



Universidad de Oviedo

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA E INORGÁNICA
MÁSTER UNIVERSITARIO EN QUÍMICA Y DESARROLLO
SOSTENIBLE

**REACCIONES DE AMINÓLISIS ENZIMÁTICAS
PARA LA SÍNTESIS DE AMIDAS A PARTIR DE
ÉSTERES CINÁMICOS**

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Diego Fernández Alonso

2023

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

2-MeTHF	2-Metil-tetrahidrofurano
AcOEt	Acetato de etilo
Ar	Aromático
Asp	Ácido aspártico
BOP	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio
c	cuatriplete
CAL-B	Lipasa de <i>Candida antarctica</i> tipo B
CDCl₃	Cloroformo deuterado
cm	Centímetros
CPME	Ciclopentilmetil éter
d	Doblete
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
dd	Doble doblete
EC	Comisión Enzimática (<i>Enzyme Commission</i>)
Equiv	Equivalentes
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
ESI⁺	Técnica de ionización por electrospray en modo positivo
EtOH	Etanol
FT	Transformada de Fourier
g	Gramos
HBTU	Tetrafluoroborato de <i>O</i> -benzotriazol-1-il- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronio
h	horas
His	Histidina
Glu	Ácido Glutámico
IR	Espectroscopía de infrarrojo
IT	Intermedio tetraédrico
J	Constante de acoplamiento
m	multiplete
MALDI	Matrix-assisted laser desorption/ionization
MHz	Megahertzios
min	Minutos
mm	Milímetros
mL	Mililitros

mM	Milimolar
mol.	Molecular
MW	Microondas (<i>Microwave</i>)
NEt₃	Trietilamina
p/p	Relación Peso/Peso
PF	Puntos de fusión
PFP	Pentafluorofenol
ppm	Partes por millón
quint	Quintuplete
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete
Ser	Serina
t	Triplete
TBME	<i>tert</i> -Butilmetil éter
TLC	Cromatografía de capa fina (<i>Thin layer chromatography</i>)
TLL	Lipasa de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
δ	Desplazamiento químico
λ_{max}	Longitud máxima
v_{máxima}	Frecuencia Máxima

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La Biocatálisis dentro del concepto de Química Sostenible.....	1
1.2. Tipos de enzimas existentes. Clasificación en función de su reactividad...	3
1.3. Lipasas: función y aplicación en síntesis orgánica.....	5
1.4. La lipasa de <i>Candida antarctica</i> de tipo B	8
1.5. El ácido cinámico y sus derivados: estructura, importancia y aplicaciones	9
1.5.1. <i>El ácido cinámico</i>	9
1.5.2. <i>Los derivados del ácido cinámico</i>	11
2. ANTECEDENTES	15
2.1. Síntesis de amidas derivadas de ácidos cinámicos mediante métodos químicos tradicionales	16
2.2. Reacciones de aminólisis catalizadas por lipasas para la preparación de amidas derivadas de ácidos cinámicos	19
3. OBJETIVOS.....	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. Síntesis del cinamato de etilo y estudio de su reacción de aminólisis con diversas aminas	23
4.2. Extensión de la aminólisis enzimática a derivados del cinamato de etilo.	26
4.3. Síntesis del ferulato de etilo y estudio de su reacción de aminólisis empleando lipasas	27
5. CONCLUSIONES.....	33
6. PARTE EXPERIMENTAL	35
6.1. Disolventes y reactivos generales.....	35
6.2. Técnicas de purificación y análisis.....	35
6.2.1. <i>Cromatografía en gel de sílice</i>	35
6.2.2. <i>Resonancia magnética nuclear</i>	36
6.2.3. <i>Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR)</i>	36

6.2.4.	<i>Espectroscopia de infrarrojo (IR)</i>	36
6.2.5.	<i>Puntos de Fusión (PF)</i>	36
6.3.	Procedimientos experimentales.....	37
6.3.1.	<i>Síntesis de cinamato de etilo (2a)</i>	37
6.3.2.	<i>Síntesis del 3-metoxicinamato de etilo (2b)</i>	37
6.3.3.	<i>Síntesis del 2-metoxicinamato de etilo (2c)</i>	38
6.3.4.	<i>Síntesis del ferulato de etilo (2d)</i>	38
6.3.5.	<i>Síntesis enzimática de las amidas 4aa-ad utilizando hexano como disolvente</i>	39
6.3.6.	<i>Síntesis enzimática de la amida 4aa utilizando CPME como disolvente</i> .	39
6.3.7.	<i>Síntesis enzimática de las amidas 4ba y 4ca</i>	40
6.3.8.	<i>Síntesis enzimática de las amidas 4da y 4dd utilizando hexano como disolvente</i>	40
6.3.9.	<i>Síntesis enzimática de las amidas 4da y 4db utilizando CPME como disolvente</i>	41
6.4.	Caracterización estructural de los compuestos sintetizados	41
7.	ANEXO DE ESPECTROS	53
7.1.	Espectros de RMN.....	53
7.2.	Espectros de masas	78
8.	BIBLIOGRAFÍA	82

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación supone un problema global para la salud de la humanidad y el ecosistema, por lo que numerosos sectores productivos están tomando medidas para su reducción. Entre otras acciones, caben destacarse los esfuerzos para minimizar la generación y el vertido de residuos, utilizar fuentes de energía renovables, o bien reciclar y reutilizar los materiales empleados y los productos de deshecho. Esta problemática no ha pasado desapercibida para la industria química, donde las regulaciones existentes conducen, cada vez más, al diseño de productos y procesos químicos que hagan posible la disminución, o incluso eliminación, del uso y generación de sustancias peligrosas, así como de las condiciones drásticas en dichos procesos. Esta serie de medidas se engloban bajo el término Química Sostenible, o más comúnmente conocida por Química Verde, siendo esta concienciación una de las finalidades del *Máster Universitario en Química y Desarrollo Sostenible* de la Universidad de Oviedo, donde se encaja este trabajo.

1.1. La Biocatálisis dentro del concepto de Química Sostenible

La Química Sostenible ha demostrado que se pueden llegar a diseñar procesos rentables para obtener productos beneficiosos para la salud y para el medio ambiente. En 1998 Anastas y Warner establecieron los 12 principios de la Química Verde necesarios para lograr una mayor sostenibilidad a la hora de producir sustancias químicas.¹ Estos son:

- 1- **Prevención:** Evitar la formación de residuos antes que tratar o limpiar los formados.
- 2- **Economía atómica:** Maximizar la incorporación de todos los reactivos en el producto final.

- 3- **Síntesis químicas menos peligrosas:** Diseñar métodos sintéticos que usen o generen sustancias con poca o nula toxicidad para la salud y el medio ambiente.
- 4- **Preparación de productos químicos más seguros:** Las sustancias químicas objeto de estudio deben ser de reducida toxicidad, pero manteniendo sus propiedades beneficiosas.
- 5- **Disolventes y sustancias auxiliares más sostenibles:** Tratar de emplear disolventes, catalizadores y otro de tipo de sustancias auxiliares inocuas.
- 6- **Maximizar la eficiencia energética:** Minimizar el impacto ambiental y económico.
- 7- **Uso de materias primas renovables:** Aprovechar los recursos no extingüibles como materiales de partida y reactivos.
- 8- **Evitar etapas de derivatización:** Evitar secuencias de protección/desprotección de grupos funcionales, así como procesos de modificación físicos y/o químicos temporales.
- 9- **Uso de (bio)catalizadores:** Emplear sustancias aceleradoras de procesos químicos, siendo estas lo más selectivas posibles.
- 10- **Productos degradables:** Las sustancias finalmente obtenidas deben diseñarse de forma que una vez finalice su función se degraden de manera inocua.
- 11- **Análisis en tiempo real:** Ser capaces de diseñar métodos que permitan un seguimiento y control de los procesos químicos en tiempo real, evitando así la formación de sustancias peligrosas y el despilfarro energético.
- 12- **Química más segura para la prevención de accidentes:** Las sustancias químicas y las condiciones de reacción optimizadas deben ser lo menos nocivas posibles.

Dentro de la Química Sostenible se encuentra la Biocatálisis, que consiste en la aplicación de enzimas y microorganismos como catalizadores en la obtención de productos químicos.²

Actualmente, el uso de enzimas en procesos sintéticos permite, en muchos casos, acortar el número de pasos en las rutas químicas y obtener productos de mayor calidad pudiendo emplear catalizadores naturales y biodegradables en condiciones suaves de reacción, a la par que se minimiza la generación de residuos.³

Una de las ventajas más evidentes del empleo de los biocatalizadores es su excelente quimio-, regio- y estereoselectividad, siendo esta inherente a la estructura de los enzimas. Sin embargo, no todo son ventajas, y es conveniente conocer algunas limitaciones de la Biocatálisis como la elevada especificidad de los enzimas con respecto a los sustratos de partida o al uso de sustancias auxiliares como los cofactores, su incompatibilidad con determinados medios de reacción, o la posibilidad de desnaturalización o inhibición bajo determinadas condiciones de reacción.⁴ Sin duda, recientes avances en distintos campos como la inmovilización de enzimas o el diseño racional de enzimas mediante el empleo de técnicas de biología y modelización molecular pueden permitir una mejora notable de los bioprocesos.⁵

1.2. Tipos de enzimas existentes. Clasificación en función de su reactividad

Los enzimas son proteínas provenientes de los organismos vivos que tienen una influencia clave en los procesos químicos que se producen en la naturaleza, como por ejemplo en los microorganismos, plantas y animales. La Comisión Enzimática de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (*Enzyme Commission*, EC), ha

establecido una jerarquización de estos en siete grupos, seis de los cuales presentan actividad catalítica, y por ello se les puede denominar como biocatalizadores. Esta división viene resumida en 4 dígitos donde a grandes rasgos se detalla el tipo de reacción que catalizan y los sustratos sobre los que actúan, recibiendo cada uno de ellos un código del tipo EC A.B.C.D,⁶ donde se indican:

- A: Tipo de reacción natural catalizada
- B: Tipo de moléculas que transfieren
- C: Naturaleza del cosustrato
- D: Número característico de cada enzima

Según los tipos de reacciones naturales catalizadas, nos encontramos con los siguientes grupos de enzimas:

- **EC.1. Oxidorreductasas:** procesos de oxidación y reducción para la formación de nuevos compuestos (in)saturados.
- **EC.2. Transferasas:** transferencia de un determinado grupo funcional (aldehído, amino, cetona...) de un compuesto generalmente conocido como dador a otro denominado aceptor.
- **EC.3. Hidrolasas:** hidrólisis de diversos grupos funcionales (amidas, epóxidos, ésteres...).
- **EC.4. Liasas:** ruptura de enlaces C-C, C-O o C-N, entre otros, actuando por mecanismos distintos a los de las oxidorreductasas e hidrolasas.
- **EC.5. Isomerasas:** reacciones de isomerización como racemizaciones o epimerizaciones de isómeros ópticos o geométricos.
- **EC.6. Ligasas:** unión de dos moléculas con la consiguiente hidrólisis del enlace difosfato del ATP o de un trifosfato similar.

- **EC.7. Translocasas:** a diferencia de las anteriores, no tienen actividad catalítica, sino que facilitan el movimiento de iones o moléculas, a través de las membranas celulares o su separación dentro de las mismas.

1.3. Lipasas: función y aplicación en síntesis orgánica

Las lipasas (EC.3.1.1.3) pertenecen a la clase de las hidrolasas, y se conocen de manera general como triacilglicerol lipasas puesto que su reacción natural es la hidrólisis de triacilgliceroles.⁷ Se tratan por tanto de enzimas digestivas, puesto que catalizan la hidrólisis de triacilgliceroles en glicerol y ácidos grasos libres, lo que ha hecho que históricamente hayan sido consideradas como el grupo más importante de biocatalizadores con aplicaciones biotecnológicas, teniendo especial relevancia su uso industrial en el sector de la limpieza como detergentes o en la obtención de biodiesel. Además, la posibilidad de catalizar procesos quimio-, regio- y estereoselectivos, inicialmente en medios acuosos, les ha otorgado gran relevancia tanto en la industria de aromas y fragancias,⁸ como en el sector farmacéutico.⁹ Avances en el desarrollo de sus procesos de inmovilización han permitido su aplicación de forma más general en síntesis orgánica, al poder trabajar en medios orgánicos, aumentando sus posibilidades en la preparación de muy diversas familias de compuestos.¹⁰

Se trata de enzimas fáciles de obtener ya que pueden producirse a partir de organismos microbianos, levaduras u hongos, presentando como gran ventaja respecto a las enzimas no hidrolíticas, el hecho de no requerir cofactores, de ahí que sean un grupo de biocatalizadores muy utilizados.¹¹ Además, a diferencia de otros tipos de hidrolasas como las esterases, las lipasas únicamente se activan cuando se adsorben a una interfase agua-aceite.¹² Por tanto, actúan en la interfase hidrofílica-lipofílica, y la cantidad de agua que

haya presente en el medio en el que se encuentren, determinará las reacciones que podrán catalizar. Así, si hay poca cantidad de agua se encontrarán favorecidos los procesos de esterificación, amidación y transesterificación, mientras que cuando haya un exceso de agua catalizarán principalmente reacciones de hidrólisis.

Aunque las lipasas puedan realizar reacciones de hidrólisis en entornos con poca agua, en estos casos son capaces de catalizar la reacción inversa, como por ejemplo la síntesis de ésteres, hecho que se ha visto favorecido como se ha comentado anteriormente por la posibilidad de emplear lipasas inmovilizadas en muy diversos soportes. La hidrólisis y la esterificación se pueden dar en un proceso simultáneo denominado interesterificación (que consiste en el intercambio de posiciones de ácidos grasos entre los triacilglicéridos).

