodinámica de los productos y su correlación para predicción cualitativa de la quimioselectividad enzimática.

4E. CONCLUSIONES

Mediante la estrategia propuesta en este capítulo (EPT) se exploraron alternativas para el control y manipulación de la quimioselectividad hacia la síntesis de ésteres y amidas. Esta exploración nos permitió entender como la manipulación del medio y la polaridad de los productos afectan la selectividad de la reacción. En particular, mediante el empleo de la lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B) en la acilación de aminas y alcoholes, se desarrollo una herramienta enzimática para la síntesis quimioselectiva de amidas y ésteres. Más aún, las observaciones experimentales fueron complementadas mediante cálculos de química cuántica a un nivel de teoría conocido como COSMO-RS (Conductor-like Screening Model for Real Solvents). En consecuencia, esta compatibilidad entre las observaciones experimentales y teóricas, permitió encontrar aspectos determinantes en favor de la manipulación de la quimioselectividad. En este sentido, en las reacciones en las que desea la acumulación preferencial de amidas sobre aquella de los éster, es propicio el empleo del 2-metil-2-butanol (2M2B) como medio de reacción ya que, por lo general, en este medio de reacción los coeficientes de actividad de las amidas resultan menores que los de los ésteres. Incluso, dado que los coeficientes de actividad termodinámica de las amidas y los ésteres en 2M2B no son significativamente modificados por la temperatura del medio, se propone llevar a cabo las transformaciones a temperaturas superiores a 25°C de tal manera que se obtengan altos rendimientos en la producción de las amidas. En cambio, para la acumulación preferencial de ésteres sobre la de amidas se recomienda el empleo de un disolvente hidrofóbico como el hexano. Más aún, demostramos que para la síntesis quimioselectiva de ésteres, además del debido control termodinámico, se puede incorporar un control cinético. Independientemente de la mayor nucleofilicidad de las aminas, en todas las reacciones llevadas a cabo en *n*-hexano, se observó una mayor velocidad inicial de síntesis para los ésteres que para las amidas. Mientras que en la síntesis de amidas en hexano el equilibrio se alcanza al cabo de unas horas, la producción de ésteres requiere de algunos minutos. En términos de la manipulación y control de la quimioselectividad en la acilación de moléculas bifuncionales, desafortunadamente, fue imposible demostrar la capacidad predictiva de la quimioselectividad en función de variaciones en los coeficientes de actividad termodinámica de los productos determinados por la polaridad del medio. Dado que la cercanía de los grupos funcionales de los amino-alcoholes empleados en el proyecto facilita el ataque nucleofílico de la amina libre al carbonilo del éster, y en consecuencia el acilo migra resultando en la producción de la amida, la capacidad para controlar y manipular la quimioselectividad de la reacción se pierde. En otras palabras, la quimioselectividad de la

reacción determinada por la polaridad del medio de reacción se contamina debido al fenómeno de acil migración que se produce hacia el amino libre de la molécula bifuncional. Sin embargo, apoyados en resultados reportados para moléculas bifuncionales cuyos grupos nucleofílicos se encuentran razonablemente alejados tal que no se produce la migración del acilo, se demostró que al equilibrio, la quimioselectividad de la reacción está influenciada por los coeficientes de actividad de los productos. Para finalizar, es importante mencionar que la combinación de las observaciones experimentales y teóricas es de hecho, una aproximación acertada que provee de conclusiones robustas en términos de los aspectos determinantes para la predicción de la quimioselectividad de una reacción. El complemento de ambas observaciones nos permitió correlacionar el comportamiento de los coeficientes de actividad de los productos en función de la hidrofobicidad y temperatura del medio. Mediante este acercamiento ahora se propone la resolución quimo- y enantioselectiva de amino-alcoholes en las que los grupos funcionales se encuentren a una distancia considerable que evite el ataque nucleofílico de la amina al carbonilo del éster y se produzca la acil-migración.

CONCLUSIONES

Con los resultados de este proyecto demostramos que el 2-metil-2-butanol (2M2B) es un medio apropiado para la producción de una amplia variedad de capsaicinoides. En efecto, por medio de la lipasa B de *Candida antarctica* (CaL-B) se sintetizaron diferentes amidas con estructuras análogas a la capsaicina en las que se varió tanto la longitud de la cadena hidrocarbonada como los sustituyentes del anillo aromático. En todas las reacciones de síntesis presentadas destacan las altas conversiones obtenidas al equilibrio (~90%). Esto permite suponer que desde un punto de vista termodinámico, el efecto predominante en la producción de amidas corresponde a la naturaleza del disolvente, y que este hecho, es independiente de la naturaleza de los sustratos que intervienen en el proceso (residuo acilo y anillo aromático). Más aún, se propone que las altas conversiones obtenidas en la producción de los capsaicinoides análogos corresponden a un efecto termodinámico en el que existe una estrecha relación entre la polaridad del medio y el enlace que se forma. Posterior a ello, empleando a los análogos de capsaicina como sustratos, demostramos que la capacidad de CaL-B para hidrolizar amidas depende de las características estructurales de los sustratos. En particular, observamos que la velocidad inicial de hidrólisis está influenciada por la longitud del residuo acilo así como por la cantidad de sustituciones en el anillo aromático de la amina resultante. Encontramos que para amidas constituidas por ácidos carboxílicos lineares saturados la velocidad de hidrólisis es mayor para sustratos derivados con ácidos de 10 carbonos independientemente de las sustituciones en el fenilo. En cambio, en términos del número de sustituciones en el anillo aromático se observó que la velocidad inicial de hidrólisis es mayor con las amidas carentes de sustituciones. En resumen, con estos resultados demostramos que CaL-B presenta actividad amidasa y que ésta depende de las características estructurales de las amidas.

Con los resultados de la síntesis e hidrólisis de capsaicinoides se desarrolló una herramienta enzimática para la resolución efectiva de una mezcla de aminas quirales. La estrategia "Easy-on, easy-off" constituida por una integración de la síntesis-hidrólisis de amidas por medio de CaL-B concluye en la obtención de ambos estereoisómeros de la fenil-etilamina, enantioméricamente puros y con alto rendimiento. Al utilizar una lipasa en esta metodología (CaL-B) se amplía la diversidad estructural de aminas a resolver. De hecho, a partir de la publicación de este trabajo, grupos interesados en la resolución efectiva de aminas han incorporado a CaL-B como biocatalizador en procesos similares. En particular, el éxito de este trabajo es la consecuencia de estudios dirigidos tanto a la acumulación de amidas al equilibrio como de resultados orientados a la exploración de factores estructurales de los sustratos que promueven la actividad amidasa de las lipasas.

Finalmente, todos los resultados anteriores se integran en la última sección de este proyecto la cual se dirige a establecer un proceso integral quimio- y enantioselectivo para la resolución de moléculas bifuncionales. En esta última sección sugerimos que al equilibrio, la acumulación preferencial de amidas o ésteres puede manipularse mediante la apropiada elección del medio de reacción. De hecho, mediante el empleo de CaL-B en la acilación de aminas y alcoholes, se desarrolló una herramienta enzimática para la síntesis quimioselectiva de amidas y ésteres, en donde las observaciones experimentales se complementan con cálculos de química cuántica a un nivel de teoría conocido como COSMO-RS (Conductor-like Screening Model for Real Solvents). En consecuencia, esta compatibilidad entre ambas observaciones (experimentales y teóricas), permitió encontrar aspectos determinantes en favor de la manipulación de la quimioselectividad. En este sentido, en las reacciones en las que desea la acumulación preferencial de amidas sobre aquella de los éster, se sugiere el empleo del 2M2B como medio de reacción ya que, por lo general, en este medio de reacción los coeficientes de actividad de las amidas resultan menores que los de los ésteres. Incluso, dado que los coeficientes de actividad termodinámica de las amidas y los ésteres en 2M2B no son significativamente modificados por la temperatura del medio, se propone llevar a cabo las transformaciones a temperaturas superiores a 25°C de tal manera que se obtengan altos rendimientos en la producción de las amidas. En cambio, para la acumulación preferencial de ésteres sobre la de amidas se recomienda el empleo de un disolvente hidrofóbico como el *n*-hexano. Más aún, demostramos que para la síntesis quimioselectiva de ésteres, además del debido control termodinámico, se puede incorporar un control cinético, dado que en todas las reacciones llevadas a cabo en *n*-hexano, se observó una mayor velocidad inicial de síntesis para los ésteres que para las amidas. En efecto, mientras que en la síntesis de amidas en hexano el equilibrio se alcanza al cabo de unas horas, la producción de ésteres requiere de algunos minutos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mark D. Argentine; Paul K. Owens; Bernard A. Olsen (2007)
Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances.
Advanced Drug Delivery Reviews. **59**, 1.
2. Rouhi A.M.; (2004)
Chiral chemistry.
Chemical and engineering news. **82**, 24.
3. Mezzetti A; Schrag J.D.; Cheong C.S.; Kazlauskas R; (2005)
Mirror-Image packing in enantiomer discrimination: molecular basis for the enantioselectivity of *B. cepacia* lipase toward 2-methyl-3-phenyl-1-propanol.
Chemistry & Biology. **12**, 4.
4. Berglund P.; Vallikivi I.; Fransson L.; Dannacher H.; Holmquist M.; et al. (1999)
Switched enantiopreference of Humicola lipase for 2-phenoxyalkanoic acid ester homologs can be rationalized by different substrate binding modes.
Tetrahedron-Asymmetry. **10**, 21.
5. Guieysse D.; Salagnad C.; Monsan P.; Remaud-Simeon M.; (2003)
Lipase-catalyzed enantioselective transesterification toward esters of 2-bromo-tolylacetic acids.
Tetrahedron-Asymmetry. **14**, 3.
6. Henkel T.; Brunne R.M.; Müller H.; Reichel F.; (2004)
Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds.
Angewandte Chemie-International Edition. **38**, 5.
7. Nahmany M.; Melman A.; (2004)
Chemoselectivity in reactions of esterification.
Organic & Biomolecular Chemistry. **2**, 11.

- 8.** Maugard T.; Remaud-Simeon M.; Monsan P.; (1998)
Kinetic study of chemoselective acylation of amino-alditol by immobilized lipase in organic solvent: effect of substrate ionization.
Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology. **1387**, 1-2.
- 9.** Husson E.; Humeau C.; Blanchard F.; Framboisier X.; Marc I.; Chevalot I.; (2008)
Chemo-selectivity of the N,O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids.
Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic. **55**, 3-4.
- 10.** Bellot J.C.; Choisnard L.; Castillo E.; Marty A.; (2001)
Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification.
Enzyme and Microbial Technology. **28**, 4-5.
- 11.** Castillo E.; Pezzotti F.; Navarro A.; Lopez-Munguia A.; (2003)
Lipase-catalyzed synthesis of xylitol monoesters: solvent engineering approach.
Journal of Biotechnology. **102**, 3.
- 12.** Reyes-Duarte D.; Castillo E.; Martinez R.; Lopez-Munguia A.; (2002)
Lipase-catalysed synthesis of olvanil in organic solvents.
Biotechnology Letters. **24**, 24.
- 13.** Duarte D.R.; Castillo E.; Barzana E.; Lopez-Munguia A.; (2000)
Capsaicin hydrolysis by *Candida antarctica* lipase.
Biotechnology Letters. **22**, 22.
- 14.** Schmid R.D.; Verger R.; (1998)
Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications.
Angewandte Chemie-International Edition. **37**, 12.
- 15.** Pleiss J.; Fischer M.; Peiker M.; Thiele C.; Schmid R.D.; (2000)
Lipase engineering database Understanding and exploring sequence-structure-function relationships.
Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic. **10**.
- 16.** Wagegg T.; Enzelberger M.M.; Bornscheuer U.T.; Schmid R.D.; (1998)
The use of methoxy acetoxy esters significantly enhances reaction rates in the lipase-catalyzed preparation of enantiopure 1-(4-chloro phenyl) ethyl amines.
Journal of Biotechnology. **61**, 1.
- 17.** Quan J.; Wang N.; Cai X.Q.; Wu Q.; Lin X.F.; (2007)
Controllable selective enzymatic synthesis of N-acyl and O-acylpropranolol vinyl esters and preparation of polymeric prodrug of propranolol.
Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic. **44**, 1.

- 18.** Orrenius C.; Haeffner F.; Rotticci D.; Ohrner N.; Norin T.; Hult K.; (1998)
Chiral recognition of alcohol enantiomers in acyl transfer reactions catalyzed by *Candida antarctica* lipase B.
Biocatalysis and Biotransformation. **16**, 1.
- 19.** Hult K.; Berglund P.; (2007)
Enzyme promiscuity: mechanism and applications
Trends in Biotechnology. **25**, 5.
- 20.** Rotticci D.; Orrenius C.; Hult K.; Norin T.; (1997)
Enantiomerically enriched bifunctional sec-alcohols prepared by *Candida antarctica* lipase B catalysis. Evidence of non-steric interactions.
Tetrahedron-Asymmetry. **8**, 3.
- 21.** de Castro M.S.; Sinisterra J.V.; (1998)
Lipase-catalyzed synthesis of chiral amides. A systematic study of the variables that control the synthesis.
Tetrahedron. **54**, 12.
- 22.** Hirose K.; Naka H.; Yano M.; Ohashi S.; Naemura K.; Tobe Y.; (2000)
Improvement of enantioselectivity in kinetic resolution of a primary alcohol through lipase-catalyzed transesterification by using a chiral acyl donor.
Tetrahedron-Asymmetry. **11**, 5.
- 23.** Garcia-Urdiales E.; Rebolledo F.; Gotor V.; (2000)
Enzymatic one-pot resolution of two nucleophiles: alcohol and amine.
Tetrahedron-Asymmetry. **11**, 7.
- 24.** Breuer M.; Ditrich K.; Habicher T.; Hauer B.; Kessler M.; Sturmer R.; Zelinski T.; (2004)
Industrial methods for the production of optically active intermediates.
Angewandte Chemie-International Edition. **43**, 7.
- 25.** Öhrner N.; Orrenius C.; Mattson A.; Norin T.; Hult K.; (1996)
Kinetic resolution of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by the *Candida antarctica* lipase B.
Enzyme and Microbial Technology. **19**.
- 26.** Uppenberg J.; Ohrner N.; Norin M.; Hult K.; Kleywegt G.J.; Patkar S.; et al. (1995)
Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols.
Biochemistry. **34**, 51.
- 27.** Schulz T.; Pleiss J.; Schmid R.D.; (2000)
Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols: A quantitative model.
Protein Science. **9**, 6.

- 28.** Pleiss J.; Scheib H.; Schmid R.D.; (2000)
The His gap motif in microbial lipases: A determinant of stereoselectivity toward triacylglycerols and analogs.
Biochimie. **82**, 11.
- 29.** Hwang B.Y.; Scheib H.; Pleiss J.; Kim B.G.; Schmid R.D.; (2000)
Computer-aided molecular modeling of the enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward gamma- and delta-lactones.
Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic. **10**, 1-3.
- 30.** Ottosson J.; Fransson L.; Hult K.; (2002)
Substrate entropy in enzyme enantioselectivity: An experimental and molecular modeling study of a lipase
Protein Science. **11**, 6.
- 31.** Tuomi W.V.; Kazlauskas R.J.; (1999)
Molecular basis for enantioselectivity of lipase from *Pseudomonas cepacia* toward primary alcohols. Modeling, kinetics, and chemical modification of Tyr29 to increase or decrease enantioselectivity.
Journal of organic chemistry. **64**, 8.
- 32.** Magnusson A.O.; Rotticci-Mulder J.C.; Santagostino A.; Hult K.; (2005)
Creating space for large secondary alcohols by rational redesign of *Candida antarctica* lipase B.
Chembiochem. **6**, 6.
- 33.** Magnusson A.O.; Takwa M.; Harnberg A.; Hult K.; (2005)
An S-selective lipase was created by rational redesign and the enantioselectivity increased with temperature.
Angewandte Chemie-International Edition. **44**, 29.
- 34.** Kahlow U.H.M.; Schmid R.D.; Pleiss J.; (2001)
A model of the pressure dependence of the enantio selectivity of *Candida rugosa* lipase towards (+/-)-menthol.
Protein Science. **10**, 10.
- 35.** Cainelli G.; Galletti P.; Giacomini D.; Gualandi A.; Quintavalla A.; (2003)
Chemo- and enzyme-catalyzed reactions revealing a common temperature-dependent dynamic solvent effect on enantioselectivity.
Helvetica Chimica Acta. **86**, 11.
- 36.** Galunsky B.; Ignatova S.; Kasche V.; (1997)
Temperature effects on S-1- and S '(1)-enantioselectivity of alpha-chymotrypsin.
Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology. **1343**, 1.