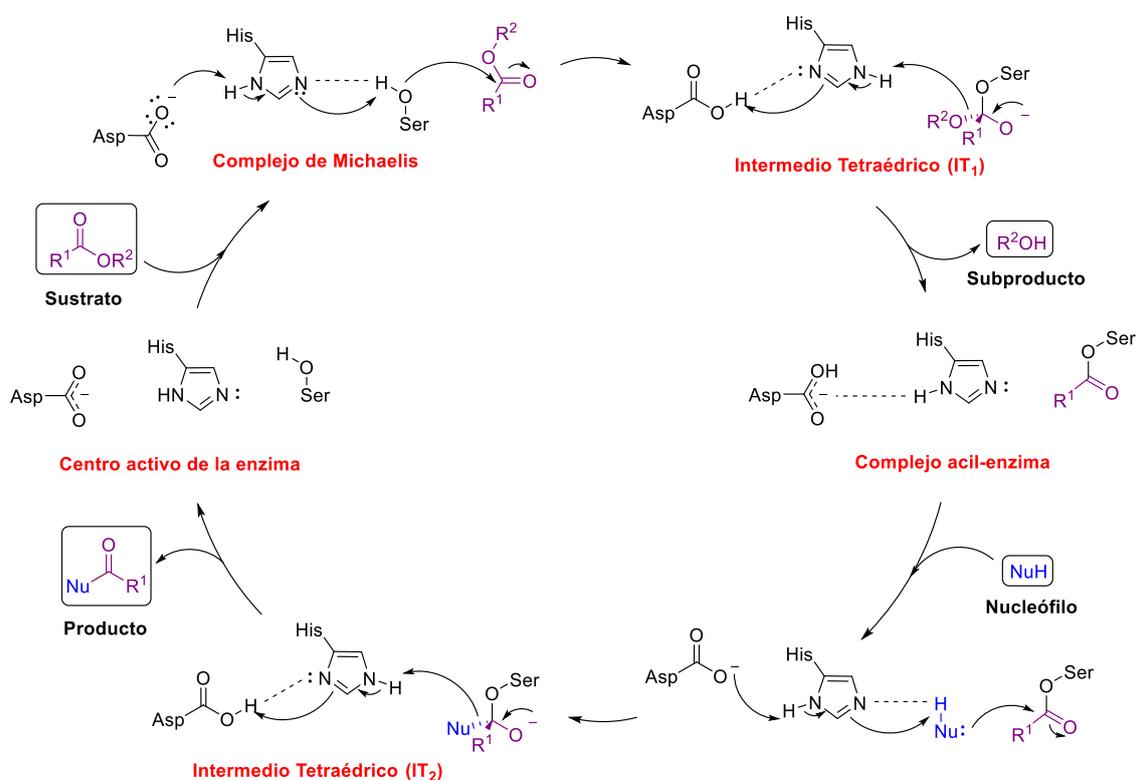
De manera general, y tomando un éster como sustrato de partida, el nucleófilo natural que es el agua puede ser reemplazado por otros, pudiendo catalizar muy diversas reacciones como la aminólisis, amonólisis, hidrazinólisis, perhidrólisis o tiólisis (Tabla 1).

Tabla 1. Reacciones de ésteres (R^1COOR^2) catalizadas por las lipasas empleando diversos nucleófilos.

Nucleófilo	Producto final	Reacción
H_2O	R^1COOH	Hidrólisis
R^3OH	R^1COOR^3	Interesterificación
R^3NH_2	R^1CONHR^3	Aminólisis
NH_3	R^1CONH_2	Amonólisis
R^3NHNH_2	$R^1COONHNHR^3$	Hidrazinólisis
H_2O_2	R^1COOOH	Perhidrólisis
R^3SH	R^1COSR^3	Tiólisis

El mecanismo de acción de las lipasas se representa en el Esquema 1,¹³ y se basa en la actuación de la llamada triada catalítica, la cual se encuentra formada por una serina (Ser), una histidina (His) y un aminoácido de carácter ácido que puede ser un ácido glutámico (Glu) o un ácido aspártico (Asp), que están en el centro activo del enzima. Los pasos fundamentales son la formación de dos intermedios tetraédricos (IT₁ e IT₂). En un primer

lugar, el sustrato se une de manera no covalente en lo que se llama el complejo de Michaelis. A continuación, el grupo alcohol de la serina se desprotona por mediación de la histidina, que a su vez se encuentra activada por el aminoácido de carácter ácido, atacando así al carbono electrofílico del grupo carbonilo formando el IT₁. Posteriormente, una vez eliminado el grupo saliente (en este caso R²OH), se obtiene el intermedio acil-enzima. El nucleófilo entra en el centro activo y de nuevo es desprotonado por la His catalítica, atacando al grupo carbonílico del intermedio acil-enzima dando lugar al IT₂, que evoluciona regenerando la lipasa y formando el producto final. Hay que destacar que la enantioselectividad en estos enzimas se atribuye a que en el centro activo hay dos zonas (bolsillos, del inglés *pockets*), en los que se colocan específicamente el nucleófilo y el grupo acilo, y que dependiendo del enantiómero del sustrato lo podrán hacer de una manera más o menos correcta.



Esquema 1. Mecanismo de acción de las lipasas.

Como se ha comentado anteriormente, los enzimas, y las lipasas en particular, pueden actuar con exquisita selectividad de las siguientes maneras:

- Quimioselectivamente: distinguiendo entre grupos funcionales distintos, pero de similar reactividad, como será el caso de este Trabajo Fin de Máster, donde se abordará la amidación de compuestos α,β -insaturados.
- Regioselectivamente: siendo por ejemplo capaces de acilar en posiciones específicas esteroides y derivados de azúcares, lo cual químicamente resulta una tarea muy dificultosa.
- Estereoselectivamente: al poder distinguir entre dos enantiómeros de una mezcla racémica,¹⁴ lo que las hace ser muy empleadas en química fina.

1.4. La lipasa de *Candida antarctica* de tipo B

En este Trabajo Fin de Máster se ha empleado la lipasa de *Candida antarctica* de tipo B (CAL-B)¹⁵ para catalizar reacciones de aminólisis de diferentes ésteres cinámicos con el fin de obtener las correspondientes amidas a través de reacciones de aminólisis. Por ello, parece adecuado presentar las principales características de esta hidrolasa a continuación.

La levadura basidiomiceto *Candida antarctica* produce lipasas entre las que destacan las que se han denominado de tipo A y B. Este organismo se aisló en la Antártida con el objetivo de encontrar enzimas que pudieran funcionar bajo condiciones extremas. La CAL-B (Figura 1) es un catalizador que en forma inmovilizada (la forma más utilizada es la llamada Novozym 435, que usa una resina de poli metil metacrilato entrecruzado con divinilbenceno,¹⁶ tolera una gran variación en las condiciones experimentales y es una enzima muy eficiente ya que cataliza un gran número de reacciones orgánicas

diferentes. Presenta además unos grados de selectividad muy elevados, siendo capaz de catalizar procesos quimio-, regio- y/o enantioselectivos.¹⁷

Esta enzima se encuentra constituida por 317 aminoácidos, presentando una masa molecular de 33 kDa y un pliegue de tipo α/β hidrolasa. En su centro activo se encuentran los residuos aminoácidos Asp187, His224, y Ser105, que conforman su triada catalítica y da cuenta de la enantiopreferencia mostrada hacia alcoholes secundarios y aminas primarias¹⁸, siguiendo la llamada regla de Kazlauskas.¹⁹ La CAL-B presenta una gran capacidad para realizar reacciones de (trans)esterificación aminólisis y amonólisis entre otras, con unas conversiones altas a concentraciones relativamente elevadas de sustrato (>100 mM), así como una gran estabilidad a temperatura ambiente e incluso a altas temperaturas (hasta 90 °C), aceptando diferentes disolventes orgánicos cuando se encuentra inmovilizada, lo que permita además su reutilización.²⁰

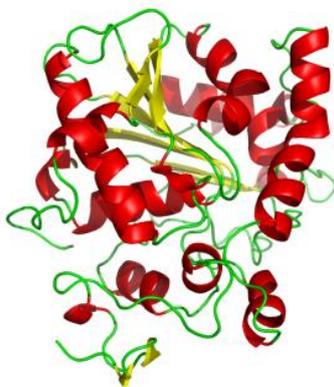


Figura 1. Estructura tridimensional de la CAL-B.

1.5. El ácido cinámico y sus derivados: estructura, importancia y aplicaciones

1.5.1. El ácido cinámico

El ácido cinámico es un ácido carboxílico aromático natural que se encuentra en diversas plantas como *Cinnamomum cassia* (canela china), frutas, verduras y miel, entre otros,

aunque también puede sintetizarse mediante desaminación enzimática de la fenilalanina.²¹

Su estructura química presenta un anillo de benceno unido a un doble enlace que está conjugado al grupo ácido carboxílico (Figura 2). Se trata por tanto de un compuesto α,β -insaturado donde los grupos funcionales prioritarios del doble enlace se colocan en disposición *trans*, pudiendo conocerse con otros nombres como el ácido (2*E*)-3-fenilprop-2-enoico o ácido 3-fenilacrílico. Esta composición orgánica, hace que sea poco soluble en agua, pero muy soluble en diversos disolventes orgánicos como acetato de etilo, etanol o dietil éter.

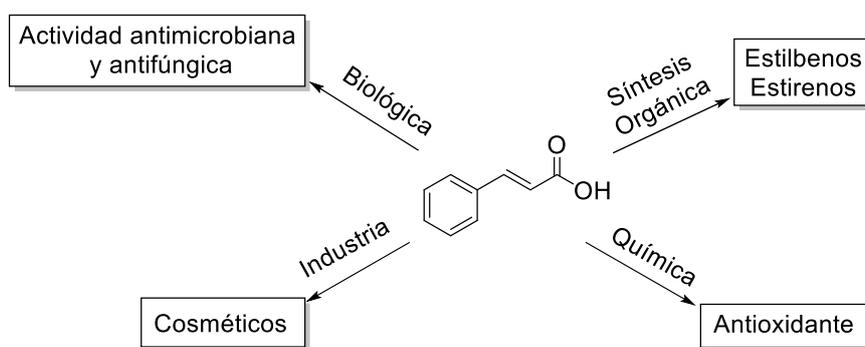


Figura 2. Estructura química del ácido cinámico y resumen de sus aplicaciones actuales.

Entre sus propiedades más destacadas, presenta una gran actividad antimicrobiana frente a organismos patógenos, aunque debido a su baja solubilidad en agua, su uso es limitado; propiedades antivíricas ya que inhibe la replicación del virus del herpes en equinos e inhibe una enzima necesaria para la replicación del VIH; es un potencial antifúngico ya que es utilizado en lociones para tratar las infecciones del cuero cabelludo y para acabar con los hongos que pudren la madera; y posee un gran poder antioxidante ya que es un compuesto reductor.²² Además de las propiedades anteriormente mencionadas, el ácido cinámico se emplea en la producción de otros compuestos de interés biológico como son los estilbenos o estirenos.

En cosmética es ampliamente utilizado ya que, entre otras propiedades, debido a su olor se puede utilizar en perfumes. Puesto que el ácido cinámico es un gran protector contra los rayos UV, se utiliza en cremas de protección solar, aunque en pequeñas cantidades ya que se ha demostrado que utilizado en grandes cantidades puede provocar alergias y dermatitis.²³

1.5.2. Los derivados del ácido cinámico

Los derivados más importantes de este compuesto son los ácidos ferúlico, cafeico, *para*-cumárico, rosmanílico, clorogénico y sinápico, cuyas principales propiedades se detallarán posteriormente. Todos ellos se diferencian del ácido cinámico por la presencia de diversos sustituyentes en el grupo aromático, ya sean grupos hidroxilo y/o metoxi, además de otras funcionalidades según el derivado (Figura 3). Tanto la posición, como la naturaleza de estos patrones de sustitución, hacen que sus actividades biológicas sean muy diferentes.²⁴

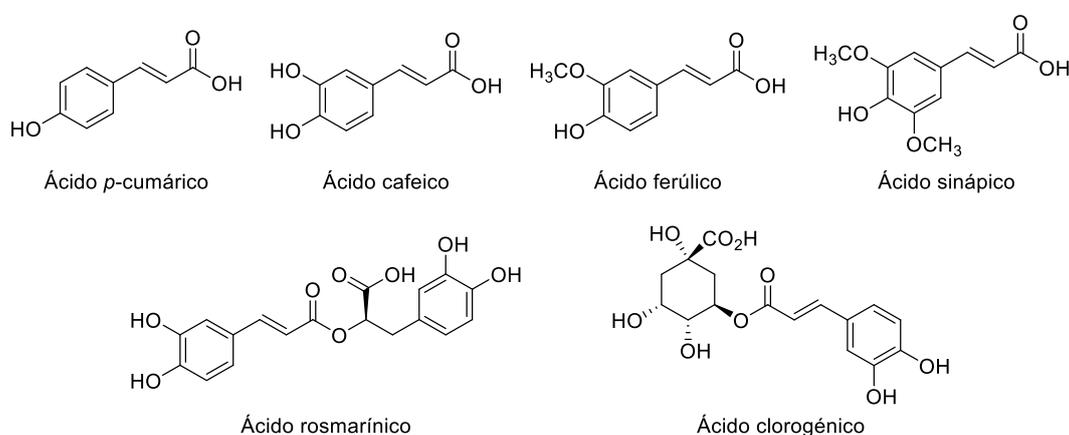


Figura 3. Estructura química de algunos derivados del ácido cinámico.

- **Ácido *p*-cumárico:** se sintetiza a partir de la tirosina y la fenilalanina, tratándose del precursor principal en la síntesis de otros ácidos fenólicos como son el cafeico, ferúlico, rosmarínico y clorogénico. En la naturaleza se puede encontrar en frutas, verduras, cereales y setas. Presenta propiedades antiinflamatorias,

antimicrobianas, antioxidantes y anticolagenasa. Además, por todas las propiedades anteriormente mencionadas y como despigmentante, se utiliza mucho en cosmética. Posee también actividad antitumoral y antiagregante plaquetario.

- **Ácido cafeico:** se biosintetiza por la hidroxilación selectiva del ácido *p*-cumárico. Se trata de uno de los ácidos fenólicos más comúnmente encontrados en frutas, verduras, setas y hierbas. Presenta, al igual que el ácido cinámico, diversas propiedades medicinales como antioxidante, antitumoral, antiinflamatorio, antimicrobiano y antidiabético.
- **Ácido ferúlico:** también conocido como ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico puede obtenerse a partir del ácido cafeico por la acción de la enzima cafeato O-metiltransferasa. Se encuentra en bebidas (como café y cerveza), frutas (como la col, patatas y zanahorias), verduras (como espinacas, tomate y brócoli), cereales (como trigo y maíz), flores y frutos secos. Presenta propiedades antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorias y absorbe los rayos UV, por lo que debido a esta última propiedad se utiliza también en cremas de protección solar.
- **Ácido rosmarínico:** se obtiene por la esterificación del ácido cafeico con el ácido 3,4-dihidroxifeniláctico. Como el resto de derivados del ácido cinámico, posee propiedades antiinflamatorias, antitumorales, antioxidantes y antiinflamatorias. Actualmente, debido a su capacidad para captar radicales, se utiliza mucho en cosmética y en el sector farmacéutico.
- **Ácido sinápico:** se encuentra en la naturaleza en frutas y verduras (particularmente en el brocoli y en los zumos de cítricos). Presenta un gran poder antioxidante y antiinflamatorio. Por la presencia de los grupos metoxilo e hidroxilo en su estructura, presenta una gran capacidad para captar radicales.²⁵

Actualmente, es muy empleado como matriz en la técnica de espectrometría de masas de tipo MALDI.

- **Ácido clorogénico:** se obtiene por esterificación regioselectiva del ácido cafeico con el ácido L-quinico. Se encuentra en el café y las plantas, presentando un gran poder antiinflamatorio, antidiabético y antiviral.

Además, de esta familia de ácidos fenólicos, y también con origen en las plantas, se pueden obtener aldehídos que presentan multitud de usos a nivel industrial de aromas, lo que les hace muy atractivos para los sectores alimentarios y de fragancias, a pesar de que en algún caso se ha descrito una cierta toxicidad.²⁶ Así, aldehídos aromáticos como el benzaldehído, *p*-anisaldehído, la vainillina y el cinamaldehído son responsables de agradables olores a almendra, flor dulce, vainilla y canela, respectivamente.

Otro grupo importante, y que será de especial relevancia en este Trabajo Fin de Máster, es el de las amidas derivadas de los ácidos comentados anteriormente, compuestos que se encuentran en la naturaleza en plantas y tienen numerosas propiedades como antifúngicos, insecticidas, diuréticos, antivíricos, antisépticos, antiinflamatorios, analgésicos, antibacterianos y cicatrizantes. Gracias a estas propiedades, estos compuestos se emplean hoy en día comúnmente en la defensa de frutos, semillas y hojas frente a animales herbívoros.²⁷

2. ANTECEDENTES

Las amidas son derivados que se obtienen al hacer reaccionar un ácido carboxílico con una amina. Se encuentran en la naturaleza y en sustancias tan esenciales como los aminoácidos, las proteínas, las hormonas o las vitaminas. Presentan grandes aplicaciones como fármacos, materiales poliméricos e insecticidas, entre otros, y su síntesis es generalmente sencilla, a partir de los correspondientes ácidos carboxílicos o derivados de ácido mediante reacciones de amidación. Además, su versatilidad en síntesis orgánica es muy interesante ya que pueden ser transformadas en múltiples compuestos orgánicos mediante procesos de hidrólisis, reducción o transposición.

En concreto, las amidas de los derivados de ácido cinámico son relevantes debido a que son componentes esenciales en las plantas. Las amidas hidroxicinámicas presentan un papel importante en la defensa de las plantas, como es el caso de la ferulamida que se incorpora en la estructura de la lignina, la cual provee rigidez a las paredes celulares.²⁸ Además, este tipo de amidas presentan actividad antimicrobiana y contribuyen a la formación de una barrera fenólica que puede lograr que la pared celular resista a la degradación patógena.²⁹

Estas amidas son también uno de los componentes principales del cáliz de las berenjenas, la cual se utiliza en la medicina china tradicional por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticancerígenas.³⁰

A continuación, se resumen los métodos más generales descritos para la síntesis de estas amidas mediante procesos químicos tradicionales y enzimáticos, prestando especial atención a su preparación a partir de ácidos carboxílicos o ésteres.

2.1. Síntesis de amidas derivadas de ácidos cinámicos mediante métodos químicos tradicionales

Históricamente, las amidas se han sintetizado empleando muy diversos catalizadores a partir de los correspondientes ácidos carboxílicos. Entre los métodos más utilizados se encuentran el empleo de derivados de:

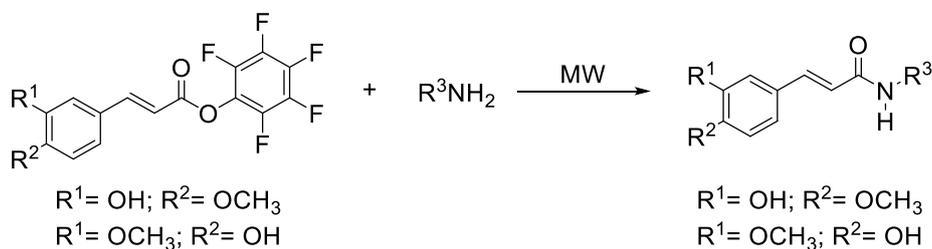
- boro, que han ido evolucionando desde los más simples que necesitaban de altas temperaturas, hasta aquellos que se pueden emplear en condiciones suaves;
- fósforo, que requieren generalmente de altas temperaturas;
- silicio, que se utilizan en cantidades estequiométricas.

Además, es común el uso de catalizadores metálicos, que históricamente no fueron muy utilizados debido a que requerían de altas temperaturas, pero actualmente las sales metálicas del grupo IV, por ejemplo de Ti y Zr, se pueden utilizar en condiciones más suaves.³¹

Debido a la escasa reactividad de los ácidos carboxílicos, es más aconsejable la aminólisis de ésteres u otros derivados de ácido en presencia de una base fuerte. Por ejemplo, uno de los métodos más utilizados consiste en el uso de reactivos de cloro para lograr la activación de los ácidos carboxílicos, formando los correspondientes cloruros de ácido, que por posterior reacción con una amina pueden dar lugar a la amida correspondiente con, normalmente, rendimientos excelentes. e incluso se puede evitar el empleo de un disolvente.

Centrándonos en la síntesis de amidas provenientes de los derivados del ácido cinámico, cabe destacar la contribución de Thiemann y colaboradores, que activaron, entre otros, a los ácidos cafeico y ferúlico empleando el pentafluorofenol (PFP) y la dicitclohexilcarbodiimida (DCC), para obtener los ésteres activados, que posteriormente

se hicieron reaccionar con distintas aminas empleando irradiación de microondas (MW) para acelerar el proceso en ausencia de disolvente, durando solo unos pocos minutos a 130 °C (Esquema 2).³²

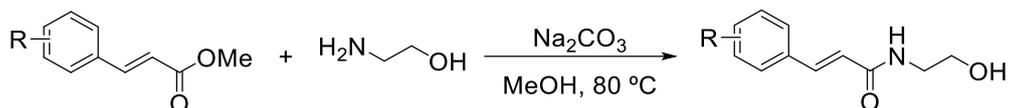


Esquema 2. Síntesis de amidas provenientes del ácido cinámico derivatizados como ésteres de pentafluorofenol usando radiación de microondas.

Por otro lado, se ha estudiado la posibilidad de evitar el uso de metales en este tipo de reacciones de activación de ácidos carboxílicos, no solo del modo descrito anteriormente, sino también empleando sales de fósforo como agentes activantes, caso del BOP [hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio], en presencia de trietilamina con los ácidos *p*-cumárico, cafeico o ferúlico,³³ o sales orgánicas como puede ser el HBTU (tetrafluoroborato de *O*-benzotriazol-1-il-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio) en presencia de *N*-etil-diisopropilamina con el ácido ferúlico.³⁴ Sin embargo, estos métodos no son demasiado sostenibles debido a que estos agentes se usan en cantidades estequiométricas, y hacen uso de disolventes clorados.

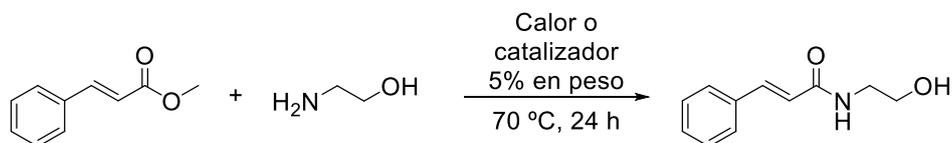
Las reacciones de amidación directas más comunes son aquellas que parten de ésteres, aunque presentan el inconveniente de que necesitan de condiciones de reacción fuertes, el empleo de aminas muy nucleófilas y tiempos largos de reacción. En la bibliografía aparece descrito un método simple para la síntesis de cinamamidas mediante la adición de aminoalcoholes a cinamato de metilo en presencia de una base como el carbonato de sodio (Na_2CO_3) en metanol como disolvente y a 80 °C (Esquema 3). Los rendimientos

son normalmente superiores al 80%, independientemente del carácter de los grupos presentes en el anillo aromático (ya sean dadores o atractores de electrones), aunque se observa la necesidad de tiempos más largos de reacción para aquellos casos en que aumenta el tamaño de la cadena del aminoalcohol.³⁵



Esquema 3. Síntesis de cinamamidas a partir de ésteres de cinamato de metilo y aminoalcoholes usando carbonato de sodio como base.

Recientemente se ha estudiado la síntesis de la idrocilamida empleando diferentes catalizadores (Esquema 4), como el Na_2CO_3 , cloruro de zinc (ZnCl_2), catalizadores soportados derivados del ZnCl_2 , y por último catalizadores provenientes de fuentes naturales (sales metálicas soportadas contenidas en las partes superiores de plantas cultivadas en suelos contaminados, pero con diferentes tratamientos térmicos). Así, se demostró que el catalizador más eficaz fue el ZnCl_2 , conduciendo a la amida con un rendimiento del 75%, mientras que los menos eficaces fueron los dos catalizadores provenientes de plantas dando lugar a rendimientos entorno al 45%.³⁶

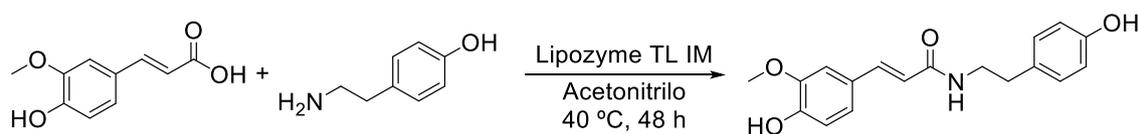


Esquema 4. Síntesis de la idrocilamina empleando diferentes catalizadores metálicos.

2.2. Reacciones de aminólisis catalizadas por lipasas para la preparación de amidas derivadas de ácidos cinámicos

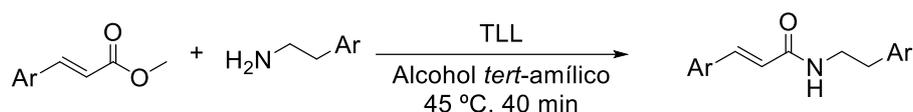
El empleo de enzimas como catalizadores en procesos de aminólisis presenta la ventaja de poder acceder a amidas a partir de derivados de ácido carboxílico, generalmente en condiciones suaves de reacción. A continuación, se recogen, los ejemplos más representativos aparecidos en la bibliografía que describen la síntesis de amidas provenientes del ácido cinámico y sus derivados. Así, Duan y colaboradores han descrito la obtención de amidas a partir de diversos cinamatos de etilo empleando la lipasa Novozym 435 (CAL-B inmovilizada), la correspondiente amina en exceso molar (2 equiv) y un disolvente apolar como es el *tert*-butilmetil éter (TBME), a 50 °C durante 24 h.³⁷ Este método presenta como inconveniente una relación muy elevada enzima/sustrato (20:1 *p/p*) para que la reacción alcance buenas conversiones (>70%).

Dentro de la familia de los ácidos cinámicos, se ha estudiado la obtención de amidas a partir del ácido ferúlico, como es el caso del trabajo descrito por Basri y colaboradores en el que utilizando el clorhidrato de tiramina (6 equiv), acetonitrilo y la lipasa comercial Lipozyme TL IM, se alcanzan conversiones elevadas de la *N*-feruloiltiramina (Esquema 5), compuesto interesante debido a que es un medicamento implicado en el tratamiento de la inhibición de la α -glucosidasa, la cual se encarga de absorber los carbohidratos del organismo, además de presentar propiedades antiinflamatorias.³⁸



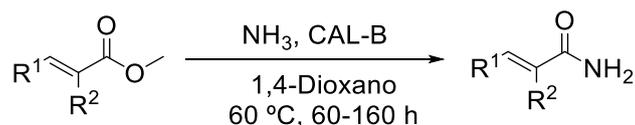
Esquema 5. Síntesis de la *N*-feruloiltiramina empleando la Lipozyme TL IM.

Recientemente, se ha descrito la síntesis en flujo continuo de varias cinamamidas a partir de los correspondientes ésteres de metilo y diversas 2-ariletilaminas (2 equiv), usando la Lipozyme TL IM y un disolvente polar como es el alcohol *tert*-amílico (Esquema 6).³⁹ El problema de este tipo de reacciones es que el rendimiento fue muy variable en función del sustrato considerado, siendo empleados tiempos de residencia cortos (40 min) en el microrreactor, así como una temperatura moderada (45 °C).



Esquema 6. Síntesis en flujo continuo de amidas a partir de ésteres cinámicos empleando la lipasa TLL.

Nuestro grupo de investigación ha estudiado con anterioridad la amonólisis enzimática de ésteres α,β -insaturados empleando amoníaco como nucleófilo, en presencia de la CAL-B inmovilizada (Novozym 435) y 1,4-dioxano como disolvente (Esquema 7). Así, para el caso del cinamato de metilo, tras 160 h de reacción a 60 °C, se obtuvo un rendimiento muy elevado de la amida (96%).⁴⁰

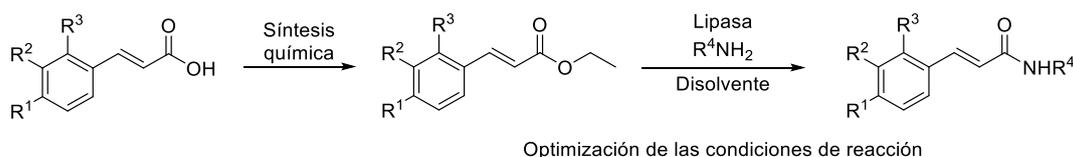


Esquema 7. Reacción de amonólisis de ésteres α,β -insaturados incluyendo el cinamato de metilo utilizando la CAL-B.

3. OBJETIVOS

Los objetivos que presenta este Trabajo de Fin de Máster son los siguientes, y se han representado gráficamente en el Esquema 8:

- Sintetizar el cinamato de etilo ($R^1 = R^2 = R^3 = H$) y explorar su reacción de aminólisis empleando alilamina como nucleófilo y una lipasa como biocatalizador, estudiando la influencia de diferentes parámetros que pueden tener importancia, como el tipo de biocatalizador, temperatura, disolvente, tiempo de reacción...
- Preparar diferentes amidas derivadas del cinamato de etilo usando varias aminas alifáticas como nucleófilos, por ejemplo, butilamina, hexilamina y octilamina.
- Extender esta metodología a la aminólisis de otros ésteres cinámicos, variando las sustituciones en el anillo aromático, y prestando especial atención a la preparación de amidas a partir del ferulato de etilo ($R^1 = OH$, $R^2 = OMe$, $R^3 = H$).
- Optimizar las condiciones de reacción en los casos que sea necesario con el fin de alcanzar las máximas conversiones y rendimientos posibles.



Esquema 8. Síntesis química de ésteres derivados del ácido cinámico y estudio de sus reacciones de aminólisis catalizadas por lipasas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la introducción de esta memoria se ha puesto de manifiesto la importancia que tienen los ácidos cinámicos y sus derivados, entre ellos las amidas, describiendo los métodos tanto químicos como enzimáticos que hay descritos para su síntesis. A continuación, se estudia la posibilidad de llevar a cabo una síntesis general de las mismas empleando biocatalizadores, en concreto lipasas, que son capaces de catalizar reacciones de aminólisis en disolventes orgánicos. Debido a su accesibilidad comercial a bajo precio, se ha elegido el ácido cinámico como sustrato modelo de partida, con el fin de extender a lo largo del trabajo los mejores resultados alcanzados para este compuesto, a la síntesis de muy diversas amidas.

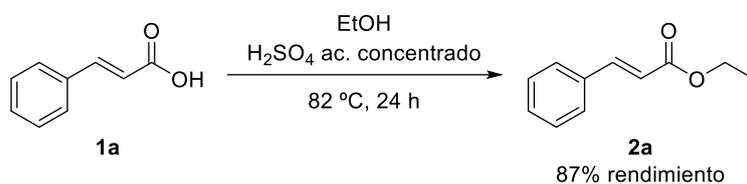
4.1. Síntesis del cinamato de etilo y estudio de su reacción de aminólisis con diversas aminas

Para poder llevar a cabo las reacciones de aminólisis enzimáticas se ha realizado inicialmente la síntesis del cinamato de etilo (**2a**), el cual presenta ventajas con respecto al ácido cinámico (**1a**) por su mayor solubilidad en medios orgánicos y reactividad. Esta reacción puede llevarse a cabo principalmente de dos maneras:⁴¹

- por reacción con etanol (EtOH), que actúa como disolvente y reactivo, en condiciones de reflujo y empleando catálisis ácida (Esquema 9), o
- mediante catálisis enzimática empleando la CAL-B, 3 equivalentes de EtOH como nucleófilo, hexano con disolvente y 45 °C.