- 37.** Kazlauskas R.; Weissefloch A.; Rappaport A.T.; Cuccia L.A.; (1991)
A Rule to Predict which Enantiomer of a Secondary Alcohol React faster in reactions catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from *Pseudomonas cepacia*, and Lipase from *Candida rugosa*.
Journal of organic chemistry. **56**.
- 38.** Cygler M.; Grochulskui P.; Kazlauskas R.; Schrag J.D.; Bouthiller F.; et al. (1994)
A structural basis for the Chiral Preferences of Lipases
Journal of American Chemical Society. **116**.
- 39.** Uppenberg J.; Patkar S.; Bergfors T.; Alwyn Jones T.; (1994)
Crystallization and Preliminary X-ray studies of Lipase B from *Candida antarctica*.
Journal of Molecular Biology. **235**, 2.
- 40.** Rotticci D.; Haeffner F.; Orrenius C.; Norin T.; Hult K.; (1998)
Molecular recognition of sec-alcohol enantiomers by *Candida antarctica* lipase B.
Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic. **5**, 1-4.
- 41.** Rotticci D.; Rotticci-Mulder J.C.; Denman S.; Norin T.; Hult K.; (2001)
Improved enantioselectivity of a lipase by rational protein engineering.
Chembiochem. **2**, 10.
- 42.** Magnusson A.; Hult K.; Holmquist M.; (2001)
Creation of an enantioselective hydrolase by engineered substrate-assisted catalysis.
Journal of the American Chemical Society. **123**, 18.
- 43.** Weissefloch A.; Kazlauskas R.J.; (1995)
Enantioselectivity of lipase from *Pseudomonas cepacia* toward primary alcohols.
Journal of organic chemistry. **60**, 21.
- 44.** Gentner C.; Schmid R.D.; Pleiss E.; (2002)
Primary alcohols in a ring structure: quantifying enantioselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase by an in silico assay.
Colloids and Surfaces B-Biointerfaces. **26**, 1-2.
- 45.** Tafi A.; Manetti F.; Botta M.; Casati S.; Santaniello E.; (2004)
A drop of enantioselectivity in the *Pseudomonas cepacia* lipase-catalyzed ester hydrolysis is influenced by the chain length of the fatty acid.
Tetrahedron-Asymmetry. **15**, 15.
- 46.** Kim K.K.; Song H.K.; Shin D.H.; Hwang K.Y.; Suh S.W.; (1997)
The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor.
Structure. **5**, 2.

- 47.** Nordin O.; Nguyen B.V.; Vorde C.; Hedenstrom E.; Hogberg H.E.; (2000)
Kinetic resolution of primary 2-methyl-substituted alcohols via *Pseudomonas cepacia* lipase-catalysed enantioselective acylation.
Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions, 3.
- 48.** Chen C.; Fujimoto Y.; Girdaukas G.; Sih C.J.; (1982)
Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers.
Journal of the American Chemical Society. **104**, 25.
- 49.** Straathof A.J.J.; Jongejan J.A.; (1997)
The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction.
Enzyme and Microbial Technology. **21**, 8.
- 50.** Zuegg J.; Honig H.; Schrag J.D.; Cygler M.; (1997)
Selectivity of lipases: Conformational analysis of suggested intermediates in ester hydrolysis of chiral primary and secondary alcohols.
Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic. **3**, 1-4.
- 51.** Straathof A.J.J.; Panke S.; Schmid A.; (2002)
The production of fine chemicals by biotransformations.
Current Opinion in Biotechnology. **13**, 6.
- 52.** Gotor-Fernandez V.; Brieva R.; Gotor V.; (2006)
Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals.
Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic. **40**, 3-4.
- 53.** van Rantwijk F.; Sheldon R.A.; (2004)
Enantioselective acylation of chiral amines catalysed by serine hydrolases.
Tetrahedron. **60**, 3.
- 54.** Maruyama T.; Nakajima M.; Kondo H.; Kawasaki K.; Seki M.; Goto M.; (2003)
Can lipases hydrolyze a peptide bond?
Enzyme and Microbial Technology. **32**, 6.
- 55.** Guranda D.T.; Khimiuk A.I.; van Langen L.M.; van Rantwijk F.; Sheldon R.A.; et al.; (2004)
An 'easy-on, easy-off' protecting group for the enzymatic resolution of (+/-)-1-phenylethylamine in an aqueous medium.
Tetrahedron-Asymmetry. **15**, 18.
- 56.** Bornscheuer U.T.; Cornelius B.; Srinivas R.; Krishna S.H.; (2002)
Optimizing lipases and related enzymes for efficient application.
Trends in Biotechnology. **20**, 10.
- 57.** Krishna S.H.; Karanth N.G.; (2002)
Lipases and Lipase-catalyzed esterification reactions in non aqueous media.
Catalysis reviews. **44**, 4.

- 58.** Pifissao C.; Nascimento M.D.; (2006)
Effects of organic solvents and ionic liquids on the aminolysis of (RS)-methyl mandelate catalyzed by lipases.
Tetrahedron-Asymmetry. **17**, 3.
- 59.** Guo Z.; Chen B.Q.; Murillo R.L.; Tan T.W.; Xu X.B.; (2006)
Functional dependency of structures of ionic liquids: do substituents govern the selectivity of enzymatic glycerolysis?
Organic & Biomolecular Chemistry. **4**, 14.
- 60.** Wehtje E.; Costes D.; Adlercreutz P.; (1997)
Enantioselectivity of lipases: effects of water activity.
Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic. **3**, 5.
- 61.** Klibanov A.M.; (1997)
Why are enzymes less active in organic solvents than in water?
Trends in Biotechnology. **15**, 3.
- 62.** Chen B.Q.; Guo Z.; Tan T.W.; Xu X.B.; (2008)
Structures of ionic liquids dictate the conversion and selectivity of enzymatic glycerolysis: Theoretical characterization by COSMO-RS.
Biotechnology and Bioengineering. **99**, 1.
- 63.** Rendon X.; Lopez-Munguia A.; Castillo E.; (2001)
Solvent engineering applied to lipase-catalyzed glycerolysis of triolein.
Journal of American Oil Chemists Society. **78**.
- 64.** Castillo E.; Lopez-Gonzalez I.; Regil-Hernandez R.; Reyes-Duarte D.; et al.; (2007)
Enzymatic synthesis of capsaicin analogs and their effect on the T-type Ca²⁺ channels.
Biochemical and Biophysical Research Communications. **356**, 2.
- 65.** Jordt S.E.; Julius D.; (2002)
Molecular basis for species-specific sensitivity to 'hot' chili peppers.
Cell. **108**, 3.
- 66.** Szolcsanyi J.; (2004)
Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology.
Neuropeptides. **38**, 6.
- 67.** Govindarajan V.; Sathyanarayana M.; (1991)
Capsicum--production, technology, chemistry and quality. Part 5: Impact on physiology, pharmacology, nutrition and metabolism; structure, pungency, pain and desensitization sequences.
Critical Reviews in Food Science and Nutrition. **29**, 6.

- 68.** Sancho R.; Lucena C.; Macho A.; Calzado M.A.; Blanco-Molina M.; et al.; (2002)
Immunosuppressive activity of capsaicinoids: capsiate derived from sweet peppers inhibits NF-kappa B activation and is a potent antiinflammatory compound in vivo.
European Journal of Immunology. **32**, 6.
- 69.** Iida T.; Moriyama T.; Kobata K.; Morita A.; Murayama N.; Hashizume S.; et al.; (2004)
TRPV1 activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate.
Neuropharmacology. **44**, 7.
- 70.** van Langen L.M.; Oosthoek N.H.P.; Guranda D.T.; van Rantwijk F.; et al.; (2000)
Penicillin acylase-catalyzed resolution of amines in aqueous organic solvents.
Tetrahedron-Asymmetry. **11**, 22.
- 71.** van Rantwijk F.; Hacking M.A.P.J.; Sheldon R.A.; (2000)
Lipase-catalyzed synthesis of carboxylic amides: Nitrogen nucleophiles as acyl acceptor.
Monatshefte für Chemie. **131**, 6.
- 72.** Kobata K.; Toyoshima M.; Kawamura M.; Watanabe T.; (1998)
Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs using natural oils as an acyl donor.
Biotechnology Letters. **20**, 8.
- 73.** Kobata K.; Kobayashi M.; Tamura Y.; Miyoshi S.; Ogawa S.; Watanabe T.; (1999)
Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs by transacylation of capsaicin with natural oils or fatty acid derivatives in *n*-hexane.
Biotechnology Letters. **21**, 6.
- 74.** Kobata K.; Kobayashi M.; Kinpara S.; Watanabe T.; (2003)
Supercritical CO₂ as a reaction medium for synthesis of capsaicin analogues by lipase-catalyzed transacylation of capsaicin.
Biotechnology Letters. **25**, 18.
- 75.** Smidt H.; Fischer A.; Fischer P.; Schmid R.D.; (1996)
Preparation of optically pure chiral amines by lipase-catalyzed enantioselective hydrolysis of N-acyl-amines.
Biotechnology Techniques. **10**, 5.
- 76.** Ferrer-Montiel A.; Garcia-Martinez C.; Morenilla-Palao C.; Garcia-Sanz N.; et al.; (2004)
Molecular architecture of the vanilloid receptor - Insights for drug design.
European Journal of Biochemistry. **271**, 10.
- 77.** Hu S.H.; Tat D.; Martinez C.A.; Yazbeck D.R.; Tao J.H.; (2005)
An efficient and practical chemoenzymatic preparation of optically active secondary amines.
Organic Letters. **7**, 20.

78. Zahn D.; (2003)

Theoretical study of the mechanisms of acid-catalyzed amide hydrolysis in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry B.* **107**, 44.

79. Zahn D.; (2004)

Investigation of the complex catalyzed amide hydrolysis from reaction coordinate of acid molecular dynamics simulations. *Chemical Physics.* **300**, 1-3.

80. Zahn D.; (2004)

Car-Parrinello molecular dynamics simulation of base-catalyzed amide hydrolysis in aqueous solution. *Chemical Physics Letters.* **383**, 1-2.

81. Park Y.H.; Lee S.S.; (1994)

Identification and characterization of capsaicin-hydrolyzing enzymes purified from rat liver microsomes. *Biochem Biol Mol Int.* **32**.

82. Henke E.; Bornscheuer U.T.; (2003)

Fluorophoric assay for the high-throughput determination of amidase activity. *Analytical Chemistry.* **75**, 2.

83. Ismail H.; Lau R.M.; van Rantwijk F.; Sheldon R.A.; (2008)

Fully enzymatic resolution of chiral amines: Acylation and deacylation in the presence of *Candida antarctica* lipase B. *Advanced Synthesis & Catalysis.* **350**, 10.

84. Fujii R.; Nakagawa Y.; Hiratake J.; Sogabe A.; Sakata K.; (2005)

Directed evolution of *Pseudomonas aeruginosa* lipase for improved amide-hydrolyzing activity. *Protein Engineering, Design & Selection.* **18**, 2.

85. Nakagawa Y.; Hasegawa A.; Hiratake J.; Sakata K.; (2007)

Engineering of *Pseudomonas aeruginosa* lipase by directed evolution for enhanced amidase activity: mechanistic implication for amide hydrolysis by serine hydrolases. *Protein Engineering Design & Selection.* **20**, 7.

86. Sultani S.; Engasser J.M.; Ghouli M.; (2001)

Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty acid fructose esters. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic.* **11**, 4-6.

87. Otero C.; Arcos J.A.; Berrendero M.A.; Torres C.; (2001)

Emulsifiers from solid and liquid polyols: different strategies for obtaining optimum conversions and selectivities. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic.* **11**, 4-6.

- 88.** Bornscheuer U.T.; Rodriguez O.G.; Hidalgo A.; Gollin A.; Lyon J.; et al.; (2005)
Selectivity of lipases and esterases towards phenol esters.
Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic. **36**, 1.
- 89.** Juaristi E.; Leon-Romo J.L.; Reyes A.; Escalante J.; (1999)
Recent applications of alpha-phenylethylamine (alpha-PEA) in the preparation of enantiopure compounds. Part 3: alpha-PEA as chiral auxiliary. Part 4. alpha-PEA as chiral reagent in the stereodifferentiation of prochiral substrates.
Tetrahedron-Asymmetry. **10**, 13.
- 90.** Juaristi E.; Escalante J.; Leon-Romo J.L.; Reyes A.; (1998)
Recent applications of alpha-phenylethylamine (alpha-PEA) in the preparation of enantiopure compounds. Part 1: Incorporation in chiral catalysts. Part 2: alpha-PEA and derivatives as resolving agents.
Tetrahedron-Asymmetry. **9**, 5.
- 91.** Kozma D.; Poszavaca L.; Acs M.; Pokol G.; Fogassy E.; (1995)
Physicochemical Investigation of the Diastereoisomeric Salt Pair Formed by Alpha-Phenyl-Ethyl-Amine and R-1-Phenylethyl-Succinamic Acid
Journal of Thermal Analysis. **44**, 2.
- 92.** Cammenberg M.; Hult K.; Park S.; (2006)
Molecular basis for the enhanced lipase-catalyzed N-acylation of 1-phenylethylamine with methoxyacetate.
Chembiochem. **7**, 11.
- 93.** Overbeeke P.L.A.; Jongejan J.A.; Heijnen J.J.; (2000)
Solvent effect on lipase enantioselectivity. Evidence for the presence of two thermodynamic states.
Biotechnology and Bioengineering. **70**, 3.
- 94.** Davis B.A.; Durden D.A.; (2001)
Resolution of chiral aliphatic and arylalkyl amines using immobilized *Candida antarctica* lipase and isolation of their R- and S-enantiomers.
Synthetic Communications. **31**, 4.
- 95.** Maugard T.; Remaud-Simeon M.; Petre D.; Monsan P.; (1997)
Enzymatic synthesis of glycamide surfactants by amidification reaction.
Tetrahedron. **53**, 14.
- 96.** Gotor-Fernandez V.; Busto E.; Gotor V.; (2006)
Candida antarctica lipase B: An ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds.
Advanced Synthesis & Catalysis. **348**, 7-8.

- 97.** Carballeira J.D.; Krumlinde P.; Bocola M.; Vogel A.; Reetz M.T.; Backvall J.E.; (2007)
Directed evolution and axial chirality: optimization of the enantioselectivity of *Pseudomonas aeruginosa* lipase towards the kinetic resolution of a racemic allene.
Chemical Communications. 19.
- 98.** Irimescu R.; Kato K.; (2004)
Investigation of ionic liquids as reaction media for enzymatic enantioselective acylation of amines.
Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic. 30, 5-6.
- 99.** Toral A.R.; los Rios A.P.; Hernandez F.J.; Janssen M.H.A.; Schoevaart R.; et al.; (2007)
Cross-linked *Candida antarctica* lipase B is active in denaturing ionic liquids.
Enzyme and Microbial Technology. 40, 5.
- 100.** Gotor V.; (1999)
Non-conventional hydrolase chemistry: amide and carbamate bond formation catalyzed by lipases.
Bioorganic & Medicinal Chemistry. 7, 10.
- 101.** Gandhi N.N.; (1997)
Applications of lipase.
Journal of the American Oil Chemists Society. 74, 6.
- 102.** Ohrner N.; Orrenius C.; Mattson A.; Norin T.; Hult K.; (1996)
Kinetic resolutions of amine and thiol analogues of secondary alcohols catalyzed by the *Candida antarctica* lipase B.
Enzyme and Microbial Technology. 19, 5.
- 103.** Priego J.; Ortiz-Nava C.; Carrillo-Morales M.; Lopez-Munguia A.; et al.; (2009)
Solvent engineering: an effective tool to direct chemoselectivity in a lipase-catalyzed Michael addition.
Tetrahedron. 65, 2.
- 104.** Klamt A.; Eckert F.; Hornig M.; (2001)
COSMO-RS: A novel view to physiological solvation and partition questions.
Journal of Computer-Aided Molecular Design. 15, 4.
- 105.** Diedenhofen M.; Eckert F.; Klamt A.; (2003)
Prediction of infinite dilution activity coefficients of organic compounds in ionic liquids using COSMO-RS.
Journal of Chemical and Engineering Data. 48, 3.
- 106.** Fermeglia M.; Braiuca P.; Gardossi L.; Prici S.; Halling P.J.; (2006)
In silico prediction of medium effects on esterification equilibrium using the COSMO-RS method.
Biotechnology Progress. 22, 4.

- 107.** Torre O.; Gotor-Fernández V.; Gotor V.; (2006)
Lipase-catalyzed resolution of chiral 1,3-amino alcohols: application in the asymmetric synthesis of (S)-dapoxetine.
Tetrahedron-Asymmetry. **17**.
- 108.** Barbayianni E.; Fotakopoulou I.; Schmidt M.; Constantinou-Kokotou V.; et al.; (2005)
Enzymatic removal of carboxyl protecting groups. 2. Cleavage of the benzyl and methyl moieties.
Journal of organic chemistry. **70**, 22.
- 109.** Barbayianni E.; Fotakopoulou I.; Hohne M.; Constantinou-Kokotou V.; et al.; (2005)
Enzymatic removal of carboxyl protecting groups. 1. Cleavage of the tert-butyl moiety.
Journal of organic chemistry. **70**, 9.