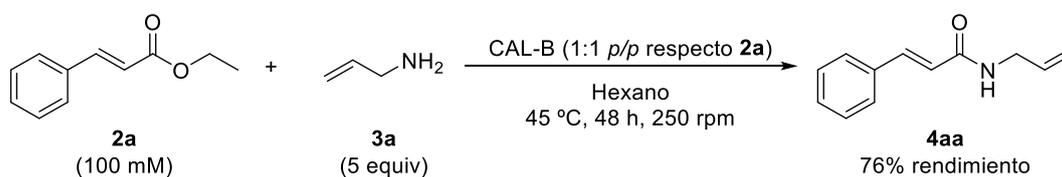
Debido a que los rendimientos son algo superiores en el proceso que emplea ácido sulfúrico concentrado como catalizador, se eligió esta aproximación a una escala de 3 g de **1a**, dejando la reacción agitando durante 24 h a reflujo de EtOH (82 °C). Tras

extracción con acetato de etilo y purificación por columna de cromatografía en gel de sílice, se obtuvo el cinamato de etilo (**2a**) con un 87% de rendimiento (Esquema 9).



Esquema 9. Síntesis del cinamato de etilo por esterificación química del ácido cinámico.

Una vez realizada la síntesis del sustrato de partida, se procedió a estudiar la reacción de aminólisis enzimática (Esquema 8), empleando condiciones similares a las desarrolladas en nuestro grupo de investigación para la esterificación del ácido cinámico,⁴¹ esto es, el cinamato de etilo (**2a**) en concentración 100 mM en hexano, disolvente orgánico apolar y aprótico apto para su uso en reacciones catalizadas por lipasas. En cuanto a la enzima, se eligió la CAL-B en relación 1:1 en peso con respecto a **2a** puesto que resulta ser el enzima más exitoso en la síntesis y resolución de compuestos nitrogenados.^{18,20,42} Como amina se eligió inicialmente la alilamina (**3a**), debido a su bajo punto de ebullición, lo que simplificaría los procesos de asilamiento y purificación de la amina deseada **4aa**. Con este fin se añadió un cierto exceso del nucleófilo (5 equivalentes), haciendo reaccionar la mezcla a 45 °C y 250 rpm en un agitador orbital durante 48 h (Esquema 10).



Esquema 10. Aminólisis del cinamato de etilo empleando CAL-B y alilamina.

Tras el filtrado de la CAL-B, y por análisis de ¹H-RMN (Figura 4), se comprobó la completa desaparición del sustrato de partida, obteniendo por tanto una conversión mayor

del 97%, y un rendimiento aislado del 76% tras purificación por columna de cromatografía de columna.

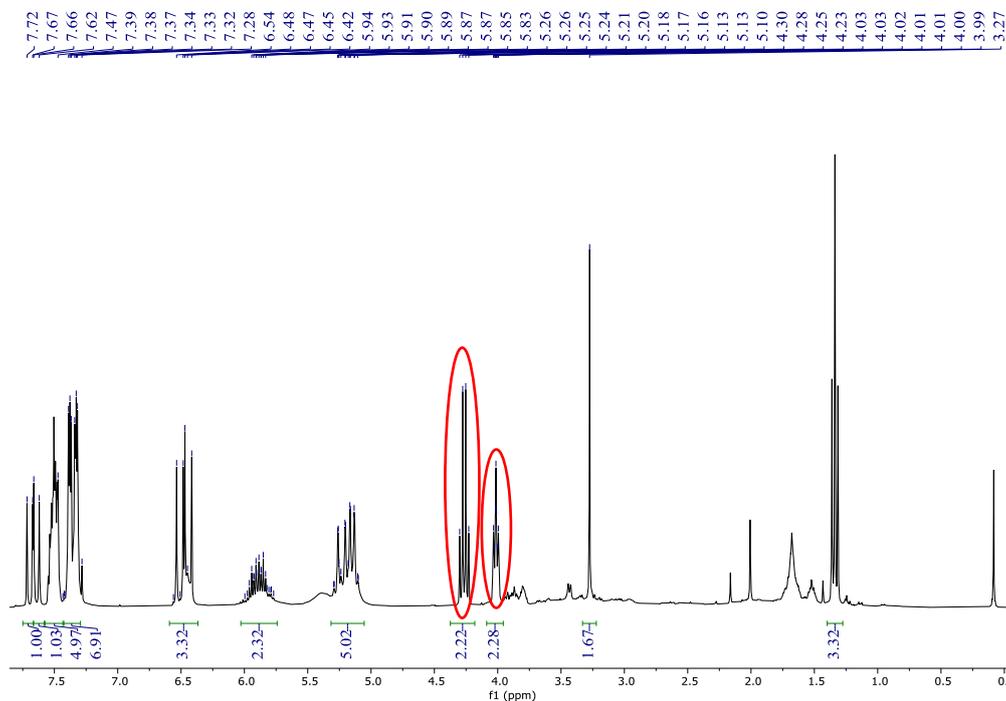
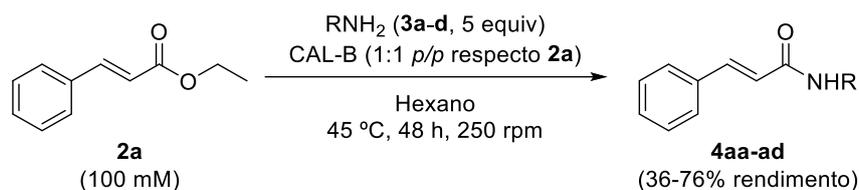


Figura 4. Espectro de ¹H-RMN de una reacción que contiene una mezcla del éster **2a** y la amida **4aa** donde se resaltan las señales correspondientes a los hidrógenos de los grupos metilenos unidos al heteroátomo, y que permiten medir la conversión del proceso enzimático.

Tras el éxito obtenido con la reacción empleando hexano como disolvente, se llevó a cabo la reacción con uno más sostenible como es el ciclopentilmetil éter (CPME),⁴³ sin embargo, se observó un descenso de la conversión (52%).

Finalmente, se estudió el empleo de otras aminas alifáticas con el fin de explorar la generalidad del proceso de aminólisis enzimática (Tabla 2), alcanzando rendimientos inferiores (36-47%, entradas 2-4), tanto con la butilamina (**3b**), la hexilamina (**3c**) y la octilamina (**3d**), en comparación con el rendimiento alcanzado con la alilamina (76%, entrada 1).

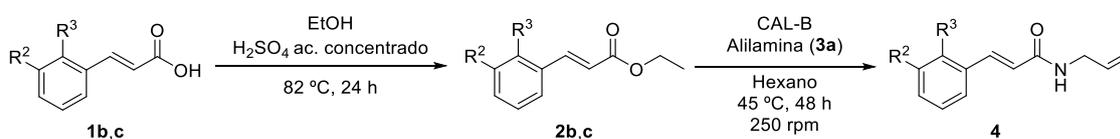
Tabla 2. Aminólisis enzimática de **2a** empleando las aminas **3a-d** como nucleófilos.

Entrada	R (3a-d)	4aa-4ad (%) ^a
1	CH ₂ CHCH ₂ (a)	76
2	ⁿ Bu (b)	36
3	ⁿ Hex (c)	36
4	ⁿ Oct (d)	47

^a Rendimiento aislado tras cromatografía de columna en gel de sílice.

4.2. Extensión de la aminólisis enzimática a derivados del cinamato de etilo

Realizadas las síntesis de las amidas provenientes del cinamato de etilo, se decidió extender esta metodología enzimática empleando como sustratos de partida otros ésteres con distintas sustituciones en el anillo aromático, como el 3-metoxicinamato de etilo (**2b**) y el 2-metoxicinamato de etilo (**2c**). Estos ésteres fueron preparados por esterificación química de los correspondientes ácidos cinámicos, comercialmente accesibles, con buenos rendimientos, 91% y 78%, respectivamente (Tabla 3, entradas 1 y 2).

Tabla 3. Esterificación de los ácidos carboxílicos **1b** y **1c**, y reacción de aminólisis con alilamina y CAL-B en hexano de sus correspondientes ésteres **2b** y **2c**.

Entrada ^a	R ²	R ³	Éster 2b,c (%) ^b	Amida 4 (%) ^b
1	OMe	H	91	5 (4ba)
2	H	OMe	78	30 (4ca)

^a Condiciones de reacción para la reacción enzimática: éster **2** (100 mM), hexano, CAL-B (1:1 *p/p* respecto **2**), alilamina (5 equiv), 45 °C, 48 h y 250 rpm.

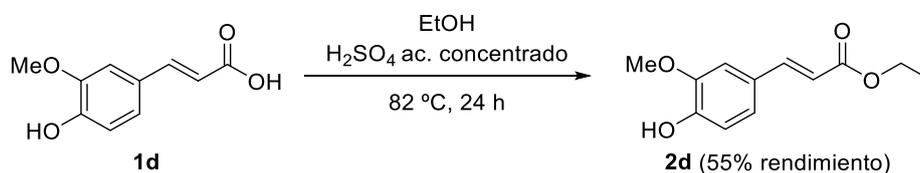
^b Rendimiento aislado tras cromatografía de columna en gel de sílice.

La presencia de un grupo metoxi, tanto en posición *meta* como *orto*, condujo a un descenso considerable del rendimiento en la formación de las correspondientes amidas

cuando se empleó la alilamina como nucleófilo (5 y 30%, respectivamente), elegida debido a su mejor reactividad con respecto a las otras aminas estudiadas.

4.3. Síntesis del ferulato de etilo y estudio de su reacción de aminólisis empleando lipasas

En este punto, y debido a la importancia de las amidas derivadas del ácido ferúlico, se decidió estudiar en detalle la reacción de aminólisis del ferulato de etilo (**2d**), lo que nos daría, además, información adicional sobre la influencia de los sustituyentes presentes en el anillo aromático en cuanto a la reactividad de este tipo de ésteres α,β -insaturados. El éster **2d** se obtuvo por esterificación química convencional del ácido ferúlico con un 55% de rendimiento aislado tras extracción y cromatografía de columna en gel de sílice (Esquema 11). Asimismo, se decidió estudiar la esterificación de **1d** empleando lipasas y el etanol como nucleófilo (5 equivalentes). Desafortunadamente en las condiciones previamente optimizadas para el ácido cinámico (100 mM de sustrato, CAL-B 1:1 *p/p*, 45 °C y 72 h a 250 rpm), no se observó conversión con ninguno de los disolventes probados (cireno, hexano y 2-metiltetrahidrofurano), probablemente debido a la baja solubilidad del sustrato.



Esquema 11. Esterificación química del ácido ferúlico.

En este punto se comenzó el estudio de la reacción de aminólisis del ferulato de etilo (**2d**), partiendo de las condiciones previamente optimizadas con el cinamato de etilo, y

analizando con más detalle las variables que pueden afectar a la catálisis enzimática (Tabla 4). Cabe mencionar en este punto, que uno de los problemas encontrados para el análisis de estas reacciones, es que todas las señales del éster **2d** y de las amidas preparadas (Figura 5) se solapaban en el espectro de ^1H -RMN, por lo que no fue posible determinar con precisión las conversiones de los procesos, y en todos los casos en los que se apreció cierta conversión por análisis de cromatografía de capa fina (60% AcOEt/hexano), se llevaron a cabo las consiguientes purificaciones por columna para cuantificar la formación de las amidas deseadas.

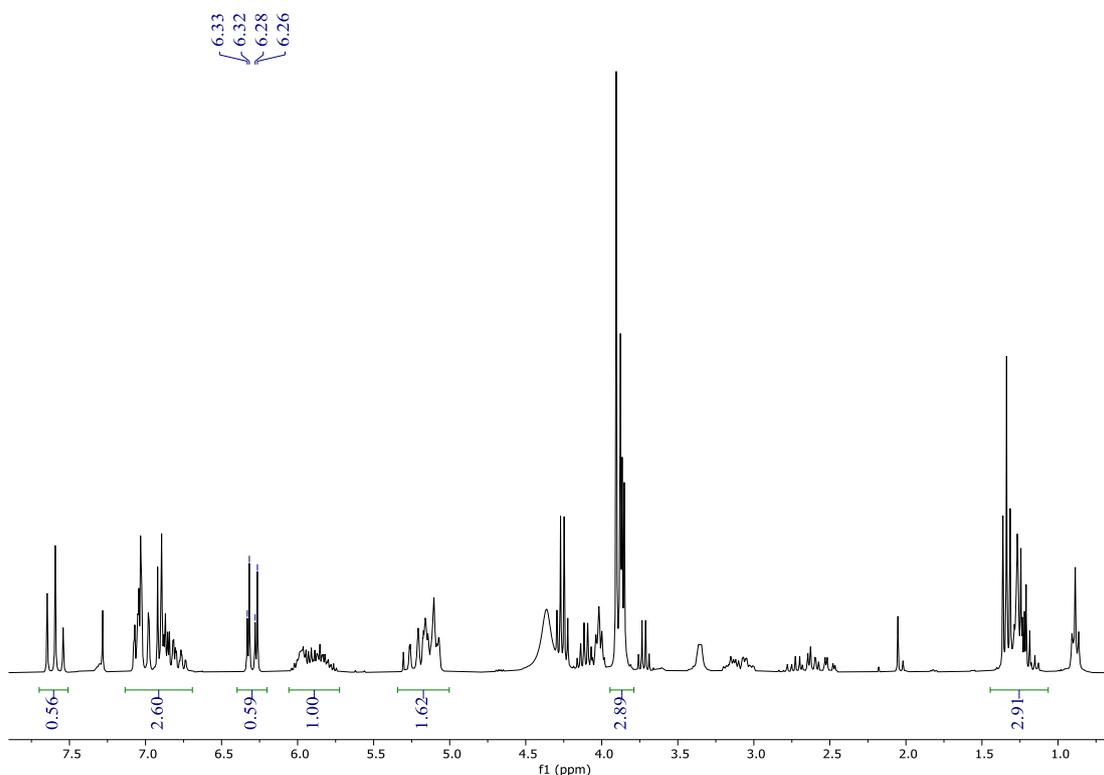


Figura 5. Espectro ^1H -RMN de una reacción que contiene una mezcla del éster **2d** y la amida **4da**, en el que se observa un solapamiento de las señales de los hidrógenos metilénicos unidos al heteroátomo con otras señales.

Tabla 4. Estudio de la reacción de aminólisis de **1d** empleando diferentes condiciones de reacción (amina, lipasa, disolvente, temperatura, tiempo o aditivo).