A1

ANEXO 1

Lipase-catalyzed synthesis of pungent capsaicin analogues

Edmundo Castillo ^a, Alejandro Torres-Gavilán ^a, Patricia Severiano ^b,
Navarro Arturo ^b, Agustín López-Munguía ^{a,*}

^a Departamento de Ingeniería Celular y Biotecnología, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, CP 62271, Mexico

^b Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, CP 04510 México, D.F., Mexico

Received 13 September 2005; received in revised form 8 November 2005; accepted 29 November 2005

Abstract

Pungency in peppers (*Capsicum* spp.) is a sensation produced by a group of molecules known as capsaicinoids. Capsaicin has been reported as the capsaicinoid with the strongest pungency. Based on the molecular structure of capsaicin the enzymatic synthesis and pungent properties of structural analogues was investigated. These analogues were based on modification of the length of the acyl chain (from C4 to C16) and the chemical substituents of the aromatic ring (–OH and –OCH₃). The syntheses were carried out in 2-methyl-2-butanol with lipase B of *Candida antarctica*, with conversions ranging from 83% to 97.5%. The initial reaction rates were not significantly influenced by the nature of acyl-donor but rather by the substituents in the aromatic ring of the evaluated amines. The relative pungency of 10 capsaicin analogues was sensorially evaluated, using a sensory method for relative pungency. All the compounds were tested at a dose equivalent to 20 times the threshold capsaicin concentration. Two analogues were found pungent; the vanillylamides of caprylic (C-8) and capric (C-10) acids, showing a relative pungency of 66% and 36%, respectively, while the vanillylamides of caproic (C-6) and lauric (C-12) acids had a very low relative pungency (2.1% and 1.2%, respectively). From these results structural features related to pungency are discussed.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Lipase; *Candida antarctica*; Amide synthesis; Capsaicin; Capsaicin analogues; Pungency; Sensory analysis

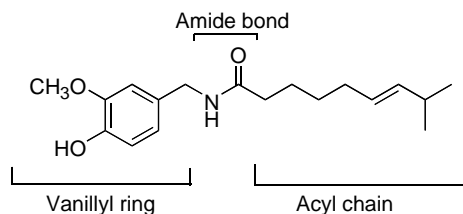
1. Introduction

Pungent sensation or pungency of peppers (*Capsicum* spp.) is a sensory effect produced by natural molecules identified as capsaicinoids. Among these natural pungent compounds, capsaicin, (*E*)-*N*-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-8-methyl-6-nonenamide, is recognized as one of the most pungent molecules. Nevertheless, some of its nearest natural structural analogues, dihydrocapsaicin (6,7-dihydro derivative of capsaicin) and nordihydrocapsaicin (7-methyl-*N*-vanillyl-octamide) exhibit a similar burning sensation. The structural characteristics of capsaicinoids that determine the pungency have been associated to the presence of an amide bond connecting a vanillyl ring and

an acyl chain (Szolcsanyi, 2004; Szolcsanyi & Jancsogabor, 1975), as illustrated in Scheme 1.

In addition to pungency, a wide variety of physiological and biological activities of capsaicinoids have been reported; these include stimulation of cardiovascular and respiratory systems (Govindarajan & Sathyanarayana, 1991), application as anti-nociceptive and anti-inflammatory analgesics (Sancho et al., 2002), use as neurotoxic drugs or enhancers of adrenal catecholamine secretion (Kobata, Toyoshima, Kawamura, & Watanabe, 1998b). However, extensive application of these molecules has been limited due to their initial nociceptive reaction and collateral irritating effects on membrane tissues. In this context, several research groups have been interested in the search and characterization of analogue molecules without these inherent and undesirable effects (Iida et al., 2003; Macho et al., 2003).

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56227637; fax: +52 77 73172388.
E-mail address: agustin@ibt.unam.mx (A. López-Munguía).

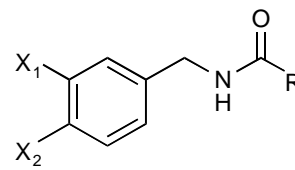


Scheme 1. Essential structural characteristics of capsaicin which determine its pungency.

The limited success in the chemical production of capsaicin analogues from vanillylamine and acyl donors is due, among other factors, to the toxicity of the condensing and catalytic agents, the formation of by-products and the cumbersome aromatic hydroxyl protection and deprotection processes. The use of enzymes for novel and efficient synthetic transformations of organic compounds is one of the most impressive results of the interaction between organic chemistry and enzymology. As a consequence, the enzyme catalyzed synthesis of capsaicin analogues has become an interesting alternative to the traditional chemical synthesis. Kobata et al. (1998a) reported conversions of 40–59% after 72 h in the lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogues by amidation of vanillylamine with different acyl donors in a borate buffer medium. In more recent reports, the same authors carried out the synthesis of capsaicin analogues by transacylation of capsaicin with different free fatty acids or natural oils, using immobilized *Candida antarctica* lipase-B in *n*-hexane or supercritical CO₂. In this case, conversions of 85% at 70 °C in *n*-hexane after 144 h for olvanil synthesis and 54% at 80 °C and 19 MPa in supercritical CO₂ after 72 h for vanillyl tetradecanamide synthesis were reported (Kobata et al., 1999; Kobata, Kobayashi, Kinpara, & Watanabe, 2003).

Recently, we reported a conversion of 98% at 45 °C after 48 h, in the lipase-catalyzed synthesis of a capsaicin analogue (olvanil) performed in a polar solvent, 2-methyl-2-butanol (2M2B) (Reyes-Duarte, Castillo, Martínez, & López-Munguía, 2002); lower thermodynamic activities explaining the preferential accumulation of olvanil at equilibrium in 2M2B when compared to lower conversions in hexane. This thermodynamic advantage has already been demonstrated for the preferential synthesis of polyol esters (Bellot, Choïnard, Castillo, & Marty, 2001; Castillo, Pezzotti, Navarro, & López-Munguía, 2003). Extensive attention has been paid to the effect of chemically synthesized capsaicin analogues on natural receptors (Appendino, Minassi, Morello, De Petrocellis, & Di Marzo, 2002; Walpole et al., 1993a, 1993b). However, few studies are devoted to the effect of both, the acyl donor and the arylamine on the enzymatic synthesis.

The aim of this work is to study the synthesis of capsaicin analogues from various amines and acyl-donors (Scheme 2) through a lipase-catalyzed reaction in favourable thermodynamic conditions. A sensory method is proposed in order to evaluate the pungency of the synthesized products.



Compound	X ₁	X ₂	Compound	R
1	MeO -	HO -	a	-C ₃ H ₇
2	H -	H -	b	-C ₆ H ₁₁
3	MeO -	H -	c	-C ₇ H ₁₅
			d	-C ₈ H ₁₉
			e	-C ₁₁ H ₂₃
			f	-C ₁₃ H ₂₇
			g	-C ₁₅ H ₃₁
			h	(CH ₂) ₇ CH=CH(CH ₂) ₇ CH ₃

Scheme 2. Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogues using different amines and acyl donors as substrates (see M&M section for synthesis conditions).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Novozym 435 (immobilized *C. antarctica* lipase B) was kindly supplied by Novozymes A/C (México). 2-Methyl-2-butanol (99.7%) was purchased from J.T. Baker (Xalostoc, México). Vanillylamine hydrochloride (98%), 3-methoxybenzylamine (98%), capric acid (99%), ethyl butyrate (99%), ethyl caprylate (99%), molecular sieves (5 A beads, 8–12 mesh) and Capsaicin (97%) were from Aldrich (Madison, WI, USA). Benzylamine (99%), *N,N*-diisopropylethylamine (99%), capsaicin (98% and 60%), methyl caproate (99%), lauric (99%), myristic (99%), oleic (98%) and palmitic (99%) acids were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2. Enzymatic reactions

All reactions were carried out at 45 °C in 5 ml screw-cap vessels sealed with PTFE liners and agitated with magnetic stirring. Capsaicin analogues were synthesized from equimolar solutions of the corresponding amine and acyl donor (20 mM) in 2-methyl-2-butanol fully dehydrated with molecular sieves. Reactions were started with 100 mg of Novozym 435 as biocatalyst and samples of 200 µl were withdrawn at intervals of 15 min for initial reaction rate determinations and intervals of 10 h until equilibrium was reached. The samples were centrifuged at 16,100g during 5 min to separate the enzyme and the molecular sieves, and the products analyzed by HPLC. In the synthesis of vanillylamides a tertiary amine, *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) and vanillylamine hydrochloride (VAMHCl) in a mole ratio of 18:1 were pre-incubated for 30 min to release vanillylamine from its salt derivative (Reyes-Duarte et al., 2002). In the synthesis of 3-methoxybenzylamides and benzylamides the substrates were simultaneously mixed before the enzyme was incorporated. In order to control the water activity (*a_w*) during the reaction, 100 mg of molecular sieves were added to the reaction vessels.

2.3. HPLC analysis

Substrate conversion in each experiment was estimated from the corresponding residual amine concentration determined by HPLC. For this purpose, a Waters 600E system controller pump equipped with a Water 996 photodiode array detector was used, with a flow rate of 1 ml min⁻¹. Vanillylamine and 3-methoxybenzylamine derivatives were separated with a Spherisorb 80-5 ODS-2 column (4.6 × 250 mm, Waters Corp. Milford, MA, USA) and benzylamine derivatives with a Supelcosil C18 column (3.9 × 300 mm, Supelco, Bellefonte, PA). Solvent composition, retention times and wavelength used for detection of each amine are listed in Table 1. The concentrations of the different amines were calculated using response factors derived from calibration curves of each substrate.

2.4. Purification and identification of the amide products

After 48 h of reaction the solvent was evaporated using a rotatory evaporator, for all amides prepared. The oily residual phases were resuspended in 1.5 ml of *n*-hexane and cooled to 15 °C in order to induce precipitation of the amide products and the non-reacted amines. This procedure was repeated at least 3 times. The precipitated amides were separated from amines by resuspending the mixture in 1.5 ml of deionized water at room temperature. The recovered amides were dried in a dessicator and their structure determined through ¹³C and ¹H NMR and EI-MS analyses. The overall yield (%) is obtained from the moles of recovered product after reaction and purification referred to the moles of initial substrate.

2.5. Spectroscopic analysis

¹H NMR and ¹³C NMR spectra were obtained using a Varian Unity InovaVXR-3005 (Palo Alto, CA, USA) 100 and 300 MHz spectrometer, and the chemical shift values were recorded in parts per million (ppm) on the δ scale with tetramethylsilane as the internal reference (CDCl₃ as solvent). The mass spectra were obtained on a JEOL SX-102A GC/MS/EI spectrometer (70 eV) (Peabody, MA, USA). MS and RMN data were obtained for all capsaicin analogues as illustrated below for representative compounds.

N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)octanamide (**1c**): ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.83 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, ArH-5), 6.77 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, ArH-2), 6.71 (1H, dd, *J* = 8.0, *J* = 1.8 Hz, ArH-6), 6.17 (2H, s, OH-H and N-H), 4.31 (2H, d, *J* = 5.4 Hz, H-7), 3.82 (3H, s, OCH₃-H),

2.19 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2'), 1.63 (2H, quint, *J* = 7.6 Hz, H-3'), 1.29 (8H, s, CH₂-H-4', H-5', H-6' and H-7'), 0.86 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, H-8'). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.3 (C = 0, C-1'), 146.7 (Ar, C-3'), 145.0 (Ar, C-4), 130.1 (Ar, C-1'), 120.5 (Ar, C-6'), 114.4 (Ar, C-5'), 110.7 (Ar, C-2'), 43.3 (CH₂, C-7'), 36.7 (CH₂, C-2'), 31.5 (CH₂, C-4'), 29.1–28.9, (CH₂, C-5'–C-6'), 25.7 (CH₂, C-3'), 22.4 (CH₂, C-7') 13.9 (CH₃, C-8'). MS (EI): *m/z* (%) = 251 (55) [M⁺], 195 (13), 152 (22), 137 (100), 122 (12). White powder solid, yield: 21.8 mg (78.3%).

N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)oleamide (**1h**): ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.86 (1H, d, *J* = 7.8 Hz, ArH-5), 6.80 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, ArH-2), 6.75 (1H, dd, *J* = 7.8, *J* = 1.8 Hz, ArH-6), 5.71 (2H, s, OH-H and NH), 5.37 (2H, m, C=C-H, H-9' and H-10'), 4.35 (2H, d, *J* = 5.7 Hz, H-7), 3.87 (3H, s, OCH₃-H), 2.19 (2H, t, *J* = 7.2 Hz, H-2'), 1.99 (4H, m, H-8' and H-10'), 1.64 (2H, quint, *J* = 7.5 Hz, H-3'), 1.29 (8H, s, CH₂, H-4'–H-7'), 1.26 (12H, s, CH₂, H-12'–H-17'), 0.87 (3H, t, *J* = 6.6 Hz, H-18'). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 172.9 (C = 0, C-1'), 146.7 (Ar, C-3'), 145.1 (Ar, C-4), 130.4 (Ar, C-1'), 120.8 (Ar, C-6'), 114.4 (Ar, C-5'), 110.7 (Ar, C-2'), 43.5 (CH₂, C-7'), 36.8 (CH₂, C-2'), 31.9 (CH₂, C-4'), 29.7–29.5 (CH₂, C-5'–C-7'), 29.3–29.1 (CH₂, C-12'–C-16'), 25.7 (CH₂, C-3'), 22.0 (CH₂, C-17'), 14.0 (CH₃, C-18'). MS (EI): *m/z* (%) = 391 (22) [M⁺], 195 (17), 152 (12), 137 (100), 122 (7). White powder solid, yield: 34.5 mg (88.2%).

N-benzyloctanamide (**2c**): ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.25 (5H, m, Ar-H, H-2–H-6), 6.31 (1H, s, N-H), 4.37 (2H, d, *J* = 6.0 Hz, H-7), 2.17 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-2'), 1.63 (2H, quint, *J* = 6.3 Hz, H-3'), 1.25 (8H, s, CH₂-H-4', H-5', H-6' and H-7'), 0.87 (3H, t, *J* = 6.6 Hz, H-8'). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.3 (C = 0, C-1'), 138.4 (Ar, C-1), 128.5–127.2 (Ar, C-2–C-6), 43.3 (CH₂, C-7'), 36.6 (CH₂, C-2'), 31.6 (CH₂, C-4'), 29.1–28.9 (CH₂, C-5' and C-6'), 25.7 (CH₂, C-3'), 22.5 (CH₂, C-7'), 13.9 (CH₃, C-8'). MS (EI): *m/z* (%) = 233 (24) [M⁺], 162 (24), 149 (78), 91 (100). Colorless crystals, yield: 19.5 mg (83.7%).

N-(3-methoxybenzyl)octanamide (**3c**): ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.23 (1H, m, ArH, H-4), 6.81 (3H, m, ArH-5, H-4 and H-3), 6.03 (1H, s, N-H), 4.38 (2H, d, *J* = 5.7 Hz, H-7), 3.78 (3H, s, OCH₃-H), 2.20 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H-2'), 1.63 (2H, m, H-3'), 1.27 (12H, s, CH₂, H-4–H-9'), 0.87 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, H-10'). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 173.0 (C = 0, C-1'), 146.7 (Ar, C-3'), 145.0 (Ar, C-4), 130.2 (Ar, C-1'), 120.7 (Ar, C-6'), 114.4 (Ar, C-5'), 110.7 (Ar, C-2'), 43.5 (CH₂, C-7'), 36.8 (CH₂, C-2'), 31.8 (CH₂, C-4'), 29.3–29.2, (CH₂, C-5'–C-

Table 1
Solvent composition, retention time (Rt) and wavelength detection (λ), used in the HPLC analysis of amines

Amine	Methanol (% v/v)	Acetonitrile (% v/v)	H ₂ O (% v/v)	λ (nm)	Rt (min)
Vanillylamine	50	0	50	280	3.53 ± 0.3
3-Methoxybenzylamine	0	70	30	275	4.01 ± 0.1
Benzylamine	85	0	15	254	5.00 ± 0.01

8'), 25.8 (CH₂, C-3'), 22.6 (CH₂, C-9'), 14.0 (CH₃, C-10'). MS (EI): m/z (%) = 263 (60) [M⁺], 192 (13), 152 (28), 179 (31), 135 (100), 121 (75), 121 (72). Brown oil, yield: 22.5 mg (85.5%).

2.6. Sensory analysis

In order to evaluate the pungency of the products a sensory test was proposed. All samples were prepared in a 0.4% (v/v) solution of ethanol in water. Firstly, a threshold test was set up from different capsaicin solutions at 0–0.2 ppm concentrations, followed by a magnitude estimation scaling (MES) test using a 1.12 ppm reference capsaicin solution and purified capsaicin analogues solutions (**1a–1h**, **2c** and **3c**) at different concentrations (1.12, 2.4, 5.6 and 28 ppm). The concentrations of capsaicin and capsaicin analogues used in this work were far below the toxicity levels reported previously for these compounds (Janusz et al., 1993).

2.7. Panelists selection and training

Analysis sessions were carried out at room temperature at the Sensory Analysis Laboratory of the National Autonomous University of Mexico. The taste panelists were selected from an initial set of 32 candidates upon their ability to identify different levels of pungency in capsaicin stock solutions (Meilgaard, Civille, & Carr, 1999). Fifteen panelists were finally selected and trained to operate a modification of the MES method, using a procedure specially developed in our Laboratory (MMES test, see below). The samples were tasted but not ingested. To wash off the previous sample, the panelist performed mouth washes with plain water and later with food (salty crackers).

2.8. Threshold test

In this test, capsaicin stock solutions of increasing concentration are given to each panelist and asked to indicate whether or not they are able to detect pungency. The data are then analyzed plotting the percentage of panelists able to detect pungency versus the minimum capsaicin concentration detected. The threshold concentration was determined by linear regression, selecting the capsaicin concentration at which 50% of the panelists had already detected pungency.

2.9. Modified magnitude estimation scaling test

In order to evaluate relative pungency of the synthesized capsaicin analogues, a modified magnitude estimation scaling (MMES) test was performed. The modification consisted essentially in defining 1.12 ppm capsaicin concentration as the reference sample, as this capsaicin concentration is 20 times higher than the threshold concentration (0.056 ppm) and lower than half the desensitization concentration determined for this panel (2.4 ppm). A value

of 200 was arbitrary defined for the pungency of the reference sample.

The MMES test was carried out in four sessions, each session corresponding to a different concentration of the analogues. In all sessions the capsaicin reference was given to all panellists. The samples containing the synthesized capsaicin analogues were randomly given to panelists who after detecting whether the sample was more or less pungent than the reference, evaluated pungency with a relative numeric value. The panelists were instructed to assign this value proportional to the pungent sensation of the reference (Meilgaard et al., 1999). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). The statistical significance of each factor considered was calculated at the $\alpha = 0.05$ level using the F-test. The LSD Fisher-test was employed to test for significant differences between samples. All statistical analyses were carried out using the Statgraphic Plus for Windows Computer Package (1995 Manugistics Inc., Rockville, MD).

3. Results and discussion

3.1. Influence of the acyl chain length on enzyme performance

The lipase-catalyzed amidation of different acyl donors (**1a–g**, scheme 2) with vanillylamine was carried out at 45 °C in 2M2B. In all reactions 48 h was enough to reach equilibrium. Conversions higher than 90% were obtained from free fatty acids (**1d–g**) in contrast to 83% (**1a**) and 87% (**1c**) when methyl or ethyl esters were used as acyl donors. In agreement with our previous results (Reyes-Duarte et al., 2002), the synthesis of amides in polar solvents such as 2M2B was clearly favoured. Actually, when the reactions were performed in 2M2B, higher conversions at lower temperatures were observed, when compared to similar reports in the literature for reactions performed in more hydrophobic media (Kobata et al., 1998a, 1998b). Similar initial reaction rates were observed for all derivatives, as reported in Table 2, suggesting that the nature of the different acyl donors evaluated do not influence significantly the reaction rate.

3.2. Influence of the nucleophile on enzyme performance

The lipase-catalyzed amidation reactions of different nucleophiles (**2b–f** and **3c–f**) with various acyl donors were performed in the conditions already described, measuring both initial rate and conversions at equilibrium. Similarly, in all reactions equilibrium was reached before 48 h and conversions higher than 90% were obtained. These results are shown in Table 3, confirming that, as with vanillylamine, the lipase-catalyzed synthesis of amides from benzylamine and 3-methoxybenzylamine is favoured in polar solvents.

When comparing the initial reaction rates reported in Tables 2 and 3, it becomes clear that although the acyl

Table 2
Reaction conversions and initial reaction rates of the lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogues

Compound	Conversion (%) (48 h)	Initial rate ($\mu\text{mol mgE}^{-1} \text{min}^{-1}$)
1a	83.04 \pm 0.92	1.53
1c	87.51 \pm 0.63	2.38
1d	97.43 \pm 0.46	2.42
1e	91.00 \pm 0.84	2.35
1f	93.05 \pm 0.76	2.22
1g	93.09 \pm 0.39	1.88

Reactions were carried out in 2M2B at 45 °C with 20 mg/ml of enzyme. Vanillylamine and acyl donors were at equimolar ratio (20 mM).

Table 3
Reaction yield and initial reaction rate of the lipase-catalyzed synthesis of the 3-methoxybenzylamide and benzylamide capsaicin analogues

Compound	Conversion (%) (48 h)	Initial rate ($\mu\text{mol mgE}^{-1} \text{min}^{-1}$)
2b	90.2 \pm 0.38	9.5
2c	93.0 \pm 0.17	12.5
2d	90.0 \pm 0.28	10.6
2e	93.8 \pm 0.02	13
2f	93.8 \pm 0.41	8
3c	94.9 \pm 0.20	7.7
3d	93.7 \pm 0.50	4.2
3e	94.0 \pm 0.41	6.3
3f	89.1 \pm 2.79	5.6

Reactions were carried out in 2M2B at 45 °C with 20 mg/ml of enzyme, benzylamine or 3-methoxybenzylamine and the corresponding acyl donors were at equimolar ratio (20 mM).

donors do not influence significantly the reaction rate they are affected by chemical nature of the substituents and the degree of substitution of the aromatic ring. Indeed, from Tables 2 and 3, the synthesis of amides derived from vanillylamine (**1a–e**), which has two functional groups present in the aromatic ring, has the lowest initial rates for all the acyl residues evaluated. In contrast, amides derived from benzylamine (**2b–f**), an amine without substituents in the aromatic ring, have the highest initial rates. On the other

hand, amidation reactions carried out with 3-methoxybenzylamine, an amine with only one CH_3O - group as substituent (**3c–f**), have initial rate values between those observed for the two other amides. Previous reports have already described a strong dependence of lipase activity on steric or electronic hindrances, mainly due to the nature, number and position of the aromatic substituents (Guieysse, Salagnad, Monsan, & Remaud-Simeon, 2003; Smidt, Fischer, Fischer, & Schmid, 1996). In this case, our results show that in the lipase-catalyzed synthesis of amides, introducing substituent groups in the aromatic ring of benzylamine, results in the reduction of the initial rates with no significant differences in reaction conversion.

3.3. Sensory analysis: threshold test

In order to select the capsaicin analogues concentration to be used in the evaluation of the relative pungency, a threshold test was carried for capsaicin, the reference compound. A capsaicin pungency threshold of 0.056 ppm was established from a plot of the percentage of panelists versus the minimum capsaicin concentration detected. The threshold concentration was determined by linear regression, selecting the capsaicin concentration at which 50% of the panelists able to detected pungency, as described in Section 2. This result is in agreement with similar experiments reported in the literature (Ordoñez, Ibañez, & Torre, 2002).

3.4. MMES test

The relative pungency of different synthesized samples, including 8 vanillylamine derivatives (**1a–1h**), one benzylamine derivative (**2c**) and one 3-methoxybenzylamine derivative (**3c**) were evaluated using the MMES test. All samples were prepared at 1.12 ppm, 20 times that of the capsaicin threshold. The pungency of these analogues is shown in Fig. 1, where it may be observed that in almost

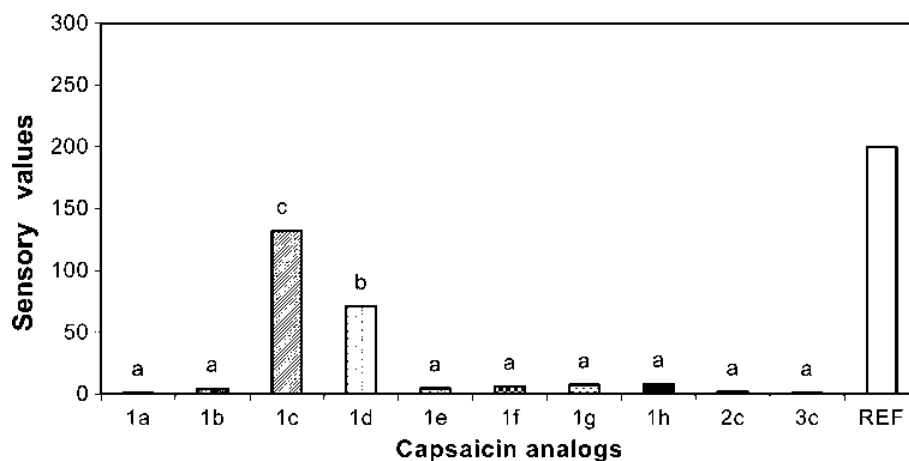


Fig. 1. Relative pungency of capsaicin analogues with respect to a capsaicin reference (REF) at the same concentration 1.12 ppm. A value of 200 was arbitrarily assigned to REF. ^{a,b,c}Statistically significant differences among columns at the 95.0% confidence level. Results are the mean of the score given by the 15 sensory panelists (variation coefficient were always lower than 15%).

all samples, the pungency was practically undetectable. In fact, only two samples (**1c** and **1d**) revealed some degree of relative pungency, with values of around 66% and 36%, respectively, with regard to the reference sample. Similar values (75% and 50% for **1c** and **1d**, respectively) had already been reported for the chemically synthesized compound but using an informal and non-rigorous procedure (Nelson, 1919). The pungency values were further verified in a second session, where the concentration of the samples was increased from 1.2 to 2.4 ppm. A 2-fold increase in relative pungency was obtained for compounds **1c** and **1d**. But no pungency was detected in the other samples. Two additional samples were evaluated: an aqueous solution of ethanol as a blank and a second blind capsaicin sample. The level of pungency detected for the blank sample was minimal and the pungency detected for the blind capsaicin sample was extremely close to the reference capsaicin sample (data not shown). No statistical difference at the 95% confidence level was observed between the non-pungent amides and the ethanol sample. Only when the amides concentrations was increased 20-fold (28 ppm) (samples **1c** and **1d** were not included in this session), pungency was detected for samples **1b** and **1e**, with relative values of 1.2% and 2.1%, respectively, with regard to the capsaicin standard.

From the global results of the sensory analysis, it was confirmed that the relative pungency is strongly dependant on the structural characteristics of the capsaicin analogues (Ferrer-Montiel et al., 2004). Firstly, structurally similar analogues of the capsaicin molecule (unsaturated acyl chain of C-9 with 8-methyl substituent), such as **1c** (acyl C-8) and **1d** (acyl C-10), have the highest relative pungency among the analogues, 66% and 36%, respectively. A drastic decrease in relative pungency was observed for shorter or longer capsaicin analogues (i.e., acyl C-6 or acyl C-12). Indeed, samples **1b** (acyl C-6),

and **1e** (acyl C-12), had the lowest pungencies detected. For acyl chains longer than 12 carbons or shorter than 6 carbons no significant pungency was found (**1a** and **1f–h**). On the other hand, the degree of substitution of the aromatic ring is an unfavourable factor for pungency. In fact, benzylamides (**2c**) and 3-methoxybenzylamides (**3c**) did not exhibit any pungency at all. Finally, it is noteworthy that even if capsaicin analogues **1c–d** show lower pungency than capsaicin and dihydrocapsaicin, they are as pungent as most of the natural capsaicinoids. This is demonstrated in Fig. 2, where the relative pungency and the Scoville Heat Units (SHU) of the capsaicin analogues is compared to the values reported for capsaicin and several natural capsaicinoids. The SHU is one of the most utilized parameters employed to determine the pungency of natural capsaicinoids.

In summary, the lipase-catalyzed synthesis of a wide variety of capsaicin analogues was efficiently carried out in 2-methyl-2-butanol. Fatty acids with chain length varying from C-4 to C-16 and three different aromatic amines were recognized as substrates with similar affinities by *C. antarctica* lipase B. The synthesis of these amides is enhanced by their higher solubility in polar solvents such as tertiary alcohols. In addition, it was found that the initial rates of capsaicin analogues synthesis was not influenced by the nature of the acyl-donor but rather by the chemical nature of the substituents and the degree of substitution on the aromatic ring of the amines. In terms of the capsaicin analogues pungency, the role of each part of the capsaicin molecule is confirmed: the presence of the vanillyl ring is essential, while some variability is allowed in terms of the length of the acyl chain. The sensory method for evaluating relative pungency was very useful to discriminate among the structural differences introduced with the substrates assayed. Two of the enzymatically synthesized capsaicin analogues

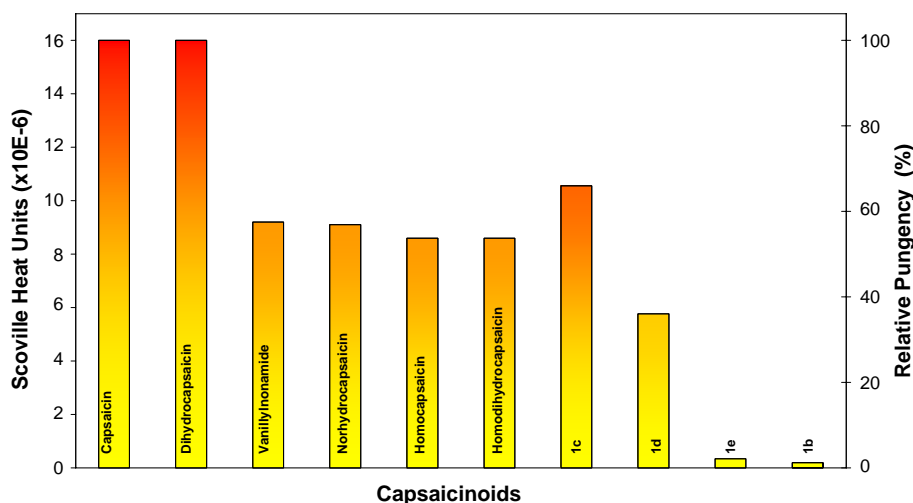


Fig. 2. Relative pungency values (%) and Scoville Heat Units (SHU) of capsaicin analogues and natural capsaicinoids. For capsaicin analogues **1b–e** the relative pungency and SHU were estimated from the results of the sensory analysis and related to the pungency of capsaicin. For natural capsaicinoids SHU were obtained from the literature.

resulted in pungency values similar to those of most natural capsaicinoids.

Acknowledgments

The authors thank Fernando Gonzalez for technical assistance. Torres-Gavilán thanks CONACyT for M.Sc. fellowship 171119.

References

- Appendino, G., Minassi, A., Morello, A. S., De Petrocellis, L., & Di Marzo, V. (2002). *N*-acylvanillamides: development of an expeditious synthesis and discovery of new acyl templates for powerful activation of the vanilloid receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, *45*(17), 3739–3745.
- Bellot, J. C., Choisnard, L., Castillo, R. E., & Marty, A. (2001). Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification. *Enzyme and Microbial Technology*, *28*(4–5), 362–369.
- Castillo, E., Pezzotti, F., Navarro, A., & López-Munguía, A. (2003). Lipase-catalyzed Synthesis of Xylitol Monoesters: solvent engineering approach. *Journal of Biotechnology*, *102*(3), 251–259.
- Ferrer-Montiel, A., Garcia-Martinez, C., Morenilla-Palao, C., Garcia-Sanz, N., Fernandez-Carvajal, A., Fernandez-Ballester, G., et al. (2004). Molecular architecture of the vanilloid receptor: insights for drug design. *European Journal of Biochemistry*, *271*(10), 1820–1826.
- Govindarajan, V. S., & Sathyanarayana, M. N. (1991). Capsicum – Production, Technology, Chemistry, and Quality. 5. Impact on Physiology, Pharmacology, Nutrition, and Metabolism – Structure, Pungency, Pain, and Desensitization Sequences. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *29*(6), 435–474.
- Guieysse, D., Salagnad, C., Monsan, P., & Remaud-Simeon, M. (2003). Lipase-catalyzed enantioselective transesterification toward esters of 2-bromo-tolylacetic acids. *Tetrahedron-Asymmetry*, *14*(3), 317–323.
- Iida, T., Moriyama, T., Kobata, K., Morita, A., Murayama, N., Hashizume, S., et al. (2003). TRPV1 activation and induction of nociceptive response by a non-pungent capsaicin-like compound, capsiate. *Neuropharmacology*, *44*(7), 958–967.
- Janusz, J. M., Buckwalter, B. L., Young, P. A., Lahann, T. R., Farmer, R. W., Kasting, G. B., et al. (1993). Vanilloids. I. Analogs of capsaicin with antinociceptive and antiinflammatory activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, *36*(18), 2595–2604.
- Kobata, K., Kawamura, M., Toyoshima, M., Tamura, Y., Ogawa, S., & Watanabe, T. (1998a). Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs by amidation of vanillylamine with fatty acid derivatives. *Biotechnology Letters*, *20*(5), 451–453.
- Kobata, K., Kobayashi, M., Tamura, Y., Miyoshi, S., Ogawa, S., & Watanabe, T. (1999). Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs by transacylation of capsaicin with natural oils or fatty acid derivatives in *n*-hexane. *Biotechnology Letters*, *21*(6), 547–550.
- Kobata, K., Kobayashi, M., Kinpara, S., & Watanabe, T. (2003). Supercritical CO₂ as a reaction medium for synthesis of capsaicin analogues by lipase-catalyzed transacylation of capsaicin. *Biotechnology Letters*, *25*(18), 1575–1578.
- Kobata, K., Toyoshima, M., Kawamura, M., & Watanabe, T. (1998b). Lipase-catalyzed synthesis of capsaicin analogs using natural oils as an acyl donor. *Biotechnology Letters*, *20*(8), 781–783.
- Macho, A., Lucena, C., Sancho, R., Daddario, N., Minassi, A., Munoz, E., et al. (2003). Non-pungent capsaicinoids from sweet pepper – synthesis and evaluation of the chemopreventive and anticancer potential. *European Journal of Nutrition*, *42*(1), 2–9.
- Meilgaard, M., Civille, G. V., & Carr, B. T. (1999). *Sensory evaluation techniques* (3rd ed.). New York: CRC Press LLC, p. 387.
- Nelson, E. K. (1919). Vanillyl-acyl amides. *Journal of American Chemical Society*, *41*(12), 2121–2130.
- Ordóñez, A. I., Ibañez, F. C., & Torre, P. (2002). Estudio preliminar sobre la sensibilidad humana a la capsicina como responsable de la percepción del picante. *Alimentaria extraordinario*, *335*, 123–126.
- Reyes-Duarte, D., Castillo, E., Martínez, R., & López-Munguía, A. (2002). Lipase-catalysed synthesis of olvanil in organic solvents. *Biotechnology Letters*, *24*(24), 2057–2061.
- Sancho, R., Lucena, C., Macho, A., Calzado, M. A., Blanco-Molina, M., Minassi, A., et al. (2002). Immunosuppressive activity of capsaicinoids: capsiate derived from sweet peppers inhibits NF-kappaB activation and is a potent antiinflammatory compound in vivo. *European Journal of Immunology*, *32*(6), 1753–1763.
- Smidt, H., Fischer, A., Fischer, P., & Schmid, R. D. (1996). Preparation of optically pure chiral amines by lipase-catalyzed enantioselective hydrolysis of *N*-acyl-amines. *Biotechnology Techniques*, *10*(5), 335–338.
- Szolcsanyi, J. (2004). Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides*, *38*(6), 377–384.
- Szolcsanyi, J., & Jancsogabor, A. (1975). Sensory effects of capsaicin congeners. I. Relationship between Chemical-Structure and Pain-Producing Potency of Pungent Agents. *Arzneimittel-Forsch*, *25*(12), 1877–1881.
- Walpole, C. S. J., Wrigglesworth, R., Bevan, S., Campbell, E. A., Dray, A., James, I. F., et al. (1993a). Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure–activity studies. 3. The hydrophobic side-chain C-region. *Journal of Medicinal Chemistry*, *36*(16), 2381–2389.
- Walpole, C. S. J., Wrigglesworth, R., Bevan, S., Campbell, E. A., Dray, A., James, I. F., et al. (1993b). Analogues of capsaicin with agonist activity as novel analgesic agents; structure–activity studies. 1. The aromatic “A-region”. *Journal of Medicinal Chemistry*, *36*(16), 2362–2372.