Entrada	3a-d ^a	Enzima ^b	Disolvente	T (°C)	t (h)	Aditivo	4 (%) ^c
1	a (5)	CAL-B (1:1) ^d	Hexano	45	48	--	43 (4da)
2	a (5)	CAL-B (1:1) ^d	Hexano	30	24	--	n.a. (4da)
3	a (5)	CAL-B (1:1) ^d	2-MeTHF	50	48	--	n.a. (4da)
4	a (5)	CAL-B (1:1) ^d	CPME	50	48	--	28 (4da)
5	a (5)	TLL (1:1)	Hexano	45	48	--	n.a. (4da)
6	a (5)	TLL (1:1)	CPME	45	48	--	n.a. (4da)
7	a (5)	CAL-B (1:1) ^e	CPME	45	48	--	15 (4da)
8	b (5)	CAL-B (1:1) ^d	CPME	45	48	--	13 (4db)
9	b (5)	CAL-B (1:1) ^d	CPME	45	48	Et ₃ N	n.a. (4db)
10	b (5)	CAL-B (1:1) ^d	CPME	45	48	tamiz mol.	n.a. (4db)
11	d (5)	CAL-B (1:1) ^d	Hexano	45	48	--	2 (4dd)
12	d (2.5)	CAL-B (1:1) ^d	Hexano	45	48	--	n.a. (4dd)
13	d (50)	CAL-B (1:1) ^d	Hexano	45	72	--	n.a. (4dd)
14	d (5)	CAL-B (2:1) ^d	CPME	45	48	--	n.a. (4dd)
15	d (50)	CAL-B (3:1) ^d	CPME	45	48	--	n.a. (4dd)

^a Equivalentes entre paréntesis: alilamina (**3a**), *n*-butilamina (**3b**) o *n*-octilamina (**3d**).

^b Relación enzima:**2d** en *p/p*.

^c Rendimiento aislado tras cromatografía de columna en gel de sílice.

^d CAL-B comercializada por la empresa Novozymes con el nombre de Novozym 435.

^e CAL-B comercializada por la empresa EnginZyme como EziG-Amber CAL-B.

n.a. No aplicable. Se trata de reacciones con bajas conversiones que en algunos casos fueron mezcladas para recuperar el producto **4** correspondiente y poder llevar a cabo su caracterización.

En las condiciones estándar, esto es, con 5 equivalentes de alilamina, CAL-B en relación 1:1 en peso con respecto a **2d**, hexano como disolvente, 48 h de reacción, 45 °C y 250 rpm, se obtuvo la amida **4da** con un 43% de rendimiento aislado tras filtración del enzima y cromatografía de columna en gel de sílice (entrada 1), recuperando a su vez el éster de partida con un 47%. Por tanto, la presencia del grupo metoxi en posición *para* y del hidroxilo en *meta*, conduce a un mejor resultado que con los sustratos **2c** y **2d** (5-30%), pero peor con respecto a **2a** (76%). Posteriormente, se realizó una prueba en las mismas condiciones, pero a 30 °C, aunque no se observó conversión alguna (entrada 2).

A continuación, se decidió estudiar la influencia del disolvente empleando para ello dos disolventes considerados sostenibles como son el 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF) y el CPME a 50 °C. Mientras que en el primer caso no se observó la formación de la amida **4da** (entrada 3), en el segundo se obtuvo un rendimiento aislado del 28% (entrada 4).

Puesto que los rendimientos no eran muy elevados, en este punto se decidió estudiar la influencia del biocatalizador, llevando a cabo los procesos con la enzima de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), que había resultado exitosa en la modificación de este tipo de derivados.^{38,39} Sin embargo, no se observó ninguna conversión recuperando el sustrato de partida inalterado cuando la reacción fue realizada tanto en hexano como en CPME a 45 °C (entradas 5 y 6). Una variante de la CAL-B inmovilizada, disponible por una colaboración del grupo con la empresa EnginZyme, donde la enzima se encuentra soportada sobre un material de vidrio recubierto de un polímero hidrofóbico (EziG-Amber), fue empleada en condiciones similares utilizando CPME como disolvente a 45 °C, pero tan solo se obtuvo un 15% de rendimiento aislado de la amida **4da** (entrada 7).

Finalmente, se decidió emplear distintas aminas como nucleófilos con el fin de obtener otras amidas derivadas del ácido ferúlico, al igual que se había realizado con el ácido cinámico. Primeramente, empleando butilamina (5 equiv) y ciclopentilmetil éter se obtuvo un rendimiento del 13% (entrada 8). En este punto, se exploró la posibilidad de añadir aditivos al medio de reacción, que en algunos casos han demostrado ser beneficiosos en procesos de aminólisis catalizados por lipasas,^{44,45} así en presencia de trietilamina (2 equiv, entrada 9) o de tamiz molecular (1:1 en peso con respecto al enzima, entrada 10) no se alcanzó ninguna mejora, ya que en ¹H RMN las señales de la amida fueron apenas detectables.

Se realizaron por último diferentes reacciones con octilamina (**3d**). Así, en presencia de , 5 equiv de la amina, CAL-B, CPME y a 45 °C, se obtuvo únicamente un 2% de

rendimiento de la amida **4dd** (entrada 11). Por ello, a este punto se decidió variar la cantidad de amina **3d** probando con un menor exceso (2.5 equiv, entrada 12) o con un gran exceso molar (50 equiv, entrada 13), sin embargo, en ninguno de los dos casos se observaron conversiones apreciables. Como último intento, se estudió la influencia de la cantidad de enzima frente al éster **2d**, aumentando la proporción de la CAL-B en relaciones 2:1 y 3:1 en peso frente al sustrato (entradas 14 y 15), pero nuevamente no se observó mejora alguna.

Con estos resultados, parece evidente que el ferulato de etilo no ha mostrado ser un sustrato adecuado para llevar a cabo la formación de las correspondientes amidas a través de procesos catalizados por lipasas

5. CONCLUSIONES

Como conclusiones de este trabajo se puede decir que:

- Se ha llevado a cabo la síntesis química del cinamato de etilo con un 76% de rendimiento, para estudiar posteriormente en detalle su reacción de aminólisis catalizada por la CAL-B inmovilizada (Novozym 435) y empleando una serie de aminas alifáticas como la alilamina, butilamina, hexilamina y octilamina.
- Seleccionando como mejores condiciones el empleo de hexano como disolvente, una concentración de sustrato 100 mM, una relación enzima:sustrato 1:1 en peso, 40 °C, 48 h y 250 rpm de agitación orbital, se han obtenido 4 amidas derivadas del ácido cinámico con rendimientos variables entre el 36 y el 76%.
- Se ha extendido esta metodología a otra serie de sustratos variando las sustituciones en el anillo aromático, para lo que fue necesario llevar a cabo inicialmente las correspondientes reacciones de esterificación química que transcurrieron con rendimientos entre el 55 y el 91%.
- Finalmente, se ha estudiado la reacción de aminólisis del 3-metoxicinamato de etilo, el 2-metoxicinamato de etilo y el ferulato de etilo, prestando especial atención a la de este último derivado, habiendo sintetizado otras 5 amidas con rendimientos entre bajos y moderados (2-43%).

Con todo ello, se ha querido poner de manifiesto que la biocatálisis es capaz de facilitar la síntesis de amidas a partir de ésteres, habiendo hecho esfuerzos en intentar desarrollar un método sostenible considerando, además de la catálisis enzimática, el uso de disolventes benignos como posibles medios de reacción. Aun así, es cierto que estas transformaciones aún requerirían estudiarse con una mayor profundidad para obtener mejores resultados en términos de conversión.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. Disolventes y reactivos generales

Los reactivos químicos utilizados fueron comprados a la empresa Sigma-Aldrich y se emplearon sin realizar purificación.

Las enzimas CAL-B de tipo Novozym 435 y la TLL se han adquirido de la empresa Novozymes. La otra variante de la CAL-B proviene de la empresa EnginZyme.

Los disolventes utilizados para realizar las síntesis químicas y enzimáticas fueron: 2-metiltetrahidrofurano (2-MeTHF), acetato de etilo (AcOEt), hexano, diclorometano, EtOH y ciclopentilmétil éter (CPME). Todos estos fueron empleados sin realizar ningún tipo de tratamiento o secado previo.

6.2. Técnicas de purificación y análisis

6.2.1. Cromatografía en gel de sílice

Para realizar el análisis de cromatografía en capa fina TLC, se han utilizado cromatofolios de gel de sílice 60 de 0.25 mm de espesor y con un indicador ultravioleta incorporado, comercializados por Merck.

Como revelador se utilizó una lámpara de ultravioleta ($\lambda_{\max} = 254 \text{ nm}$) y, posteriormente, una disolución acuosa al 1% de KMnO_4 (2 g), 5% de K_2CO_3 (10 g) y 5% de NaOH (10 g) en 200 mL de H_2O , siendo todas las proporciones mencionadas en peso:volumen.

La cromatografía de columna se realizó sobre gel de sílice 60 (230-400 mesh) que fue comprada a la empresa Merck.

6.2.2. Resonancia magnética nuclear

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de ^1H -RMN y ^{13}C -RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker AV-300 (300.13 MHz para ^1H y 75.5 MHz para ^{13}C), empleando en todos los casos CDCl_3 como disolvente.

Los valores de desplazamiento químico (δ) están referidos en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se dan en hertzios (Hz). Para indicar la multiplicidad de las señales en los espectros de ^1H -RMN se emplearán las siguientes abreviaturas: s (singulete), d (doblete), dd (doble doblete), t (triplete), c (cuatriplete), quint (quintuplete) y m (multiplete).

6.2.3. Espectrometría de masas de alta resolución (EMAR)

Los experimentos de espectrometría de masas fueron realizados en un espectrómetro Bruker con un equipo Hewlett-Packard 5973, empleando la técnica de ionización por electrospray en modo positivo (ESI^+). Mediante este método se pudo confirmar la estructura de los productos finales de todas las reacciones de aminólisis anteriormente mencionadas en el apartado de resultados y discusión.

6.2.4. Espectroscopia de infrarrojo (IR)

Los espectros se registraron en un espectrómetro Jasco FT/IR-4700. Las bandas de tensión se indican en valores de $\nu_{\text{máxima}}$ y se expresan en cm^{-1} . En todos los casos, se destacan únicamente las señales más significativas como son las bandas de dobles enlaces, grupos carbonilo y amidas.

6.2.5. Puntos de Fusión (PF)

Los puntos de fusión fueron realizados en un aparato Gallenkamp, empleando capilares abiertos y por tanto sus valores no están corregidos.

6.3. Procedimientos experimentales

Seguidamente se detallan los protocolos que seguidos para obtener los ésteres y amidas estudiados en este trabajo.

6.3.1. Síntesis de cinamato de etilo (2a)

Se añade en un matraz de fondo redondo el compuesto **1a** (2.29 g), etanol (EtOH, 22.9 mL) y ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄, 2.97 mL), por este orden. La disolución se deja agitando un día a reflujo a 82 °C, y pasado ese tiempo, se para la reacción con H₂O (60 mL) y se extrae con AcOEt (3 x 60 mL). Se combinan todas las fases orgánicas obtenidas, se secan con Na₂SO₄ anhidro, se filtran y se evapora el disolvente a presión reducida mediante el empleo de un rotavapor. Posteriormente, se procede a purificar el compuesto por columna de cromatografía con una mezcla de eluyentes 5-10% AcOEt/hexano. La fase móvil empleada en el revelado mediante TLC consiste en un 5% AcOEt/hexano. El producto **2a** obtenido se aísla con un rendimiento del 87% (2.37 g).

6.3.2. Síntesis del 3-metoxicinamato de etilo (2b)

Se añade en un matraz de fondo redondo el compuesto **1b** (917.6 mg), etanol (EtOH, 7.63 mL) y ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄, 1 mL), por este orden. La disolución se deja agitando un día a reflujo a 82 °C, y pasado ese tiempo, se para la reacción con H₂O (20 mL) y se extrae con AcOEt (3 x 20 mL). Se combinan todas las fases orgánicas obtenidas, se secan con Na₂SO₄ anhidro, se filtran y se evapora el disolvente a presión reducida. A continuación, se procede a purificar el compuesto por columna de cromatografía con una mezcla de eluyentes 10% AcOEt/hexano. La fase móvil empleada en el revelado mediante TLC consiste en un 10% AcOEt/hexano. El producto **2b** obtenido se aisló con un rendimiento del 91% (965.2 mg).

6.3.3. Síntesis del 2-metoxicinamato de etilo (2c)

Se añade en un matraz de fondo redondo el compuesto **1c** (917.6 mg), etanol (EtOH, 7.63 mL) y ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄, 0.99 mL), por este orden. La disolución se deja agitando un día a reflujo a 82 °C, y pasado ese tiempo, se para la reacción con H₂O (20 mL) y se extrae con AcOEt (3 x 20 mL). Se combinan todas las fases orgánicas obtenidas, se secan con Na₂SO₄ anhidro, se filtran y se evapora el disolvente a presión reducida. Posteriormente se procede a purificar el compuesto por columna de cromatografía con una mezcla de eluyentes 10% AcOEt/hexano. La fase móvil empleada en el revelado mediante TLC consiste en un 10% AcOEt/hexano. El producto **2c** obtenido se aisló con un rendimiento del 78% (866.6 mg).

6.3.4. Síntesis del ferulato de etilo (2d)

En un matraz de fondo redondo, se añade el compuesto **1d** (1.00 g), etanol (EtOH, 7.6 mL) y ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄, 1 mL), por este orden. La disolución se deja agitando un día a reflujo a 82 °C, y pasado ese tiempo, se para la reacción con H₂O (20 mL) y se extrae con AcOEt (3 x 20 mL). Adicionalmente se lava con una disolución de Brine y otra disolución saturada acuosa de NaHCO₃ (se añaden 20 mL de cada una). Se combinan todas las fases orgánicas obtenidas, se secan con Na₂SO₄ anhidro, se filtran y se evapora el disolvente a presión reducida. A continuación, se procede a purificar el compuesto por columna de cromatografía con una mezcla de eluyentes 40% AcOEt/hexano. La fase móvil empleada en el revelado mediante TLC consiste en un 60% AcOEt/hexano. El producto **2d** obtenido se aisló con un rendimiento del 54.6% (630.0 mg).

6.3.5. Síntesis enzimática de las amidas 4aa-ad utilizando hexano como disolvente

En un Erlenmeyer de 25 mL, se introducen el éster **2a** (100 mM), la CAL-B (1:1 en peso), hexano (2.8 mL), y la correspondiente amina (**3a-d**, 5 equiv), por este orden. La disolución se deja agitando 48 h en un agitador orbital a 45 °C y 250 rpm. Una vez pasado ese tiempo, se observa si la reacción ha tenido lugar mediante análisis por TLC (60% AcOEt/hexano), y una vez comprobado, la disolución es filtrada, lavada con AcOEt (3 x 2 mL) y evaporada en el rotavapor para eliminar los disolventes. Se realiza un análisis por ¹H-RMN del crudo de la reacción para determinar la conversión. Seguidamente, en caso positivo, se realiza una columna (30% AcOEt/hexano para **4aa** y 5% AcOEt/hexano seguido de un aumento a 30% AcOEt/hexano para **4ab**, **4ac** y **4ad**). Finalmente se obtienen los compuestos aislados con un rendimiento del 76% (**4aa**), 36% (**4ab** y **4ac**) y 47% (**4ad**).