A2

ANEXO 2

The amidase activity of *Candida antarctica* lipase B is dependent on specific structural features of the substrates

A. Torres-Gavilán¹, E. Castillo¹, A. López-Munguía*

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico

Received 17 December 2005; received in revised form 31 May 2006; accepted 1 June 2006
Available online 5 July 2006

Abstract

The hydrolytic activity of *Candida antarctica* lipase B (**CAL-B**) was studied using 15 amides with different linear saturated acyl residues and substituents in the aromatic amine. A strong dependence of the hydrolysis rate on the length of the acyl residue and the substituents groups in the aromatic ring of the amides was demonstrated, with the highest hydrolytic initial reaction rates found for the C₁₀ acyl derivatives and benzylamides. The C₁₀ benzylamide, an amide without substituents in the aromatic ring was hydrolyzed almost as fast as capsaicin and five times faster than the corresponding C₁₀ vanillyl derivative. Therefore, a benzylamide bearing the non-linear unsaturated acyl residue of capsaicin (8-methyl-6-nonanoic acid) was synthesized. This substrate was hydrolyzed four times faster than capsaicin. Although it has been widely claimed that lipases rarely display amidase activity, with this contribution we demonstrate that the amidase activity of **CAL-B** is dependent on the structural features of the substrate.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Lipase; Amide hydrolysis; Benzylamides; 3-Methoxybenzylamides vanillylamides; *Candida antarctica*

1. Introduction

Enzymes have been increasingly applied to the synthesis of a wide variety of organic compounds replacing traditional chemical processes, particularly due to their enantio-, chemo- and regio-selective properties. Among the commercially available biocatalysts, those based on lipases are one of the most frequently used, because of the remarkable catalytic versatility of these enzymes. Lipases and particularly **CAL-B** have been used in the resolution and preparation of chiral alcohols, carboxylic acids, esters, amides and lactones, via synthesis, hydrolysis, alcoholysis, acidolysis or transesterification reactions [1–3]. In recent years, particular attention has been given to the resolution of chiral amines for the preparation of chiral building blocks [4]. However, the lack of amidase activity in lipases [2,5–8], does not allow the biocatalytic effective resolution of amines via a sequential amide synthesis–hydrolysis process. In general, low efficiencies have been obtained in the few reports where the

hydrolysis of chiral amides has been attempted with lipases and subtilisin [8,9]. In order to cope with this limitation, various strategies have been proposed.

It is well known that the catalytic mechanism of lipases acting on an acylated substrate is undertaken through the formation of an acyl-enzyme intermediate that facilitates the nucleophilic attack. Thus, hydrolysis of amides in the presence of **CAL-B** has been achieved when the acyl-enzyme complex formation is induced either through substrate activation, as already reported for amides with 2-methoxyacetic acid derivatives [9], or with particular substrate structures such as amides of medium or long-chain acyl residues [10] (Scheme 1). In the same context, it has been demonstrated that *p*-substitution increases the hydrolysis of 1-phenyl-ethylamides (Scheme 1) [11].

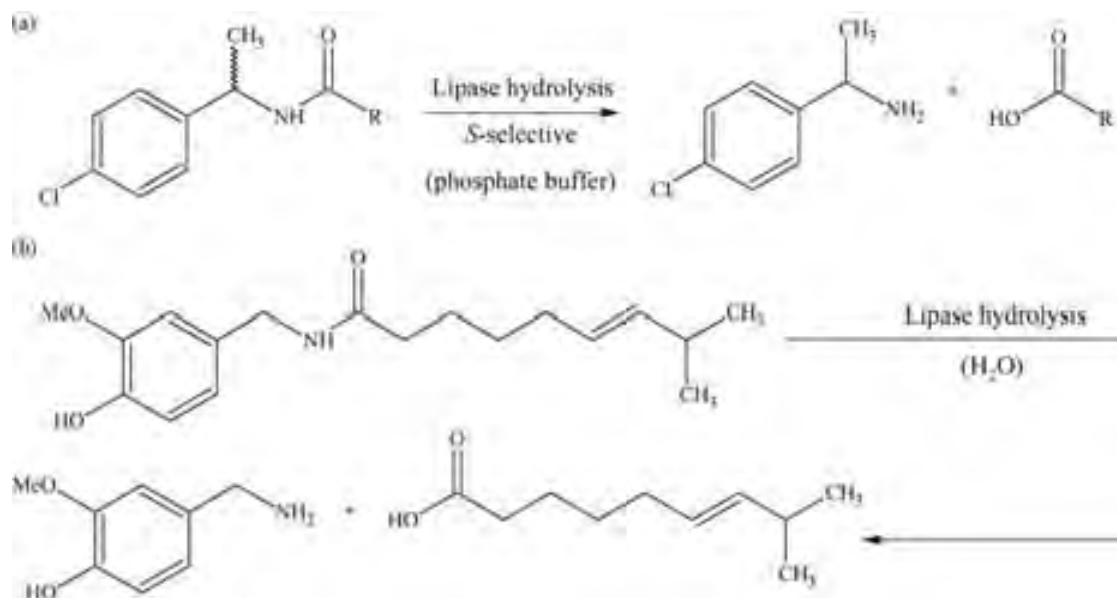
An alternative strategy consists in the modification of the enzyme through protein engineering, as recently reported by Fujii et al., 2005 [12]. These authors constructed a double mutant of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* that gave a 2-fold increase in relative amidase activity when compared to that of the wild-type enzyme.

In order to explore the influence of substrate structural features on the feasibility of amide hydrolysis by lipases and to extend the range of amides suitable for lipase hydrolysis, in this

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56227637; fax: +52 777 3172388.

E-mail address: agustin@ibt.unam.mx (A. López-Munguía).

¹ The authors contributed equally to this work.



Scheme 1. (a) Use of 2-methoxyacetic acid derivative and *p*-chloro substituted phenylethylamine to enhance the hydrolytic activity in the lipase-catalyzed amide hydrolysis, from literature R = CH₂OCH₃ [9], R = CH₃ [11]. (b) Lipase-catalyzed hydrolysis of long acyl-chain amides (capsaicin) [10].

report we explore the effect of fatty acid chain length and the chemical nature of various arylamides on their susceptibility of hydrolysis by CAL-B.

2. Materials and methods

2.1. Materials

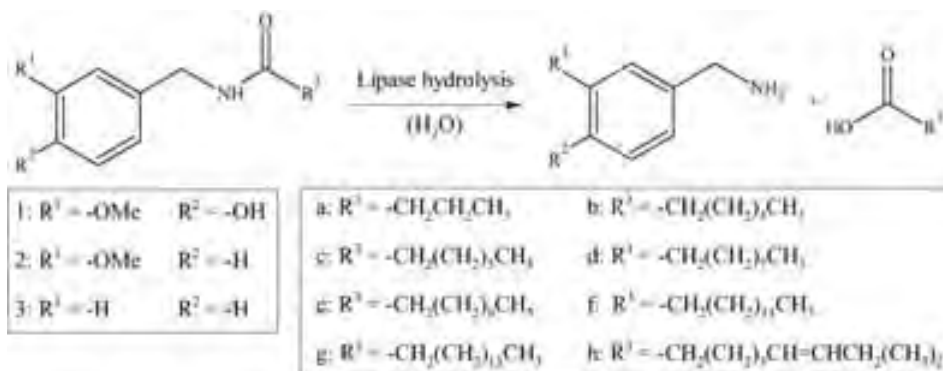
Immobilized lipase B from *Candida antarctica* (Novozym 435 CAL-B) was kindly supplied by Novozymes A/C (México city, Mexico). 2-Methyl-2-butanol (99.7%) methanol and acetonitrile (HPLC grade) were purchased from J.T. Backer (Edo. de México, Mexico). Vanillylamine hydrochloride (98%), 3-methoxybenzylamine (98%), capric acid (99%), ethyl butyrate (99%), ethyl caprylate (99%), molecular sieves (5 Å beads, 8–12 mesh), vanillylalcohol (98%) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIPEA) were from Aldrich (WI, USA). Benzylamine (99%), capsaicin (97%), methyl caproate (99%), lauric (99%), myristic (99%) and palmitic (99%) acids were purchased from Sigma Chemical Co. (MO, USA).

2.2. Amide synthesis

Synthesis of amides reported in Scheme 2 were carried out in 5 ml sealed vessels at 45 °C agitated with magnetic stirring at equimolar ratio of the amine and acyl-donor (20 mM) in 2-methyl-2-butanol, fully dehydrated with molecular sieves.

In the synthesis of vanillylamides a tertiary amine (DIPEA) and vanillylamine hydrochloride (VAM-HCL) in a molar ratio of 18:1 were pre-incubated for 30 min to release vanillylamine. Reactions were started with the addition of 20 mg/ml of Novozym 435 as biocatalyst. In order to control the water activity (*A_w*) during the reaction, 20 mg/ml of molecular sieves were added to the reaction vessels. The structural analysis and purification process of all amides are described elsewhere [13].

For the synthesis of (*E*)-*N*-benzyl-8-methyl-6-nonenamide, an esterification reaction between vanillylalcohol and capsaicin (30:15 mM) was first carried out in 10 ml sealed vessels at 45 °C agitated with magnetic stirring in *n*-hexane fully dehydrated with molecular sieves. A yield of 48% of capsaite (the ester analogue of capsaicin) was obtained and purified by flash chromatography



Scheme 2. Nature of amine substituents and fatty acid residues considered for hydrolysis by *Candida antarctica* lipase B.

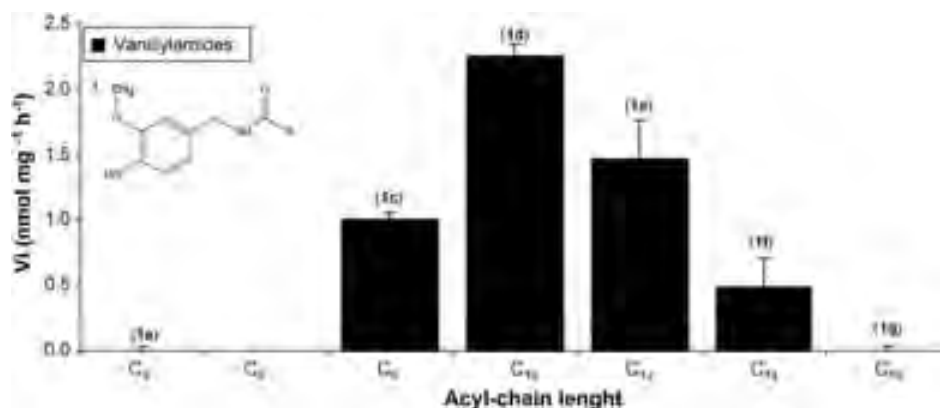


Fig. 1. Effect of the acyl-chain length on the initial reaction rate of the lipase-catalyzed vanillylamide hydrolysis.

(*n*-hexane/ethyl acetate 70:30). The purified capsiate was then subjected to an aminolysis reaction with benzylamine in 10 ml sealed vessels at 45 °C with magnetic stirring, using an equimolar ratio of capsiate and benzylamine (15 mM) in 2-methyl-2-butanol fully dehydrated with molecular sieves. A 99% yield of (*E*)-*N*-benzyl-8-methyl-6-nonenamide was obtained.

2.3. Amide hydrolysis

All hydrolysis reactions were carried out in 5 ml sealed vessels at 70 °C with magnetic stirring. The total amide concentration was 1.5 mM in deionized water at pH 7.5 forming bifasic mixtures. The reaction was started by the addition of 6 mg/ml of the enzyme. Samples of 50 μ l were withdrawn at regular intervals during 8 h and centrifuged (16,000 \times g \times 3 min) to separate the enzyme; the products were finally analyzed by HPLC.

2.4. HPLC analysis

Reaction products were quantified by HPLC using a Waters 600E system controller (Waters Corp., Milford, MA) with a flow rate of 1 ml min⁻¹ equipped with a Waters 996 photodiode array detector. Vanillylamine and 3-methoxybenzylamine were separated with a Waters Spherisorb ODS-2 column (4.6 mm \times 250 mm, Waters Corp., Milford, MA). Vanillylamine was eluted with a solvent mixture of 50:50 (v/v) methanol–water and detected at 230 nm (3.5 min). 3-Methoxybenzylamine was eluted with a solvent mixture of 70:30 (v/v) acetonitrile–water and detected at 275 nm (4.0 min). Benzylamine was separated with a Supelcosil C₁₈ column (3.9 mm \times 300 mm, Supelco, Bellefonte, PA) operating at a solvent mixture of 70:30 (v/v) acetonitrile–phosphate buffer (25 mM, pH 4.2) and detected at 206 nm (5.1 min).

3. Results and discussion

3.1. Effect of the fatty acid chain length on the hydrolysis of vanillylamides

The initial reaction rate of hydrolysis of different vanillylamides containing acyl residues C₄ and C₈–C₁₆ (**1a** and

1c–g, Scheme 2), was determined in similar conditions to those previously reported for capsaicin hydrolysis: 1.5 mM of substrate and 6 mg/ml of enzyme at 70 °C in 5 ml of deionized water [10]. As shown in Fig. 1, only medium acyl-chain length amides (C₈–C₁₄ **1c–f**) were hydrolyzed at significant reaction rates, with the highest value found for the C₁₀ acyl amide (**1d**, 2.3 nmol mg⁻¹ h⁻¹). In the case of esters, previous reports point out that the catalytic efficiency of **CAL-B** is enhanced with medium and long-chain acyl donors [14–16]. The vanillylamides containing C₄ and C₁₆ acyl residues (**1a** and **1g**) were not hydrolyzed after 4 days. These results are consistent with previous reports, where low hydrolysis rates were obtained with short-chain amides (C₂ or C₄), requiring 2-methoxyacetic acids and chlorophenyl derivatives for the improvement of the hydrolysis reaction rate [9]. In general, it has been suggested that lipase substrate specificity is the consequence of the length and shape of the binding site of lipases, with steric hindrance increasing for long-chain fatty acids. For the short length fatty acids, specific interactions are significantly lower, resulting in lower reaction rates.

3.2. Hydrolysis of aromatic amides containing different substituents on the aryl ring

In order to explore the influence of the substituent group in the vanillylamine, hydrolysis of 3-methoxybenzyl- and benzylamides containing acyl-chains of different lengths (**2b–e** and **3b–e**, respectively) was carried out in similar conditions as those described above. These results are shown in Fig. 2 where it is interestingly to observe that a similar acyl-chain length activity profile as the one already described with vanillylamides was obtained, with the highest reaction rates also found for the C₁₀ 3-methoxybenzyl- (**2d**, 5.2 nmol mg⁻¹ h⁻¹) and benzylamide (**3d**, 11.3 nmol mg⁻¹ h⁻¹). Comparing the hydrolysis reaction rate of the C₁₀ amides **2d** and **3d** with the hydrolysis rate obtained for the corresponding vanillylamide **1d**, it may be concluded that the absence of substitutions in the benzyl ring increases the lipase specificity as the hydrolysis rate increases 2.3- and 5-fold, respectively.

A similar behaviour has already been reported for various substituents of the phenyl ring in the hydrolysis of butanoates

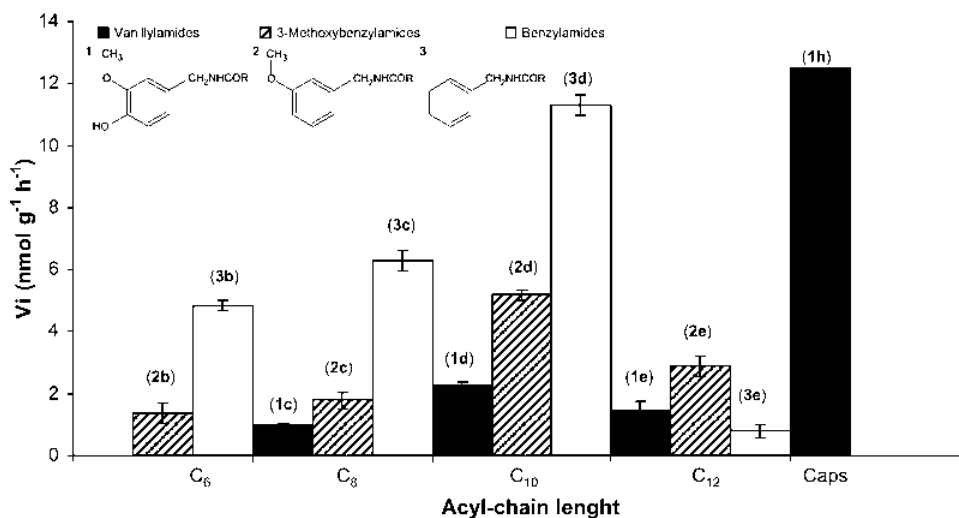


Fig. 2. Effect of the acyl-chain length and leaving group in the initial rate of the lipase-catalyzed vanillylamide hydrolysis. Caps (**1h**): initial reaction rate of capsaicin from literature [10].

of *o*-, *m*- or *p*-substituted phenols, where the rate differences are more evident due to the stronger inductive effect of the substituted phenyl ring [17]. Nevertheless, it may be also possible that the differences arise from the interaction of the aryl ring substituent with the active site [11,17,18]. In fact, in a previous report we have demonstrated a similar preference profile in the lipase-catalyzed synthesis of the vanillyl-3-methoxybenzyl- and benzylamides containing same acyl-chains, where the higher initial reaction rates were observed for benzylamides, intermediate rates for 3-methoxybenzylamides and the lowest rates for vanillylamides [13].

Despite the higher hydrolysis rate found for C₁₀ benzylamide (**3d**), it was not possible to reach the capsaicin (**1h**) hydrolysis rate. As the only difference is the unsaturated and branched nature of the acyl group (8-methyl-6-nonanoic acid), we decided to explore the specificity of **CAL-B** towards an amide bearing the benzyl ring and this acyl residue. As expected, the hydrolysis rate of this new amide (**3h**, 45.6 nmol mg⁻¹ h⁻¹) was notably higher than the hydrolysis rate of capsaicin (**1h**, 12.5 nmol mg⁻¹ h⁻¹) (3.7-fold), as shown in Fig. 3.

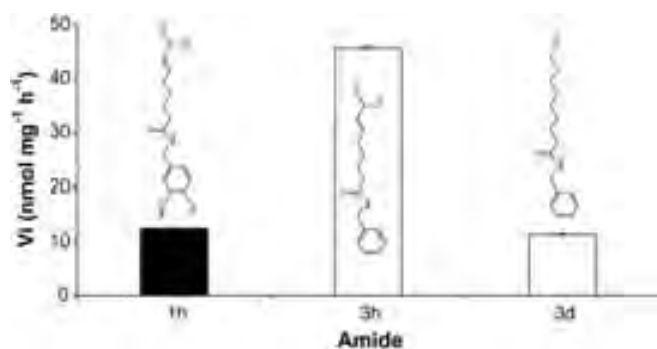


Fig. 3. Increase on the initial reaction rate in the lipase-catalyzed benzylamide (**3h**) hydrolysis by the combined favourable effect of the branched unsaturated acyl residue and benzylamine. Caps (**1h**): initial reaction rate of capsaicin from literature [10].

4. Conclusions

Sixteen different amides were synthesized and subjected to hydrolysis with lipase B from *C. antarctica*. It was established that the efficiency in terms of reaction rate of this process is directly related to the structural features of the substrate. Particularly, the strict dependence of the hydrolysis rate on the length of the acyl residue of the amides was demonstrated. Indeed, in terms of amides containing linear saturated fatty acids, the highest initial reaction rates of hydrolysis were obtained with the C₁₀ acyl derivatives (**1–3d**). A strong influence of the substituents in the amide aryl ring on the catalytic behaviour of lipases was also observed, the highest rate obtained for benzylamides and the lowest for vanillylamides. Despite the combination of these two optimal structural features in C₁₀ benzylamide (**3d**), it was hydrolyzed at lower rate than capsaicin (**1h**). The hydrolysis of an amide containing the non-linear unsaturated acyl residue of capsaicin (8-methyl-6-nonanoic acid) and the benzyl aryl ring was 3.7 times faster than capsaicin and four times faster than the corresponding hydrolysis rate of the C₁₀ benzyl derivative **3d**. In summary, we have demonstrated that amide hydrolysis by **CAL-B** strongly depends on substrate structural features. The use of this strategy opens the possibility to increase the impact of lipases in organic synthetic processes as an optimum amine or acyle derivative may be chosen for the effective resolution of a given chiral amine.

Acknowledgments

The authors thank Fernando Gonzalez for technical assistance. A. Torres-Gavilán thanks CONACyT for M.Sc. fellowship 171119.

References

- [1] R.D. Schmid, R.A. Verger, Chem. Int. Edit. 37 (1998) 1608–1633.
- [2] V.B. Gotor, Med. Chem. 7 (1999) 2189–2197.

- [3] U.T. Bornscheuer, R.J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis*, Wiley-VCH, 1999.
- [4] F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, *Tetrahedron* 60 (2004) 501–519.
- [5] N.N. Gandhi, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 74 (1997) 621–634.
- [6] M.S. de Castro, J.V.S. Gago, *Tetrahedron* 54 (1998) 2877–2892.
- [7] T. Maruyama, M. Nakajima, H. Kondo, K. Kawasaki, M. Seki, M. Goto, *Enzyme Microb. Technol.* 32 (2003) 655.
- [8] D.T. Guranda, A.I. Khimiuk, L.M. van Langen, F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, V.K. Svedas, *Tetrahedron: Asymmetry* 15 (2004) 2901.
- [9] T. Wagegg, M.M. Enzelberger, U.T. Bornscheuer, R.D. Schmid, *J. Biotechnol.* 61 (1998) 75–78.
- [10] D. Reyes, R.E. Castillo, E. Bázana, A. Lopez-Munguia, *Biotechnol. Lett.* 22 (2000) 1811–1814.
- [11] H. Smidt, A. Fischer, P. Fischer, R.D. Schmid, *Biotechnol. Tech.* 10 (1996) 335–338.
- [12] R. Fujii, Y. Nakagawa, J. Hiratake, A. Sogabe, K. Sakata, *Protein Eng. Des. Sel.* 18 (2005) 93–101.
- [13] E. Castillo, A. Torres-Gavilan, P. Severiano, N. Arturo, A. Lopez-Munguia, *Food Chem.* (2006) in press.
- [14] C. Otero, J.A. Arcos, M.A. Berrendero, C.J. Torres, *Mol. Catal. B-Enzym.* 11 (2001) 883–892.
- [15] J. Ottosson, K.J. Hult, *Mol. Catal. B-Enzym.* 11 (2001) 1025–1028.
- [16] S. Soultani, J.M. Engasser, M. Ghoul, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 11 (2001) 725–731.
- [17] U.T. Bornscheuer, G. Rodriguez-Ordonez, A. Hidalgo, A. Gollin, J. Lyon, T.S. Hitchman, D.P. Weiner, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 36 (2005) 8–13.
- [18] D. Guieysse, C. Salagnad, P. Monsan, M. Remaud-Simeon, *Tetrahedron: Asymmetry* 14 (2003) 317–323.

A3

ANEXO 3



'Easy-on, easy-off' resolution of chiral 1-phenylethylamine catalyzed by *Candida antarctica* lipase B

A. Torres-Gavilán,^a J. Escalante,^b I. Regla,^c A. López-Munguía^a and E. Castillo^{a,*}

^aInstituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62271, Mexico

^bCentro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, 62210, Mexico

^cFacultad de Estudios Superiores-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, 09230 México, D.F., Mexico

Received 7 July 2007; accepted 18 October 2007

Abstract—An 'easy-on, easy-off' process for the effective resolution of (\pm)-1-phenylethylamine was designed using the lipase B of *Candida antarctica*. This two step lipase-catalyzed process for the resolution of a chiral arylalkylamine involves a high-conversion enantioselective condensation of (*R*)-(+)-1-phenylethylamine with capric acid (conversion 99%, <24 h), followed by the hydrolysis of the corresponding synthesized (*R*)-(+)-amide (conversion 98%, 48 h). As a result, this efficient enzymatic process yields both (*R*)- and (*S*)-enantiomers of 1-phenylethylamine in high enantiomeric purity.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Enantiopure compounds are used in the fine-chemical, pharmaceutical, and agrochemical industries for applications as resolving agents, chiral auxiliaries, and chiral synthetic building blocks.¹ Consequently, a current research goal is to develop robust and cost-effective catalytic techniques for the production of enantiopure compounds in high enantiomeric excess.² Particular attention has been given to the effective resolution of chiral amines such as (\pm)-1-phenylethylamine (PhEA), broadly used as simple and yet powerful intermediate in industrial asymmetric synthesis or as chiral adjuvant.^{3,4} A variety of chemical and enzymatic methods have been reported to obtain both enantiomers of chiral 2-alkylamines in very high enantiomeric excess (99% minimum, preferably >99.5%).² However, most of these strategies involve multi-step transformations⁵ and low effective fractional recrystallizations.⁶

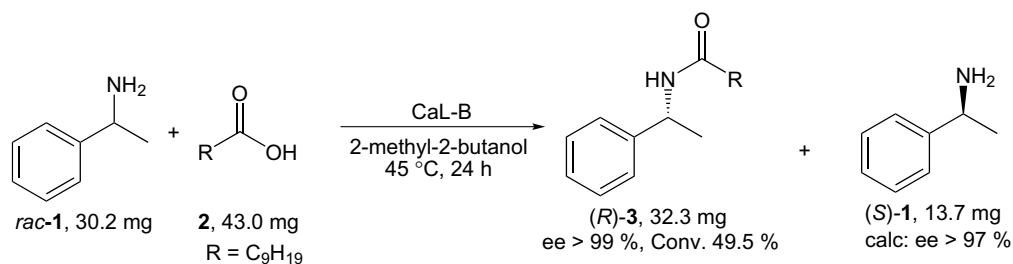
Although lipase-catalyzed acyl transfer reactions have been demonstrated to be a very useful alternative for the resolution of chiral amines, in general these procedures do not meet the criteria of high yield and high enantiomeric excess for both enantiomers. In fact, the main drawback of enzymatic procedures has been attributed to the null or very

low amidase activity of lipases,^{7–9} restricting part of the biocatalytic process with the resolution of only one of the enantiomers (the unreactive chiral amine); indeed, the harsh conditions associated to the hydrolysis of the acylated pure enantiomers (concentrated acid media, 16–48 h, $T > 100$ °C)^{2,10,11} make the isolation of the pure enantiomer from the resolved amide difficult. Recently, a full enzymatic process, coined as 'easy-on, easy-off', was proposed as a practical tool for the effective resolution of *rac*-PhEA. This process consists of a sequential amide synthesis–hydrolysis process catalyzed by penicillin acylase from *Alcaligenes faecalis* in an aqueous medium, yielding highly pure PhEA enantiomers.¹² Herein, we report a contribution to the effective resolution of PhEA and to the 'easy-on, easy-off' technology by the use of lipase B from *Candida antarctica* (CaL-B) as the enantioselective agent for the effective resolution of *rac*-PhEA. CaL-B, contrary to proteases, amidases, or esterases, has a broad specificity, and its stability in organic solvents allows the extension of the 'easy-on, easy-off' technology to a wide variety of molecules.

2. Results and discussion

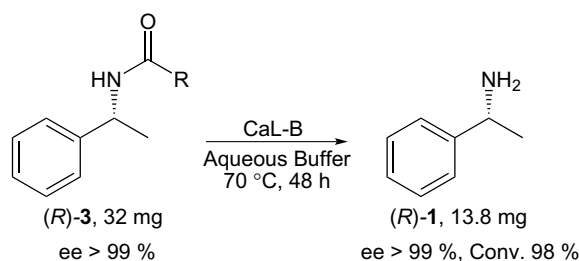
The general strategy for this process consists of a first step of enantioselective acylation of *rac*-PhEA *rac*-1 with capric acid **2** carried out in 2-methyl-2-butanol (2M2B) (Scheme 1) and a second step in which the hydrolysis of

* Corresponding author. Tel.: +52 (55) 56 22 76 09; fax: +52 (777) 17 23 88; e-mail: edmundo@ibt.unam.mx



Scheme 1. Lipase-catalyzed preparation of enantiomerically pure (*S*)-1.

the acylated (*R*)-(+)-PhEA-enantiomer (*R*)-3 is carried out at pH 7 in phosphate buffer (Scheme 2). Other acids can be used instead of capric acid either for the synthesis or hydrolysis, although as previously reported for amide hydrolysis, higher reaction rates were observed for the C₁₀ acyl residue.²¹



Scheme 2. Lipase-catalyzed preparation of enantiomerically pure (*R*)-1.

For the enantioselective acylation of *rac*-PhEA, a reaction mixture containing 12.1 mg (0.01 mmol) of *rac*-1, 17.2 mg (0.01 mmol) of **2**, 50 mg of CaL-B, 50 mg of molecular sieves and 5 ml of 2M2B in a 7 ml vessels was agitated at 45 °C for 24 h, to reach a conversion of 49.5% of *rac*-1 as determined by HPLC.¹³ At the end of the acylation reaction, the mixture was filtered to remove the enzyme and molecular sieves, and 2M2B was evaporated; the unreacted PhEA and amide **3** were purified from the crude reaction by flash chromatography. The enantiomerically pure (*R*)-3 amide was obtained as a white powder (12.8 mg, yield 95%) and the enantiomerically pure (*S*)-1 amine as a colorless liquid (5.5 mg, yield 90%, calcd ee = 97%). The enantiomeric excess (ee) of (*R*)-3 was determined by chiral HPLC (ee = 99%). These results confirm the high enantioselectivity of CaL-B and the feasibility of amide synthesis in 2M2B.¹³

In fact, when the lipase-catalyzed amidation of PhEA is carried out in hydrophobic solvents such as hexane, ethyl or di-isopropyl ether, or in solvent free media, yields are considerably lower.^{2,10,14} Recently, the high conversion of **1** (97%) in ionic liquids was reported using dodecanoic acid as the acyl donor.¹⁵ It is interesting to note that high yields on amide synthesis obtained in ionic liquids and 2M2B are the consequence of a high solubility of amides in polar solvents,¹⁶ which favor the accumulation of more polar products at equilibrium.^{16,17}

Up until now, the enantioselective hydrolysis of amides has been limited to proteases or amidases. However, these

enzymes have a narrow specificity and a low stability in organic solvents. On the other hand, although it has been reported that lipases have a restricted activity toward amide hydrolysis, various strategies have been proposed to cope with this limitation. One alternative is the use of activated substrates such as methoxyacetate, to enhance lipase activity.^{18,19}

Recently, we have reported that, contrary to the generalized belief that lipases do not hydrolyze amides, CaL-B possess an amidase activity which is strongly dependent on the specific structural features of the substrates; indeed, amides with non-substituted aryl residues and medium acyl chain are readily hydrolyzed by CaL-B.^{20,21}

Based on these reports, a small scale hydrolysis reaction was carried out with 2.06 mg (0.0075 mmol) of (*R*)-3, obtained in the first step, in 5 ml of phosphate buffer incubated at 70 °C with 30 mg of CaL-B (6 mg/ml). After 48 h of reaction 71% yield was obtained as determined by HPLC. The unreacted amide (*R*)-3 and the enzyme were filtered from the reaction medium, and the filtrate pH adjusted to 11 with NaOH. Finally, the enantiomerically pure (*R*)-1 amine was recovered completely by ethyl acetate extractions (80% yield). In agreement with our previous work, an efficient hydrolysis was observed for a C₁₀ acyl derivative and a non-substituted aryl ring.²¹ Indeed, it is well known that the catalytic mechanism of lipases acting on an acylated substrate is undertaken through the formation of an acyl-enzyme intermediate that facilitates nucleophilic attack; this intermediate is particularly favored with substrate structures, such as amides of medium- or long-chain acyl residues.

To evaluate the whole process on a larger scale, an amide synthesis (easy-on) was carried out in 2.5 ml of 2M2B with 30.2 mg of *rac*-1, 43.0 mg of **2** (100 mM of both substrates) and 25 mg of CaL-B. After 24 h of reaction, a 49.5% of *rac*-1 was converted and 32.3 mg of (*R*)-3 and 13.7 mg of (*S*)-1 were recovered by flash chromatography (Scheme 1).