6.3.6. Síntesis enzimática de la amida 4aa utilizando CPME como disolvente

En un Erlenmeyer de 25 mL, se introducen el éster **2a** (100 mM), la CAL-B (1:1 en peso), ciclopentilmetil éter (2.95 mL) y alilamina (**3a**, 5 equivalentes), por este orden. La disolución se deja agitando 48 h en un agitador orbital a 45 °C y 250 rpm. Una vez pasado ese tiempo, se observa si la reacción ha tenido lugar mediante análisis por TLC (60% AcOEt/hexano) y una vez comprobado, la disolución es filtrada, lavada con AcOEt (3 x 2 mL) y evaporada en el rotavapor para eliminar el disolvente. Se realiza un análisis por ¹H-RMN del crudo de la reacción para determinar la conversión, observándose una conversión del 52%

6.3.7. Síntesis enzimática de las amidas **4ba** y **4ca**

En un Erlenmeyer de 25 mL, se introducen los ésteres **2b-c** (100 mM), la CAL-B (1:1 en peso), hexano (2.47 mL) y alilamina (**3a**, 5 equivalentes), por este orden. La disolución se deja agitando 48 h en un agitador orbital a 45 °C y 250 rpm. Una vez pasado ese tiempo, se observa si la reacción ha tenido lugar mediante análisis por TLC (60% AcOEt/hexano) y una vez comprobado, la disolución es filtrada, lavada con AcOEt (3 x 2 mL) y evaporada en el rotavapor para eliminar el disolvente. Se realiza un análisis por ¹H-RMN del crudo de la reacción para determinar la conversión. Seguidamente, en caso positivo, se realiza una columna (10-30% AcOEt/hexano). Finalmente se obtienen los compuestos aislados con un rendimiento del 5% (**4ba**), 30% (**4ca**).

6.3.8. Síntesis enzimática de las amidas **4da** y **4dd** utilizando hexano como disolvente

En un Erlenmeyer de 25 mL, se introduce **2d** (100 mM), la CAL-B (1:1 en peso), hexano (2.6 mL) y la correspondiente amina (**3a** y **3d**, 5 equivalentes), por este orden. La disolución se deja agitando 48 h en un agitador orbital a 45 °C y 250 rpm. Una vez pasado ese tiempo, se observa si la reacción ha tenido lugar mediante análisis por TLC (60% AcOEt/hexano) y una vez comprobado, la disolución es filtrada, lavada con AcOEt (3 x 2 mL) y evaporada en el rotavapor para eliminar el disolvente. Se realiza un análisis por ¹H-RMN del crudo de la reacción para determinar la conversión. Seguidamente, en caso positivo, se realiza una columna (30% AcOEt/hexano seguido de un aumento a 80% AcOEt/hexano para **4da** y 30% AcOEt/hexano seguido de un aumento a 50% AcOEt/hexano y posteriormente al 60% AcOEt/hexano para **4dd**). Finalmente se obtienen los compuestos aislados con un rendimiento del 43% (**4da**) y 2% (**4dd**).

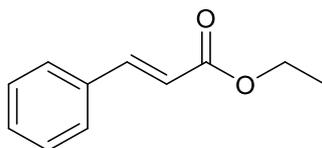
6.3.9. Síntesis enzimática de las amidas **4da** y **4db** utilizando CPME como disolvente

En un Erlenmeyer de 25 mL, se introduce **2d** (100 mM), la CAL-B (1:1 en peso), ciclopentilmetil éter (2.4 mL) y la correspondiente amina (**3a** o **3b**, 5 equivalentes), por este orden. La disolución se deja agitando 48 h en un agitador orbital a 45 °C y 250 rpm. Una vez pasado ese tiempo, se observa si la reacción ha tenido lugar mediante análisis por TLC (60% AcOEt/hexano) y una vez comprobado, la disolución es filtrada, lavada con AcOEt (3 x 2 mL) y evaporada en el rotavapor para eliminar el disolvente. Se realiza un análisis por ¹H-RMN del crudo de la reacción para determinar la conversión. Seguidamente, en caso positivo, se realiza una columna (30% AcOEt/hexano seguido de un aumento a 60% AcOEt/hexano para **4da** y 30% AcOEt/hexano seguido de un aumento a 50% AcOEt/hexano para **4db**). Finalmente se obtienen los compuestos aislados con un rendimiento del 28% (**4da**) y 13% (**4dd**).

6.4. Caracterización estructural de los compuestos sintetizados

Únicamente se mostrará la caracterización estructural de las amidas, ya que los ésteres se han caracterizado ya previamente en la bibliografía, y sus señales coinciden con las ya descritas.⁴¹

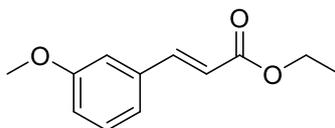
Cinamato de Etilo (2a)



¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.71 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.55 (m, 2H), 7.48–7.35 (m, 3H), 6.46 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 4.29 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

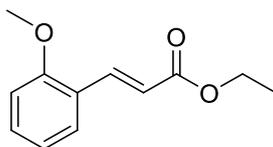
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 167.0 (C), 144.6 (CH), 134.4 (C), 130.2 (CH), 128.9 (2CH), 128.0 (2CH), 118.2 (CH), 60.5 (CH₂), 14.3 (CH₃).

3-Metoxicinamato de etilo (2b)



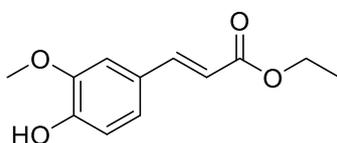
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.67 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.33 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.14 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.95 (dd, *J* = 8.2, 2.4 Hz, 1H), 6.44 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 4.28 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 167.0 (C), 159.9 (C), 144.5 (CH), 135.8 (C), 129.9 (CH), 120.8 (CH), 118.5 (CH), 116.1 (CH), 112.9 (CH), 60.5 (CH₂), 55.3 (CH₃), 14.3 (CH₃).

2-Metoxicinamato de etilo (2c)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 8.01 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 7.7, 1.5 Hz, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.03–6.89 (m, 2H), 6.55 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 4.28 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 1.36 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

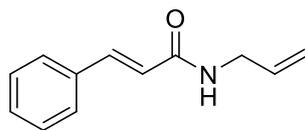
¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 167.5 (C), 158.3 (C), 140.0 (CH), 131.4 (CH), 128.9 (CH), 123.4 (C), 120.7 (CH), 118.8 (CH), 111.1 (CH), 60.4 (CH₂), 55.5 (CH₃), 14.4 (CH₃).

Ferulato de etilo (2d)

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.63 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.13–7.01 (m, 2H), 6.93 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.31 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.27 (c, *J* = 7.1 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 1.35 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 167.4 (C), 147.9 (C), 146.8 (C), 144.7 (CH), 127.0 (C), 123.0 (CH), 115.6 (CH), 114.7 (CH), 109.3 (CH), 60.4 (CH₂), 55.9 (CH₃), 14.4 (CH₃).

***N*-Alilcinamamida (4aa)**



Sólido blanco

P.F: 90-91.5 °C

Fórmula empírica: C₁₂H₁₃NO

Peso Molecular: 187.24 g/mol

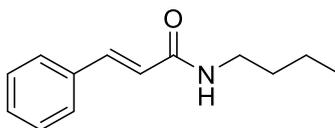
R_f (60% AcOEt/Hex): 0.51

IR: ν 3276, 3061, 2913, 2857, 1653, 1617 cm⁻¹

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.66 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.49 (m, 2H), 7.43–7.33 (m, 3H), 6.52 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 5.97–5.85 (m, 1H), 5.20 (dd, *J* = 17.1, 1.4 Hz, 1H), 5.15 (dd, *J* = 10.2, 1.3 Hz, 2H), 4.09 – 3.98 (m, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 166.0 (C), 141.1 (CH), 134.8 (C), 134.1 (CH), 129.7 (CH), 128.8 (2CH), 127.8 (2CH), 120.6 (CH), 116.5 (CH₂), 42.2 (CH₂).

Masa exacta (ESI-TOF): [M+H]⁺ calculada para C₁₂H₁₄NO: 188.1070; encontrada 188.1070.

***N*-Butilcinamamida (4ab)**

Líquido viscoso anaranjado

Fórmula empírica: C₁₃H₁₇NO

Peso Molecular: 203.13 g/mol

R_f (60% AcOEt/Hex): 0.61

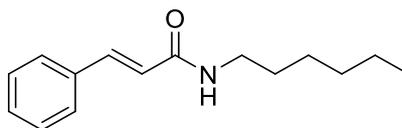
IR: ν 3272, 3060, 2956, 2929, 2868, 1659, 1616 cm⁻¹

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.64 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 6.5, 2.8 Hz, 2H), 7.33 (m, 3H), 6.44 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 5.94 (s ancho, 1H), 3.41 (quint, J = 6.9 Hz, 2H), 1.57 (m, 2H), 1.39 (m, 2H), 1.01–0.81 (m, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃) δ 166.0 (C), 140.8 (CH), 134.9 (C), 129.6 (CH), 128.8 (2CH), 127.7 (2CH), 120.9 (CH), 39.5 (CH₂), 31.8 (CH₂), 20.1 (CH₂), 13.8 (CH₃).

Masa exacta (ESI-TOF): [M+H]⁺ calculada para C₁₃H₁₈NO: 204.1383; encontrada 204.1369.

***N*-Hexilcinamamida (4ac)**



Sólido blanco

P.F: 55.6-56.4 °C

Fórmula empírica: C₁₅H₂₁NO

Peso Molecular: 231.16 g/mol

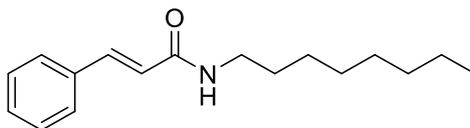
R_f (60% AcOEt/Hex): 0.73

IR: ν 3307, 3245, 3061, 2957, 2925, 2854, 1653, 1614, 1540 cm⁻¹

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.64 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.50 (dd, *J* = 6.6, 2.8 Hz, 2H), 7.42–7.29 (m, 3H), 6.46 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.03 (s ancho, 1H), 3.39 (c, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.58 (quint, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.45–1.20 (m, 6H), 0.89 (t, *J* = 6.5 Hz, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 166.0 (C), 140.7 (CH), 134.9 (C), 129.6 (CH), 128.8 (2CH), 127.7 (2CH), 120.9 (CH), 39.9 (CH₂), 31.5 (CH₂), 29.7 (CH₂), 26.7 (CH₂), 22.6 (CH₂), 14.1 (CH₃).

Masa exacta (ESI-TOF): [M+H]⁺ calculada para C₁₅H₂₂NO: 232.1691; encontrada 232.1691.

N-Octilcinamamida (4ad)

Sólido blanco

P.F: 67-68.2 °C

Fórmula empírica: C₁₇H₂₅NO

Peso Molecular: 259.19 g/mol

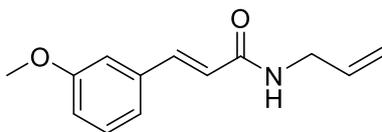
R_f (60% AcOEt/Hex): 0.58

IR: ν 3283, 3061, 2953, 2921, 2852, 1734, 1667, 1653, 1610, 1544 cm⁻¹

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.64 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 6.7, 2.9 Hz, 2H), 7.43–7.28 (m, 3H), 6.45 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 5.96 (s ancho, 1H), 3.39 (c, J = 7.0 Hz, 2H), 1.65–1.50 (m, 2H), 1.30–1.18 (m, 12H), 0.88 (t, J = 9.4 Hz, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 165.9 (C), 140.7 (CH), 134.9 (C), 129.6 (CH), 128.8 (2CH), 127.7 (2CH), 120.9 (CH), 39.9 (CH₂), 31.8 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 27.0 (CH₂), 22.7 (CH₂), 14.1 (CH₃).

(E)-N-Alil-3-(3-metoxifenil)acrilamida (4ba)



Líquido viscoso anaranjado

Fórmula empírica: C₁₃H₁₅NO₂

Peso Molecular: 217.27 g/mol

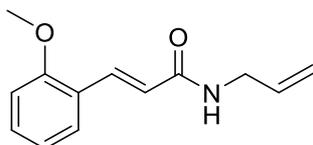
R_f (60% AcOEt/Hex): 0.48

IR: ν 3270, 3068, 2966, 2923, 2850, 1658, 1616, 1580, 1543 cm⁻¹

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.63 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 7.37 – 7.25 (m, 2H), 7.12 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 6.92 (dd, J = 8.2, 2.4 Hz, 1H), 6.42 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 5.92 (ddd, J = 22.8, 10.8, 5.7 Hz, 1H), 5.77 (s, 1H), 5.33 – 5.04 (m, 2H), 4.28 – 4.01 (m, 2H), 3.84 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 165.6 (C), 159.8 (C), 141.2 (CH), 136.1 (C), 129.8 (CH), 120.4 (C), 116.7 (CH₂), 115.4 (CH), 112.9 (CH), 110 (CH), 55.3 (CH₃), 42.2 (CH₂).

Masa exacta (ESI-TOF): [M+H]⁺ calculada para C₁₃H₁₆NO₂: 218.1176; encontrada 218.1164.

(E)-N-Alil-3-(2-metoxifenil)acrilamida (4ca)

Sólido blanco

P.F: 93.4-94.8 °C

Fórmula empírica: C₁₃H₁₅NO₂

Peso Molecular: 217.27 g/mol

R_f (60% AcOEt/Hex): 0.53

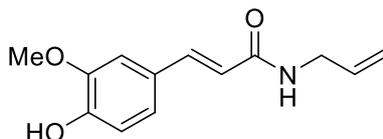
IR: ν 3278, 3071, 2966, 2922, 2836, 1648, 1613, 1597, 1549 cm⁻¹

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.91 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 7.6, 1.3 Hz, 1H), 7.39 – 7.25 (m, 1H), 6.94 (dd, J = 21.6, 5.7 Hz, 2H), 6.58 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 5.99 – 5.85 (m, 1H), 5.83 (s, 1H), 5.32 – 5.12 (m, 2H), 4.04 (t, J = 5.7 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 166.4 (C), 158.22 (C) 136.7 (CH), 134.3 (CH), 130.8 (CH), 129.1 (CH), 123.7 (C), 121.4 (CH), 120.6 (CH), 116.5 (CH₂), 111.1 (CH), 55.4 (CH₃), 42.1 (CH₂).

Masa exacta (ESI-TOF): [M+H]⁺ calculada para C₁₃H₁₆NO₂: 218.1176; encontrada 218.1161.

(E)-N-Alil-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (4da)



Líquido viscoso anaranjado

Fórmula empírica: C₁₃H₁₅NO₃

Peso Molecular: 233.27 g/mol

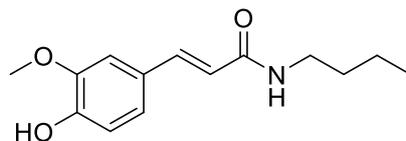
R_f (60% AcOEt/Hex): 0.18

IR: ν 3271, 3081, 3014, 2936, 2839, 1652, 1587, 1511 cm⁻¹

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.58 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.07 (dd, $J = 8.2, 1.7$ Hz, 1H), 7.00 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.30 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 6.06–5.84 (m, 1H), 5.79 (s ancho, 1H), 5.38–5.07 (m, 2H), 4.04 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 3.92 (s, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 166.1 (C), 147.4 (C), 146.7 (C), 141.3 (CH), 134.2 (CH), 127.2 (C), 122.1 (CH), 117.9 (CH), 116.6 (CH₂), 114.7 (CH), 109.7 (CH), 55.9 (CH₃), 42.2 (CH₂).