In the first attempt to hydrolyze (easy-off) the (*R*)-3 amide (32 mg) in volumes lower than 20 ml, severe stirring and diffusional problems were encountered. Therefore, to scale-up the process under constant hydrodynamic conditions, we maintained equivalent concentration ratios as those used for the hydrolysis on a low scale: 32 mg of (*R*)-3 amide and 495 mg of CaL-B (6 mg/ml) resuspended in 82 ml of phosphate buffer, incubated at 70 °C. With

these scaled conditions, better yields than those obtained in the small scale experiment for the enantiomerically pure (*R*)-**1** amine were observed (98%) in 48 h (Scheme 2).²² The enzymatic hydrolysis herein described results in better yields than those already reported for the selective hydrolysis of arylamides.²³ Indeed, conversion yields of 98% were obtained in the hydrolysis of (*R*)-**3** amide in 48 h, while in general 7–10 days are required to obtain similar yields in lipase-catalyzed hydrolysis of amides.¹

3. Conclusion

In conclusion, the whole lipase-catalyzed 'easy-on, easy-off' strategy described here considers an integrated synthesis–hydrolysis process where both enantiomerically pure (*R*)-**1** and (*S*)-**1** amines are obtained in good yields and high enantiomeric excess. This strategy involves not only a single biocatalyst in an effective two step resolution process, but also it is successfully applied to the resolution of PhEA, one of the most powerful intermediates used in industrial asymmetric synthesis as a chiral adjuvant and as a ligand in asymmetric catalysis.³ We are currently working on an extension of this effective enzymatic resolution process for other amines, alcohols, and amino-alcohols.

4. Experimental

4.1. Materials

Methanol (99%) and 2-methyl-2-butanol (2M2B, 99.7%) were purchased from J.T. Baker (Edo. De México, México). Tetrahydrofuran (>99%), (\pm)-1-phenylethylamine (*rac*-PhEA, 99%), (*S*)-(-)-1-phenylethylamine (\geq 98%), capric acid (99%) and molecular sieves (8–12 mesh) were purchased from Aldrich (WI, USA). The lipase B from *C. antarctica*, Novozym 435 (CaL-B) was obtained from Novozymes-México A/C (México).

4.2. HPLC analysis

Previous to HPLC analysis, enzyme and molecular sieves were separated from all samples by centrifugation at 1700g for 3 min. The reactions were quantified by HPLC using a Waters Spherisorb 80-5 ODS-2 column (4.6 \times 250) mm and a Waters 600E system controller (Waters Corp. Milford, MA, USA) with a flow rate of 1 ml min⁻¹. The effluent was a methanol–phosphate buffer (20 mM, pH 3.8) 70:30 (v/v) solution. The production or consumption of amine in the hydrolysis and synthesis, respectively, was quantified with a water 996 photodiode array detector at 206 nm.

4.3. Chiral HPLC analysis

Enantiomeric excesses of the amide were quantified by chiral HPLC with a CHIRALCEL OJ-H column (4.6 \times 250 mm) (Chiral Technologies Inc., West Chester PA, USA). The effluent was *n*-heptane/ethanol 97:3 (v/v) with a flow rate of 1 ml min⁻¹. The retention time for the *N*-[(*S*)-(-)-1-phenylethyl]decanamide is 8.7 min and 7.5 min

for the *N*-[(*R*)-(+)-1-phenylethyl]decanamide. To identify each enantiomer, a standard of *N*-[(*S*)-(-)-1-phenylethyl]decanamide enantiomer was chemically synthesized.

4.4. Structure determination

¹H NMR and ¹³C NMR spectra were obtained using a Bruker Ultra Shield spectrometer run at 300 MHz and 75 MHz, respectively. Elemental analysis was obtained in a Thermofinnigan EA 112 instrument. High resolution mass spectrometry analyses (FAB+) were performed on a Jeol JMS-SX 102A mass spectrometer. Xenon was used as the bombarding gas with an energy of 10 kV using PEG 600 as internal standard and 3-nitrobenzyl alcohol as the matrix. Optical rotations were determined in a 10 cm, 1 ml cell, Perkin–Elmer-341 polarimeter. All melting points were determined in an Electrothermal MEL-TEMP apparatus and are uncorrected.

4.4.1. Chemical synthesis of *N*-[(*S*)-(-)-1-phenylethyl]decanamide (S**)-**3**.** A stirred solution of capric acid **2** (1.0 g, 1.1 ml, 5.8 mmol) in 100 ml of CH₂Cl₂ was treated with 1.29 g (6.3 mmol) of DCC, 0.04 g (0.4 mmol) of DMAP, and 0.81 ml (0.76 g, 6.3 mmol) of (*S*)-(-)-1-phenylethylamine (**S**)-**1**. The mixture was stirred overnight and then filtered and concentrated in vacuo. Flash Chromatography was packed with silica gel 230–400 mesh (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and eluted with 90:10 hexane/ethanol, afforded the pure *N*-[(*S*)-(-)-1-phenylethyl]decanamide enantiomer [(*S*)-**3**] as a white powder. Yield after isolation 81%, white powder, mp = 50–52 °C, $[\alpha]_D^{24} = -64.7$ (*c* 0.7, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 0.89 (t, 3H, *J* = 6.93), 1.27 (s, 10H), 1.49 (d, 3H, *J* = 6.9), 1.63 (m, 2H), 2.17 (t, 2H, *J* = 7.9), 5.15 (m, 1H), 5.77 (d, 1H, *J* = 7.2), 7.27–7.36 (m, 5H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75.46 MHz) δ = 15.4, 21.9, 22.86, 25.95, 29.45, 29.46, 29.54, 29.64, 32.05, 37.10, 48.71, 126.37, 127.5, 128.83, 143.49, 172.4. Elemental Anal. Calcd for C₁₈H₂₉NO: C, 78.49; H, 10.61; N, 5.09. Found: C, 78.35; H, 10.99; N, 4.68.

4.5. Enzymatic reactions

4.5.1. Synthesis of *N*-[(*R*)-(+)-1-phenylethyl]decanamide (R**)-**3**.** In a general procedure, the reaction was carried out at 45 °C in magnetically agitated 7 ml sealed vessels containing 12.1 mg (0.01 mmol) of *rac*-PhEA *rac*-**1**, 17.2 mg (0.01 mmol) of capric acid **2**, 50 mg of molecular sieves and 5 ml of 2M2B previously dehydrated with molecular sieves. The reactions were started by the addition of 50 mg of CaL-B. After 24 h, the *N*-[(*R*)-(+)-1-phenylethyl]decanamide enantiomer (**R**)-**3** and unreacted 1-phenylethylamine were recovered in a flash chromatography system. Column was packed with silica gel 230–400 mesh (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and eluted with 90:10 hexane/ethanol.

Yield after isolation 95%, white powder, melting point 45–47 °C, $[\alpha]_D^{24} = +67.5$ (*c* 0.7, CHCl₃). ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ = 0.89 (t, 3H, *J* = 6.93), 1.27 (s, 10H), 1.49 (d, 3H, *J* = 6.9), 1.63 (m, 2H), 2.17 (t, 2H, *J* = 7.9), 5.15 (m, 1H), 5.77 (d, 1H, *J* = 7.2), 7.27–7.36 (m, 5H). ¹³C

NMR (CDCl₃, 75.46 MHz) δ = 15.4, 21.9, 22.86, 25.95, 29.45, 29.46, 29.54, 29.64, 32.05, 37.10, 48.71, 126.37, 127.5, 128.83, 143.49, 172.4. Elemental Anal. Calcd for C₁₈H₂₉NO: C, 78.49; H, 10.61; N, 5.09. Found: C, 77.51; H, 11.14; N, 4.72.

4.5.2. Hydrolysis of *N*-[(*R*)-(+)-1-phenylethyl]decanamide (*R*)-3. In a general procedure, the reaction was carried out with 2.06 mg (0.0075 mmol) of *N*-[(*R*)-(+)-1-phenylethyl]decanamide enantiomer (*R*)-3 obtained in the enzymatic synthesis, in 5 ml of phosphate buffer incubated at 70 °C with 30 mg of CaL-B (6 mg/ml). After 48 h, the yield of liberated (*R*)-(+)-PhEA enantiomer was determined by HPLC.

Acknowledgments

The authors thank Dra. Virginia Walbot for style corrections as well as Fernando Gonzalez from IBT and Luis Velasco from the Instituto de Quimica (UNAM) for technical assistance. A. Torres-Gavilán thanks CONACyT for Ph.D. fellowship 171119. This work has been supported by grant IN226706-3 PAPIIT-UNAM. We thank Novozymes-México for their generous donation of CaL-B.

References

- Breuer, M.; Ditrich, K.; Habicher, T.; Hauer, B.; Kessler, M.; Stuurmer, R.; Zelinski, T. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, *43*, 788–824.
- Davis, B. A.; Durden, D. A. *Synth. Commun.* **2001**, *31*, 569–578.
- Juaristi, E.; Escalante, J.; León-Romo, J. L.; Reyes, A. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 715–740.
- Juaristi, E.; León-Romo, J. L.; Reyes, A.; Escalante, J. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 2441–2495.
- Noyori, R. *Asymmetric Catalysis in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons: New York, 1994.
- Acs, M.; Szili, T.; Fogassy, E. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 7325–7328.
- de Castro, M. S.; Gago, J. V. S. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 2877–2892.
- Gotor, V. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2189–2197.
- van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 501–519.
- Ohrner, N.; Orrenius, C.; Mattson, A.; Norin, T.; Hult, K. *Enzyme Microb. Technol.* **1996**, *19*, 328–331.
- Hu, S.; Tat, D.; Martínez, C. A.; Yazbeck, D. R.; Tao, J. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4329–4331.
- Guranda, D. T.; Khimiuk, A. I.; van Langen, L. M.; van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A.; Svedas, V. K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 2901–2906.
- Castillo, E.; López-González, I.; de Regil-Hernández, R.; Reyes-Duarte, D.; Sánchez-Herrera, D.; López-Munguía, A.; Darszon, A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *356*, 424–430.
- Gotor, V.; Menendez, E.; Mouloungui, Z.; Gaset, A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1993**, 2453–2456.
- Irimescu, R.; Kato, K. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2004**, *30*, 189–194.
- Reyes-Duarte, D.; Castillo, E.; Martínez, R.; López-Munguía, A. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 2057–2061.
- Bellot, J. C.; Choisnard, L.; Castillo, E.; Marty, A. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 362–369.
- Wagegg, T.; Enzelberger, M. M.; Bornscheuer, U. T.; Schmid, R. D. *J. Biotechnol.* **1998**, *61*, 75–78.
- Cammenberg, M.; Hult, K.; Park, S. *Chem. Bio. Chem.* **2006**, *7*, 1745–1749.
- Reyes-Duarte, D.; Castillo, E.; Bárzana, E.; López-Munguía, A. *Biotechnol. Lett.* **2000**, *22*, 1811–1814.
- Torres-Gavilán, A.; Castillo, E.; López-Munguía, A. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2006**, *41*, 136–140.
- After 48 h yield and enantiomeric purity of liberated (*R*)-(+)-PhEA was determined by chiral HPLC.
- Smidt, H.; Fischer, A.; Fischer, P.; Schmid, R. D. *Biotechnol. Tech.* **1996**, *10*, 335–338.

A4

ANEXO 4



Chemoenzymatic synthesis of the potential antihypertensive agent (2*R*,2'*S*)- β -hydroxyhomometoprolol

Ignacio Regla^{a,*}, Axel Luviano-Jardón^a, Patricia Demare^a, Enrique Hong^b, Alejandro Torres-Gavilán^c, Agustín López-Munguía^c, Edmundo Castillo^{c,*}

^a Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Batalla del 5 de mayo y Fuerte de Loreto, Iztapalapa 09230, Mexico

^b Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN, Apartado Postal 14-740, 07000, México, D.F., Mexico

^c Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, Mor. 62271, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2008

Accepted 5 November 2008

Available online 29 November 2008

ABSTRACT

The kinetic resolution of 1-chloro-3-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]-2-propanol *rac*-**4** with Novozym 435 and vinyl stearate, a key step in the gram-scale synthesis of (2*S*)-2-[[[(2*R*)-2-hydroxy-3-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]propyl]amino]-1-butanol (*R,S*)-**1** a potent antihypertensive agent currently under investigation, is reported here. Our approach differs from the previously reported synthesis, which involves a tedious and poorly effective fractional crystallization of (*R,S*)-**1**. This novel approach incorporates an enzymatic resolution for the efficient preparation of the oxirane precursor (*R*)-**3**. The two main advantages arising from this strategy are the high enantioselectivity of the enzymatic process and the facilitated recovery of the hydrophobic stearate intermediate (*S*)-**5**.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In the search for new antihypertensive drugs with better therapeutic potential and fewer side effects, we recently reported the synthesis and pharmacological evaluation of four new analogues of Metoprolol with an additional stereogenic center (Fig. 1).¹

Although these analogues did not cause β_1 -adrenergic receptor inhibition, the diastereomer with (*R*)-configuration at the second-

ary alcohol center and an (*S*)-configuration at C-2 of the nitrogen chain (*R,S*)-**1** showed significant, but short-lasting hypotension as well as a modest and short-lasting bradycardia, suggesting antiarrhythmic activity. This compound, (2*S*)-2-[[[(2*R*)-2-hydroxy-3-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]propyl]amino]-1-butanol (*R,S*)-**1**, was tentatively named (2*R*,2'*S*)- β -hydroxyhomometoprolol (Fig. 1).

The first step in the previously reported synthesis of the new compounds (*R,S*)-**1** and (*S,S*)-**1** involves the reaction between the

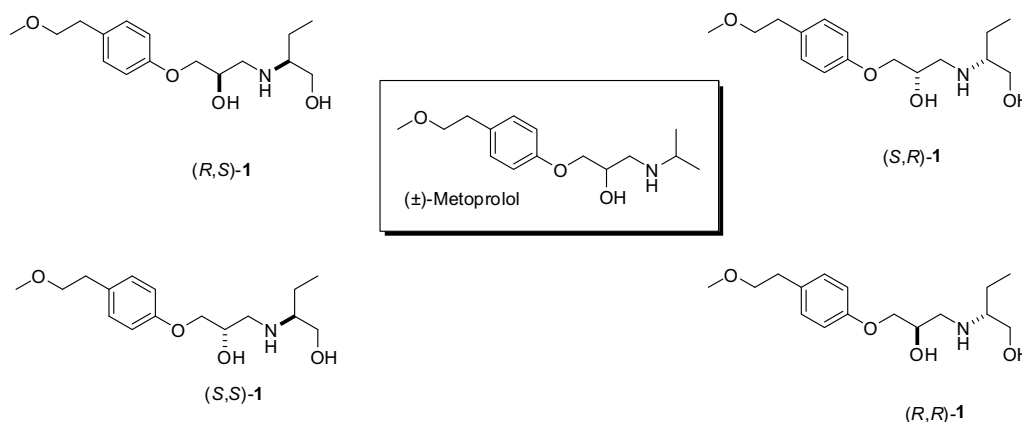
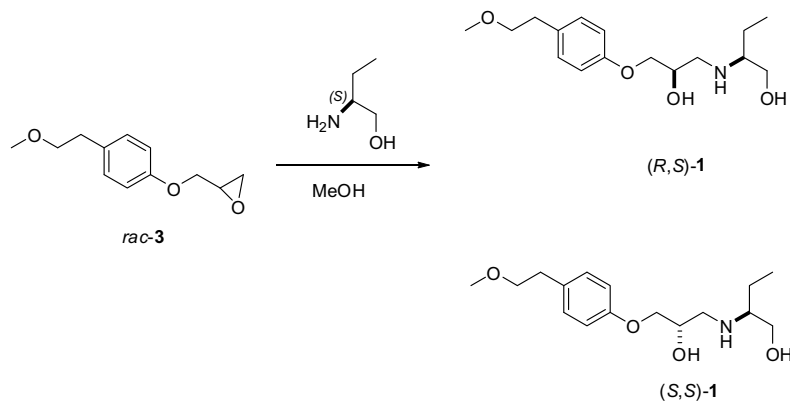


Figure 1. Structure of metoprolol and β -hydroxyhomometoprolol diastereomers.

* Corresponding authors. Tel.: +52 55 5623 0795; fax: +52 73 172388.

E-mail addresses: regla@unam.mx (I. Regla), edmundo@ibt.unam.mx (E. Castillo).



Scheme 1. Previously reported chemical synthesis of (*R,S*)-**1** and (*S,S*)-**1**.¹

racemic epoxide (\pm)-2-((4-(2-methoxyethyl)phenoxy)methyl)oxirane *rac*-**3** and (*S*)-2-amino-1-butanol (**Scheme 1**).

While the preparation of these compounds seems straightforward, it requires the separation of the diastereomeric products (*R,S*)-**1** and (*S,S*)-**1** via a tedious fractional crystallization. Furthermore, the desired diastereomer (*R,S*)-**1** remains in the mother liquors, and is isolated in reduced yields (21% yield from *rac*-**3**).