Masa exacta (ESI-TOF): [M+H]⁺ calculada para C₁₃H₁₆NO₃: 234.1125; encontrada 234.1130.

(E)-N-Butil-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)acrilamida (4db)

Líquido viscoso anaranjado

Fórmula empírica: C₁₄H₁₉NO₃

Peso Molecular: 249.31 g/mol

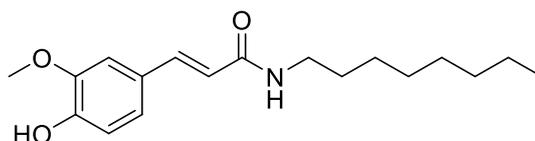
R_f (60% AcOEt/Hex): 0.31

IR: ν 3270, 2961, 2929, 2871, 1727, 1653, 1588, 1545, 1514 cm⁻¹

¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.56 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.08 (dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, 1H), 7.01 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 6.95 (m, 1H), 6.26 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 5.57 (s ancho, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.41 (c, $J = 7.0$ Hz, 2H), 1.64–1.52 (m, 2H), 1.47–1.35 (m, 2H), 0.97 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

Masa exacta (ESI-TOF): [M+H]⁺ calculada para C₁₄H₂₀NO₃: 250.1438; encontrada 250.1422.

(E)-3-(4-Hidroxi-3-metoxifenil)-N-octilacrilamida (4dd)



Líquido viscoso anaranjado

Fórmula empírica: C₁₈H₂₇NO₃

Peso Molecular: 305.42 g/mol

R_f (60% AcOEt/Hex): 0.37

IR: ν 3272, 3059, 2954, 2925, 2854, 1653, 1588, 1548, 1514 cm⁻¹

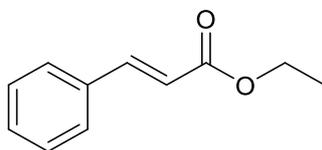
¹H-RMN (300 MHz, CDCl₃): δ 7.55 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 7.05 (dd, $J = 8.2, 1.6$ Hz, 1H), 6.98 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 6.90 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.28 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 5.84 (s ancho, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.38 (c, $J = 6.3$ Hz, 2H), 1.55 (quint, $J = 6.9$ Hz, 5H), 1.25 (d, $J = 10.3$ Hz, 18H) 0.88 (t, $J = 6.5$ Hz, 3H).

¹³C-RMN (75 MHz, CDCl₃): δ 166.3 (C), 147.4 (C), 146.8 (C), 140.8 (CH), 127.3 (C), 121.9 (CH), 118.3 (CH), 114.8 (CH), 109.7 (CH), 55.9 (CH₃), 39.8 (CH₂), 31.8 (CH₂), 29.7 (CH₂), 29.3 (CH₂), 29.2 (CH₂), 27.0 (CH₂), 22.7 (CH₂), 14.1 (CH₃).

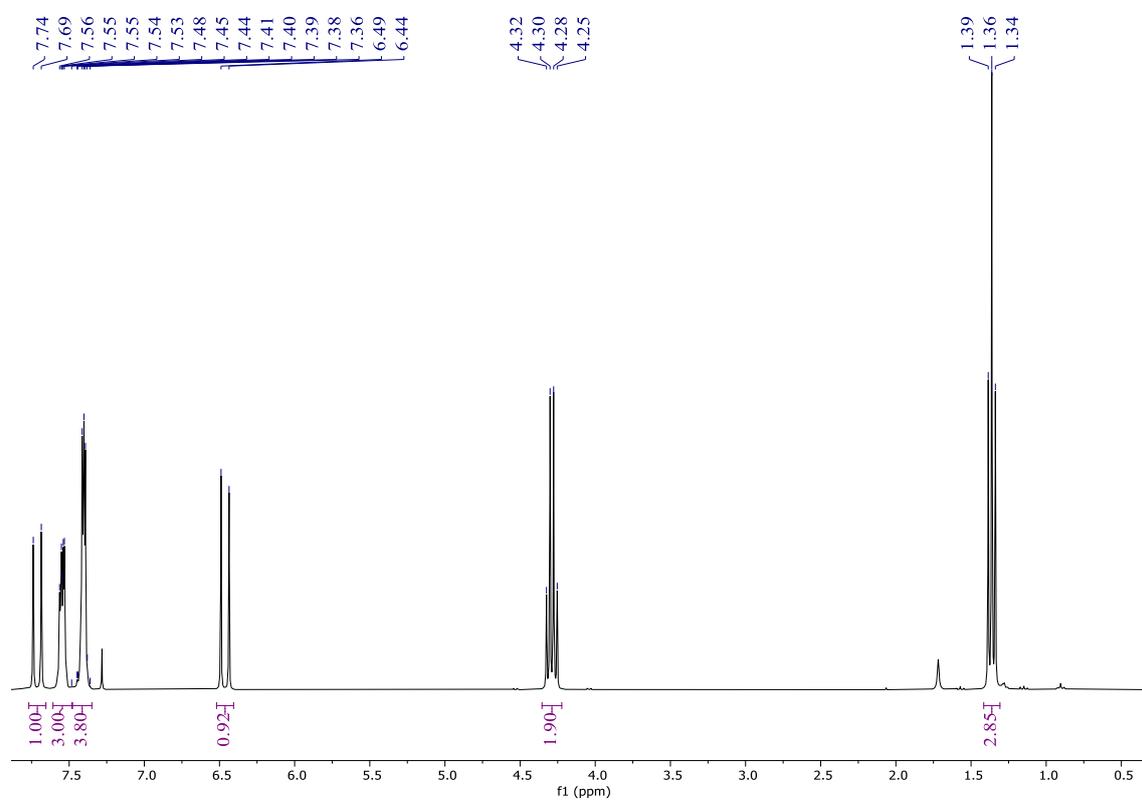
Masa exacta (ESI-TOF): [M+H]⁺ calculada para C₁₈H₂₈NO₃: 306.2064; encontrada 306.2053.

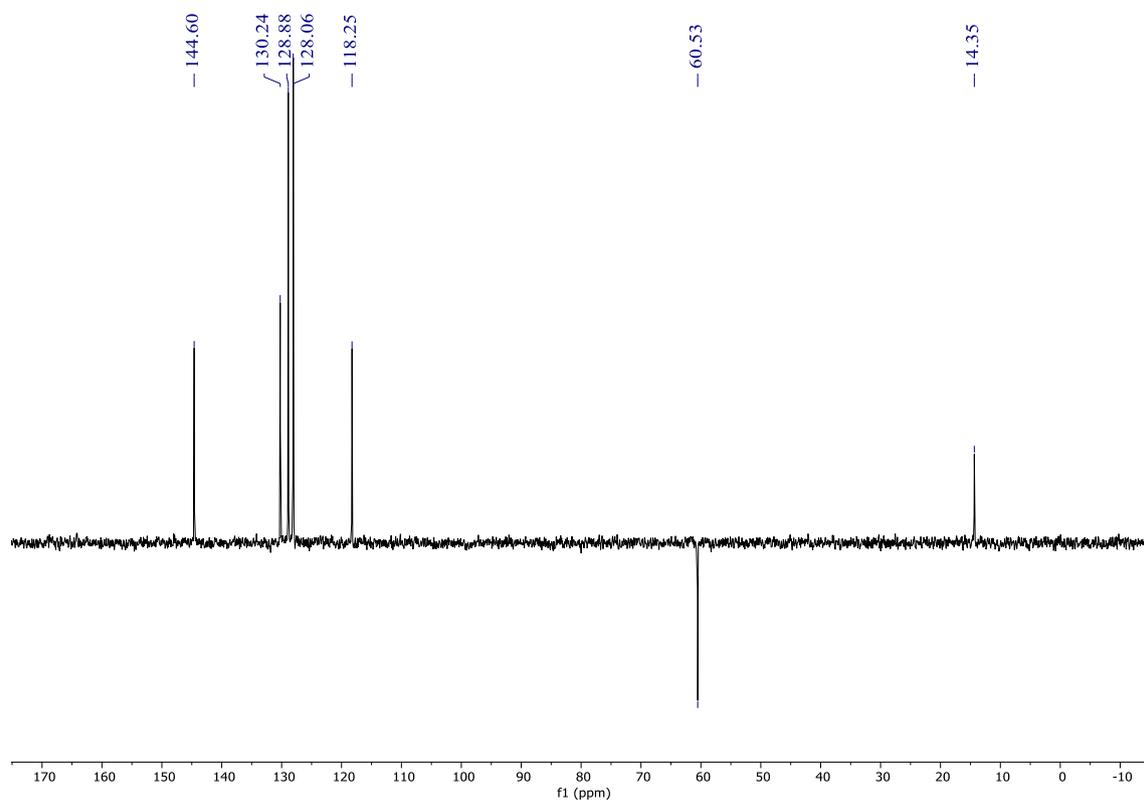
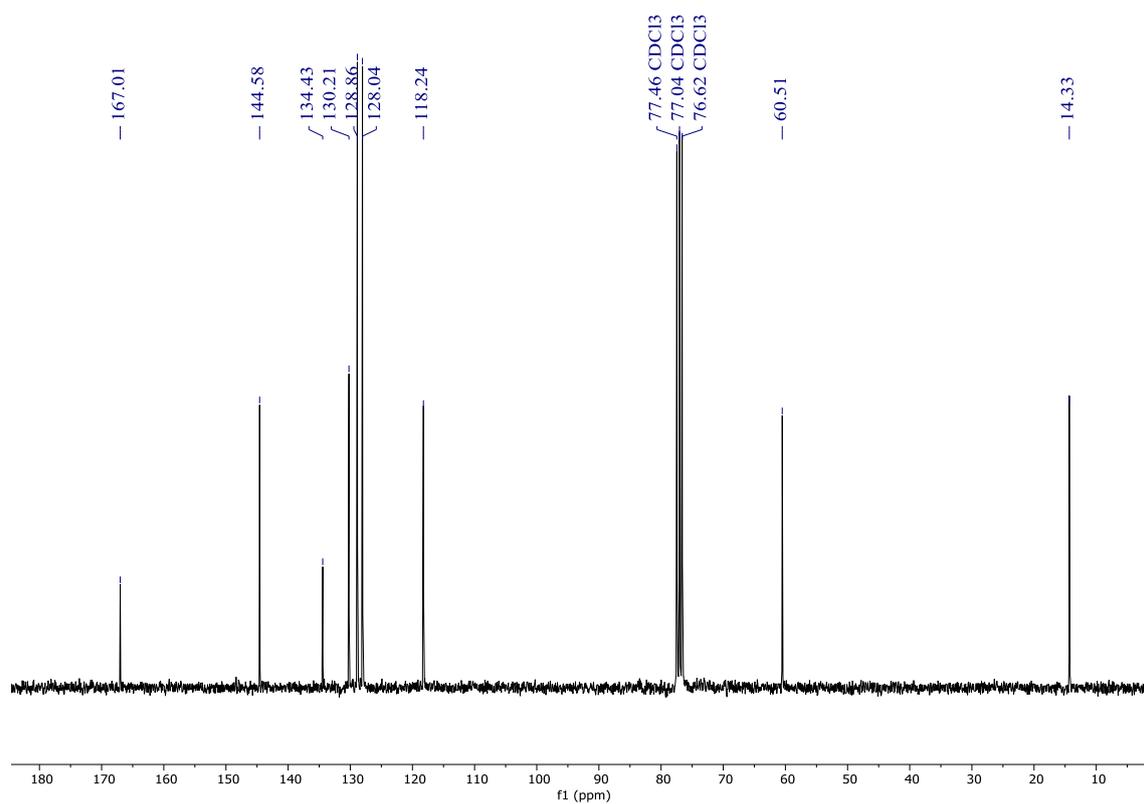
7. ANEXO DE ESPECTROS

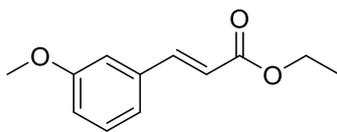
7.1. Espectros de RMN



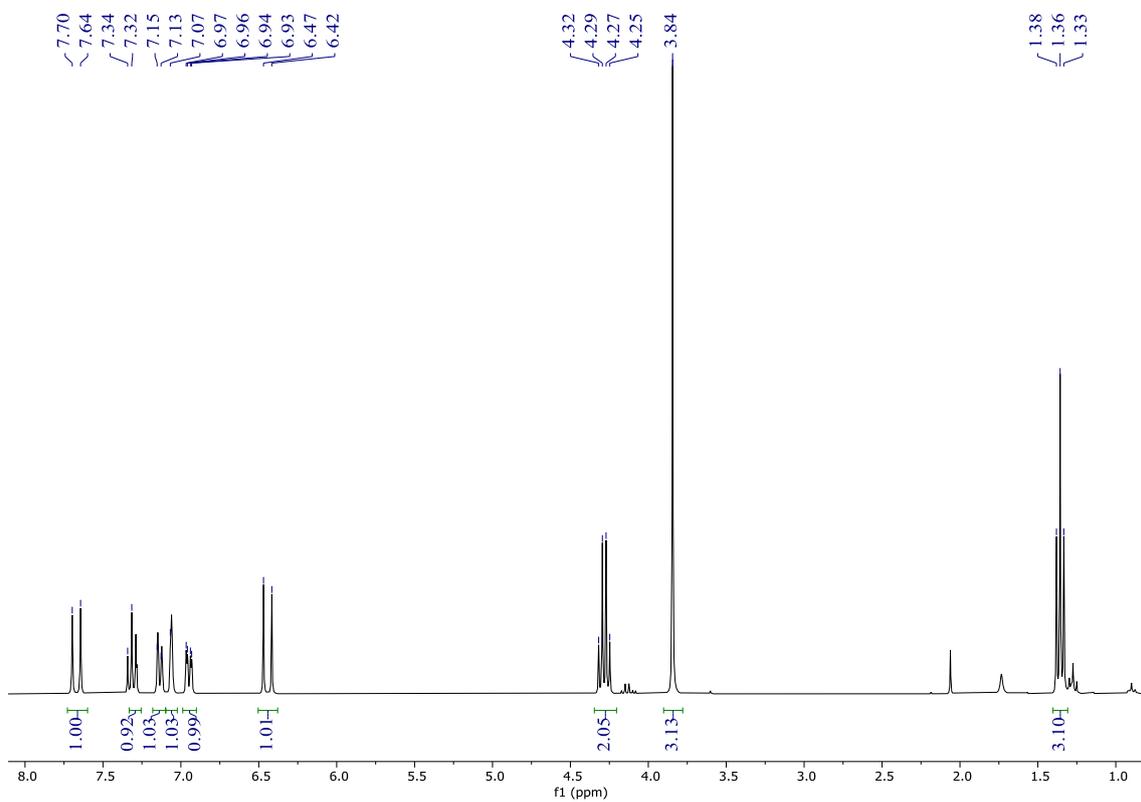
(2a)