Over the last few years, enzymes in organic media have become a useful tool in organic synthesis due to their chemo-, regio-, and enantioselective properties. Due to their high stability and catalytic promiscuity, particular attention has been paid to lipases (triacylglycerol hydrolases, EC 3.1.1.3), since they have been shown to be suitable enzymes for the catalysis of a wide variety of chemical reactions.² Furthermore, because of the high enantioselectivity of the enzymatic process, they have been used extensively in the resolution of alcohols, esters, carboxylic acids, amino acids, amines, and amides.^{3,4} One of the most commonly used lipases in organic syntheses is lipase B from *Candida antarctica* (CaLB), which has an operational limit of up to 80 °C in its immobilized form (Novozym[®] 435) and works efficiently in different organic solvents, as it is highly resistant to denaturalization.^{5–7} According to Kazlauskas' rules,⁸ the steric effect of the substrate is a decisive factor in the degree of enantioselectivity in acylation reactions of chiral secondary alcohols; under this consideration, CaLB should have a preference for the (*R*) enantiomer.⁹

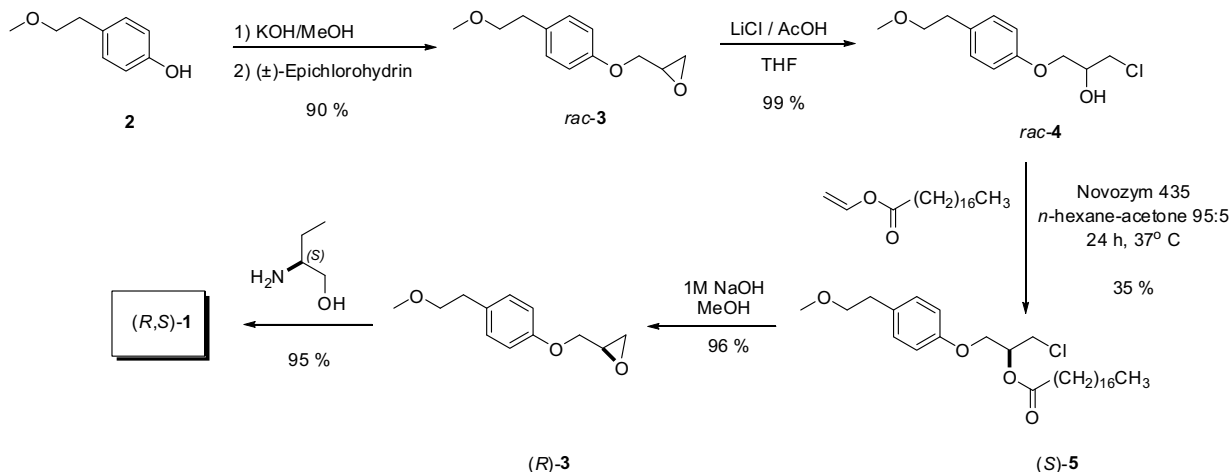
In order to carry out detailed pharmacologic and pharmacokinetic studies of (*R,S*)-**1**, a more efficient gram-scale chemoenzymatic synthesis of this compound was developed. This new strategy is based on elimination of the previously reported frac-

tional crystallization step required for the separation of diastereomers (*R,S*)-**1** and (*S,S*)-**1**. As an alternative, we introduced a chemoenzymatic step that would lead to the preparation of the oxirane enantiomer (*R*)-**3** in good enantiomeric excess. From this enriched precursor, the addition of (*S*)-2-amino-1-butanol directly provides diastereomer (*R,S*)-**1** (**Scheme 2**).

2. Results and discussion

In the first step, the synthesis of 2-[4-(2'-methoxyethyl)-phenoxy]methyl-oxirane *rac*-**3** was carried out by treatment of the potassium salt of 4-(2-methoxyethyl)phenol **2** with an excess of (\pm)-epichlorohydrin (90% yield). The racemic chlorohydrin *rac*-**4** was then obtained by the regioselective ring-opening of *rac*-**3** with lithium chloride and acetic acid, in a nearly quantitative yield (99%).¹⁰

In this step, we introduced the enzymatic resolution of *rac*-**4**, by taking advantage of the reported (*R*)-specificity of lipase Novozym[®] 435 during alcoholysis reactions.⁹ An additional advantage was introduced using a hydrophobic acyl moiety that allows a facilitated separation of the hydrophobic enantiomer (*S*)-**5** from the non-reacted polar (*R*)-**4**. Accordingly, *rac*-**4** was reacted at 37 °C with Novozym[®] 435, and the vinyl esters of acetic, lauric, oleic, and stearic acids were used as acyl donors in 95:5 hexane-acetone as solvent. All reactions were stopped after 28 h, in a compromise between yield and ee, as lower conversions resulted in better ee but modest yields of (*S*)-**5**. After these reaction times, the desired (*S*)-chlorohydrin esters were recovered and separated



Scheme 2. Chemoenzymatic synthesis of (2*R*,2'*S*)- β -hydroxyhomometoprolol, (*R,S*)-**1**.

by column chromatography. It is important to note that in contrast to other acyl residues traditionally tested in this type of resolution,¹¹ the introduction of a stearyl residue was more advantageous. Actually, the hydrophobic stearate (*S*)-**5** was easily separated after column chromatography due to its high solubility in *n*-hexane–acetone (35.4% yield; theoretical maximum yield of 50%). Compound (*S*)-**5** was easily recovered as a white crystalline product, which was efficiently transesterified by treatment with 1 equiv of NaOH in MeOH to provide the desired (*R*)-**3** in 96% yield and 94.7% ee, along with the corresponding methyl stearate. Finally, the nucleophilic opening of this epoxide with (*S*)-2-amino-1-butanol led directly to the desired diastereomeric amino alcohol (*R,S*)-**1** in 95% yield.

3. Conclusion

The global process involving the chemoenzymatic synthesis of target compound (*R,S*)-**1** resulted in a 31% overall yield from the racemic oxirane precursor *rac*-**3**. For the most part, this strategy was successful because of the high enantioselectivity exhibited by Novozym[®] 435 lipase and the facile recovery of (*S*)-**5** which, after transesterification and reaction with (*S*)-2-aminobutanol, provided an easily recrystallized (*R,S*)-**1**, leaving only a small amount of unwanted diastereomer (*S,S*)-**1** in the mother liquors. This chemoenzymatic approach completely avoids the use of the inefficient fractional crystallization for (*R,S*)-**1** involved in the chemical syntheses previously reported.

4. Experimental

4.1. Materials and instruments

Lipase B from *Candida antarctica* was used in its immobilized form Novozym[®] 435. The reagents were purchased from Aldrich Chemical Company. Reactions were monitored by TLC using silica gel as the stationary phase and visualized using UV irradiation 254/366 nm and iodine vapors. In the chromatographic columns, silica gel was used as the stationary phase 70–230 mesh. The enzymatic resolution was conducted in a Shaker bath orbital incubator.

¹H and ¹³C NMR were determined in a JEOL Eclipse instrument at 300 and 400 MHz, using tetramethylsilane as an internal standard and CDCl₃ as a solvent. The infrared spectra were obtained in a Bruker spectrometer model Tensor 27. Optical rotations were determined in a Perkin Elmer polarimeter model 341 using a 1 dm cell length. Measurements were done using the sodium D-line (589 nm) at a sample compartment temperature of 20 °C. The mass spectra were determined in a JEOL instrument model JMS-SX102A. Elemental analyses were obtained with a Exeter Analytical CE-440 apparatus.

4.2. Chiral HPLC analysis

Enantiomers of 2-[[4-(2-methoxyethyl)phenoxy] methyl]oxirane were quantified in a CHIRALCEL OB-H column (4.6 × 250 mm) (Chiral Technologies Inc., West Chester PA, USA), using a Waters 600E system controller and a Waters 996 photodiode array detector at 224 nm (Waters Copr. Milford, MA, SA). The effluent was *n*-hexane–ethanol 90:10 (v/v) at a flow rate of 1 ml min⁻¹. The retention time for the (*R*)-**3** isomer is 16.2 min and 19.5 min for the (*S*)-**3** enantiomer.

4.2.1. (±)-2-[[4-(2-Methoxyethyl)phenoxy]methyl]oxirane *rac*-**3**

In a 2 L three-necked flask, fitted with a mechanical stirrer, a condenser, and a thermometer, a solution of 100 g (657 mmol) of

4-(2-methoxyethyl)phenol **2** in 200 mL MeOH was placed. To this solution, 45 g (683 mmol) of 85% KOH was added, and the mixture was stirred for 1 h at 40–45 °C. Afterwards, 150 mL of MeOH was distilled off at atmospheric pressure, and 1 L epichlorohydrin was added to the semisolid residue. After 24 h of stirring at 40 °C and TLC monitoring (CH₂Cl₂–AcOEt 95:5), the mixture was washed with water (3 × 100 mL, pH 7.5), dried over anhydrous Na₂SO₄, and vacuum distilled in order to recover excess epichlorohydrin (190 mmHg/70 °C). Toluene (120 mL) was added to the residue, and the mixture was distilled again at 75 mmHg/40 °C until constant weight to obtain 147.11 g of a mixture containing *rac*-**3** (90%) and *rac*-**4** (10%).^{1,12}

4.2.2. (±)-1-[4-(2-Methoxyethyl)phenoxy]-3-chloro-2-propanol *rac*-**4**

To a solution of *rac*-**3** (30 g (144.1 mmol)) in 250 mL THF, 19.78 mL (432.46 mmol, 3 equiv mol) acetic acid and 9.78 g (230.4 mmol, 1.6 equiv mol) LiCl were added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 48 h. After TLC verification of the end of the reaction (CH₂Cl₂–AcOEt 95:5), the reaction mixture was concentrated under reduced pressure and partitioned in 300 mL water and 150 mL AcOEt. The organic layer was washed with saturated NaHCO₃ until free from acid, dried with anhydrous Na₂SO₄, and concentrated in a rotary evaporator to yield 34.88 g of pure product as a colorless oil in 99% yield. ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ: 2.82 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.34 (s, 3H), 3.56 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.66 (dd, *J*₁ = 11.4, *J*₂ = 6 Hz, 1H), 3.73 (dd, *J*₁ = 11.4, *J*₂ = 5.1 Hz, 1H), 3.99 (dd, *J*₁ = 6.3, *J*₂ = 1.2 Hz, 1H), 4.05 (dd, *J*₁ = 6, *J*₂ = 1.2 Hz, 1H), 4.17 (quintet, *J* = 10.5 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 7.11 (d, *J* = 9 Hz, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ: 35.1, 45.8, 58.5, 68.5, 69.7, 73.6, 114.4, 129.7, 131.7, 156.6. Lit.^{13,14}

4.2.3. (2*S*)-1-Chloro-3-[4-(2-methoxyethyl)phenoxy]-2-propanol-2-stearate (*S*)-**5**

In a tightly closed vessel, 12 g (49.1 mmol) of *rac*-**4** was dissolved in a mixture of 360 mL hexane and 20 mL acetone. To this solution, 4.5 g of 4 Å molecular sieves and 8 g (25.7 mmol, 0.5 equiv mol) of vinyl stearate were added (a 60 μL aliquot was saved as a reference) together with 3.8 g of the biocatalyst Novozym 435. This mixture was incubated for 28 h at 37 °C with orbital stirring at 200 rpm. Afterwards, the mixture was filtered through Celite and concentrated under reduced pressure to yield 19.5 g of a crude product, which after separation in a chromatographic column in 370 g of silica gel (hex–AcOEt 95:5) rendered 8.85 g (35.4%) of (*S*)-**5** as white crystals with a mp 42–43 °C and [α]_D²⁰ = +13.6 (c 1, CHCl₃).

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ: 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H), 1.25 (s, 14H), 1.63 (quintet, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.30–2.38 (m, 2H), 2.82 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.34 (s, 3H), 3.56 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.73–3.87 (m, 2H), 4.09–4.18 (m, 2H), 5.32 (quintet, *J* = 10.2 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 9 Hz, 2H), 7.12 (d, *J* = 9 Hz, 2H). ¹³C NMR (CDCl₃, 75 MHz) δ: 14.0, 22.6, 24.7, 24.8, 29.0, 29.2, 29.3, 29.4, 29.5, 29.6, 31.8, 31.9, 33.7, 34.2, 35.2, 42.4, 42.5, 58.6, 66.0, 70.8, 73.7, 114.5, 129.8, 131.8, 156.7, 173.0. IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 2928, 2850, 1738, 1702, 1467, 1246, 1168, 944. EM (IE) *m/z* (%): 511 (2.5), 359 (100), 331 (3), 244 (4), 147 (7.5), 107 (7), 71 (7.5), 57 (12), 43 (11). Elemental Anal. Calcd for C₃₀H₅₁ClO₄ (511.18): C, 70.49; H, 10.06. Found: C, 70.50; H, 9.84.

4.2.4. (*R*)-2-[[4-(2-Methoxyethyl)phenoxy]methyl]oxirane (*R*)-**3**

16.2 mL of 1 M NaOH (1 equiv mol) was added to a solution containing 8.3 g (16.26 mmol) of (*S*)-**5** in 400 mL MeOH (ultrasound-assisted solution) and stirred for 24 h at room temperature, while monitoring the reaction progress by TLC (hex–AcOEt 85:15). After completion, the reaction medium was cooled to 0–5 °C for

1 h, and the solids were vacuum filtered and washed with 75 mL of cold MeOH. The filtrate was evaporated under reduced pressure, and the remaining oily liquid (5.5 g) was purified by column chromatography in silica gel (1. hex–AcOEt 95:5, 2. hex–AcOEt 85:15) to yield 3.23 g of (*R*)-**3** in 96% yield and 94.7% ee. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -11.3$ (c 1, MeOH).

4.2.5. (2*R*,2'*S*)- β -Hydroxyhomometoprolol (*R,S*)-**1**

To a solution of (*R*)-**3** (2 g; 9.6 mmol) in 14 mL MeOH, 5.81 g (65.17 mmol, 6.7 M equiv) of (*S*)-2-amino-1-butanol was added. After 24 h of stirring and TLC monitoring (CH₂Cl₂–AcOEt 95:5), the reaction mixture was evaporated under reduced pressure and partitioned in 20 mL CHCl₃ and 20 mL of water. After drying the organic extract and evaporating the solvent, the remaining solid (3.1 g) was recrystallized from toluene to yield 2.66 g (95%) of (*R,S*)-**1**, mp 74–75 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +10.3$ (c 1, MeOH). Lit¹ mp 74–75 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +10.3$ (c 1, MeOH).

Acknowledgments

The authors acknowledge DGAPA-UNAM for Ignacio Regla's sabbatical fellowship at IBT-UNAM. Authors are also grateful to María de los Angeles Peña, Elizabeth Huerta, Erendira García Rios, Javier Pérez-Flores and Rocío Patiño-Maya from Instituto de Química, UNAM for spectroscopic analysis and to Novozymes-México for the generous gift of CaLB.

References

1. Melgar-Fernández, R.; Demare, P.; Hong, E.; Rosas, M. A.; Escalante, J.; Muñoz-Muñiz, O.; Juaristi, E.; Regla, I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 191–194.
2. Hult, K.; Berglund, P. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 231–238.
3. Torres-Gavilán, A.; Escalante, J.; Regla, I.; López-Munguía, A.; Castillo, E. *Tetrahedron: Asymmetry* **2007**, *18*, 2621–2624.
4. (a) Muralidhar, R. V.; Chirumamilla, R. R.; Marchant, R.; Ramachandran, V. N.; Ward, O. P.; Nigam, P. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *18*, 81–97; (b) Bellot, J. C.; Choïnard, L.; Castillo, R. E.; Marty, A. *Enzyme Microb. Technol.* **2001**, *28*, 362–369; (c) Castillo, E.; Pezzotti, F.; Navarro, A.; López-Munguía, A. *J. Biotechnol.* **2003**, *102*, 251–259.
5. Salis, A.; Svensson, I.; Monduzzi, M.; Solinas, V.; Adlercreutz, P. *Biochim. Biophys. Acta: Proteins Proteomics* **2003**, *1646*, 145–151.
6. (a) Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A. *Structure* **1994**, *2*, 293–308; (b) Uppenberg, J.; Patkar, S.; Bergfors, T.; Jones, T. A. *J. Mol. Biol.* **1994**, *235*, 790–792.
7. Orrenius, C.; Haefner, F.; Rotticci, D.; Ohrner, N.; Norin, T.; Hult, K. *Biocatal. Biotransform.* **1998**, *16*, 1–15.
8. Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2656–2665.
9. (a) Orrenius, C.; Norin, T.; Hult, K.; Carrea, G. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 3023–3030; (b) Orrenius, C.; Ohrner, N.; Rotticci, D.; Mattson, A.; Hult, K.; Norin, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **1995**, *6*, 1217–1220; (c) Uppenberg, J.; Ohrner, N.; Norin, M.; Hult, K.; Kleywegt, G. J.; Patkar, S.; Waagen, V.; Anthomen, T.; Alwyn Jones, T. *Biochemistry* **1995**, *34*, 16832–16835.
10. Joginder, S. B.; Anderson, R. C. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3021–3024.
11. McCubbin, J. A.; Maddess, M. L.; Lautens, M. *Synlett* **2008**, 289–293.
12. Sang-Hun, J.; Pham Tuan, L.; Hee-Kyun, L.; Hyun-Ju, K.; Kyeong-Ho, K.; Jong-Xcong, K. *Arch. Pharm. Res.* **2000**, *23*, 226–229.
13. Surendra, K.; Srilakshmi Krishnaveni, N.; Nageswar, Y. V. D.; Rama Rao, K. *Synth. Commun.* **2005**, *35*, 2195–2201.
14. Das, B.; Krishnaiah, M.; Venkateswarlu, K. *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 82–83.