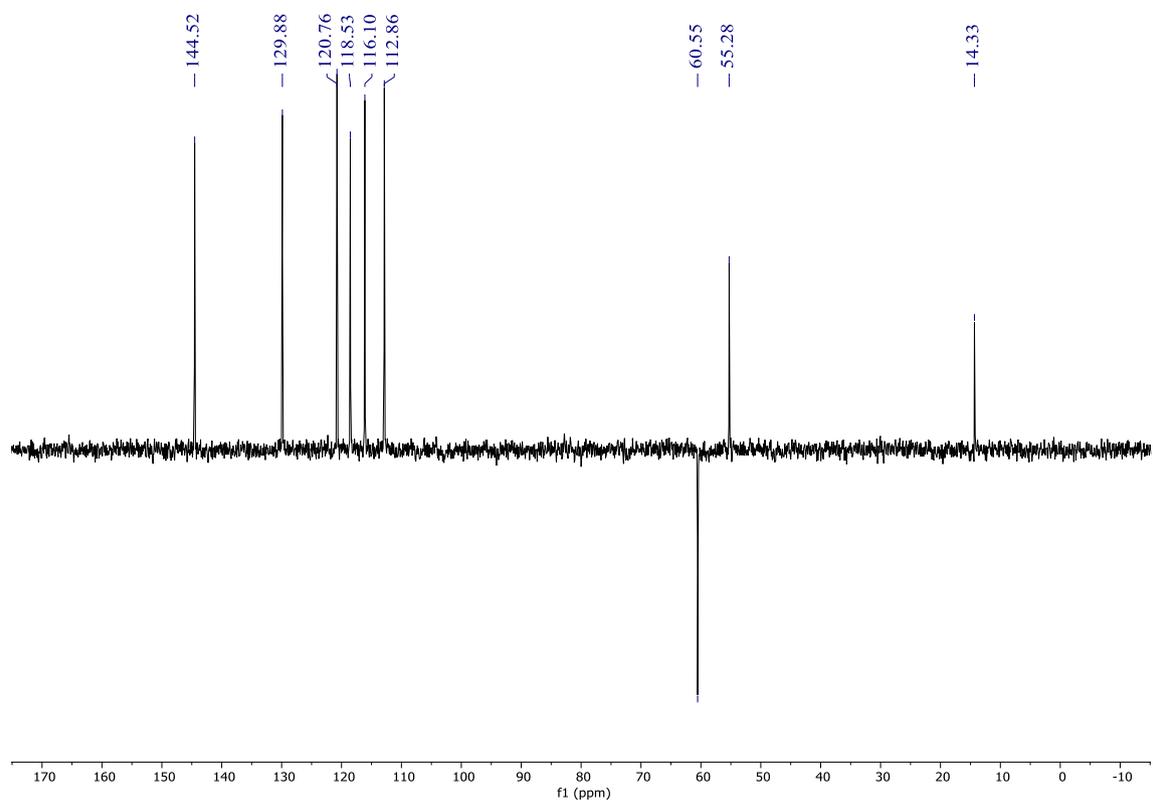
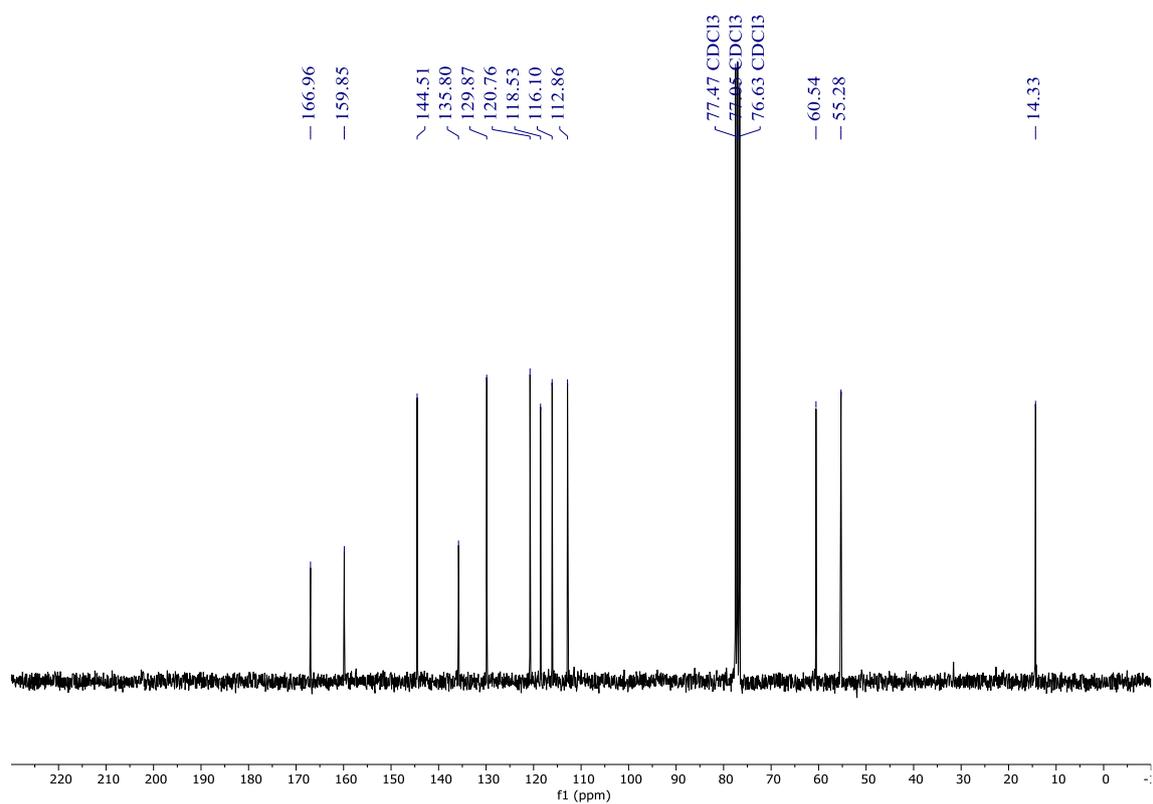


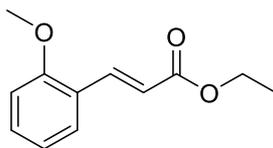




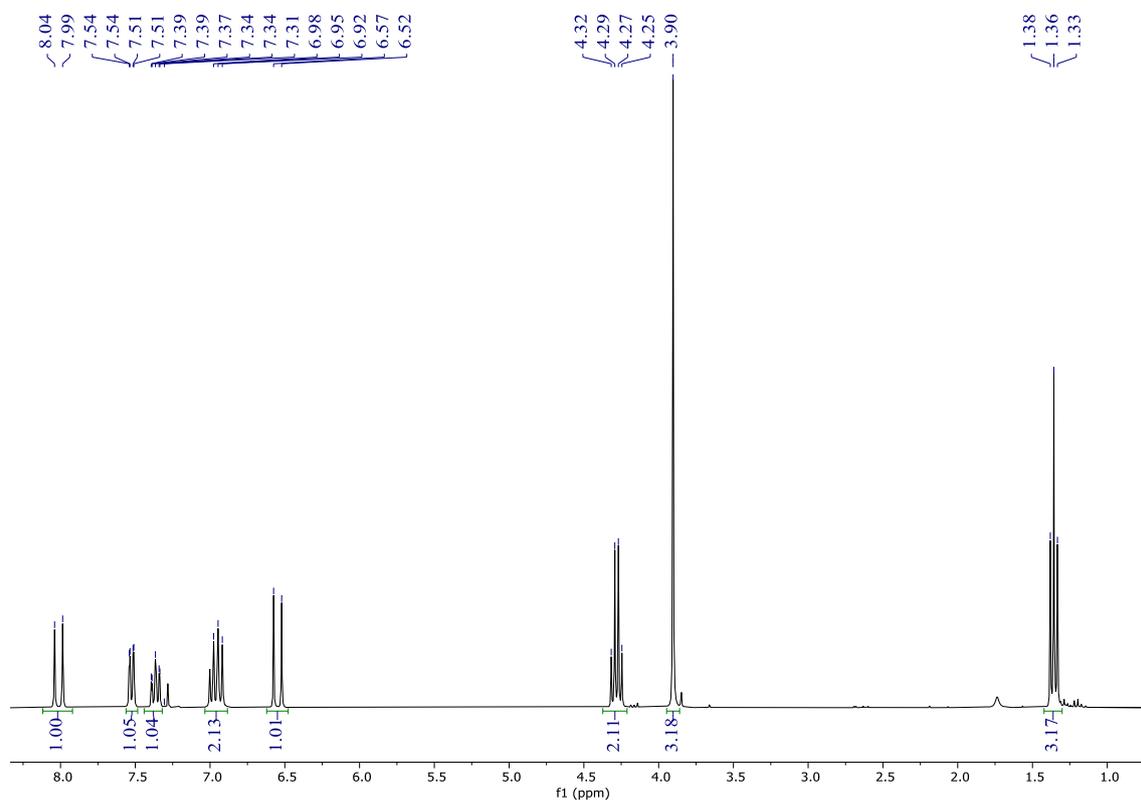
(2b)

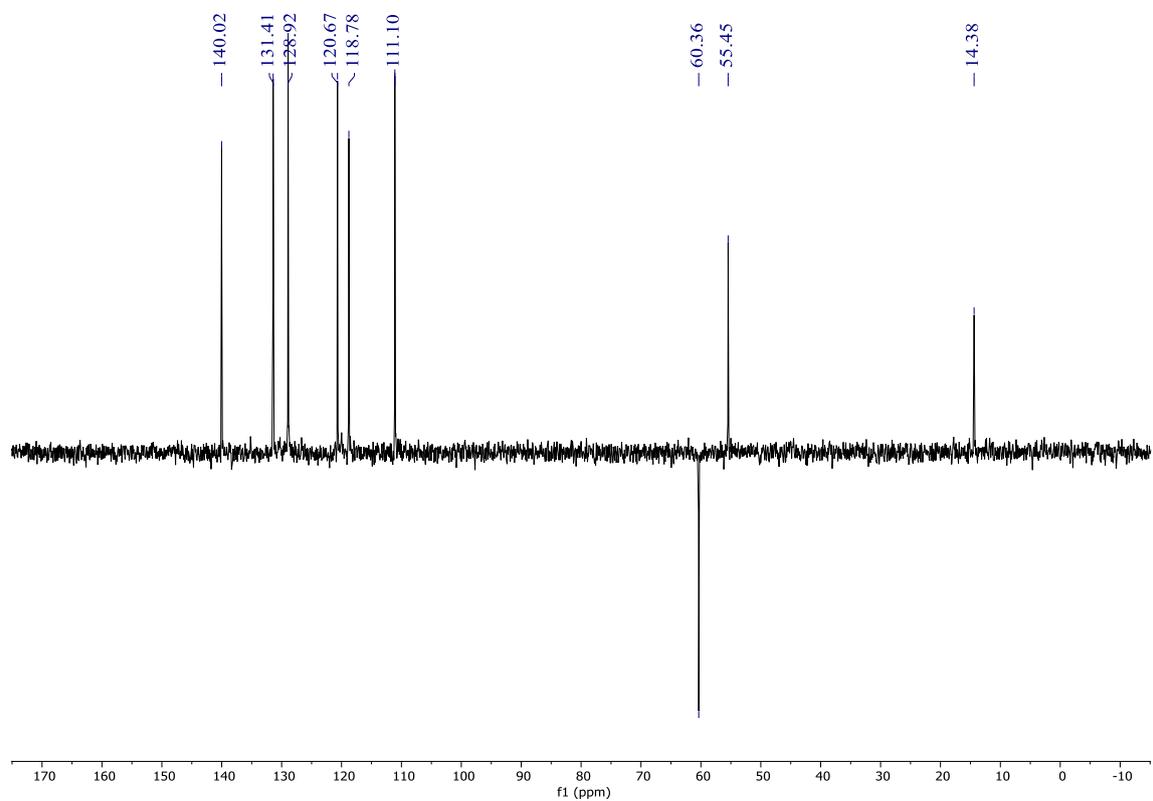
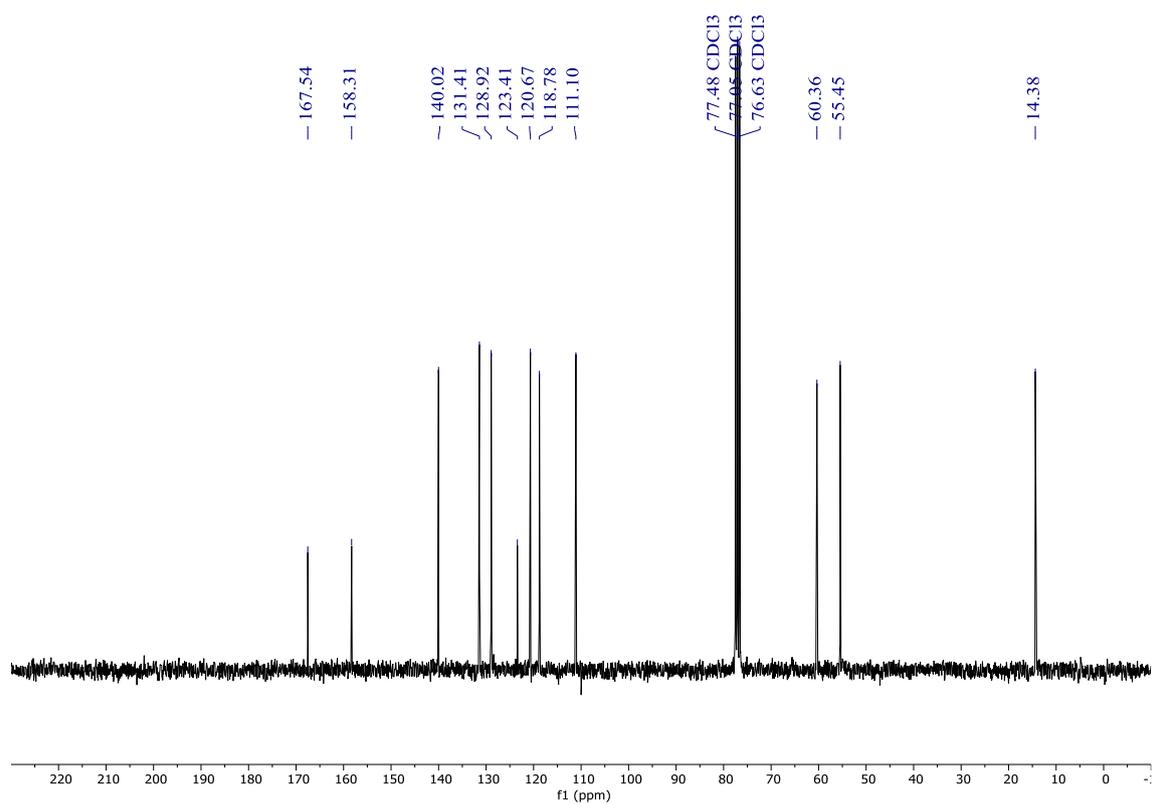


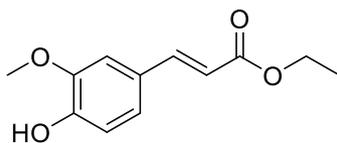




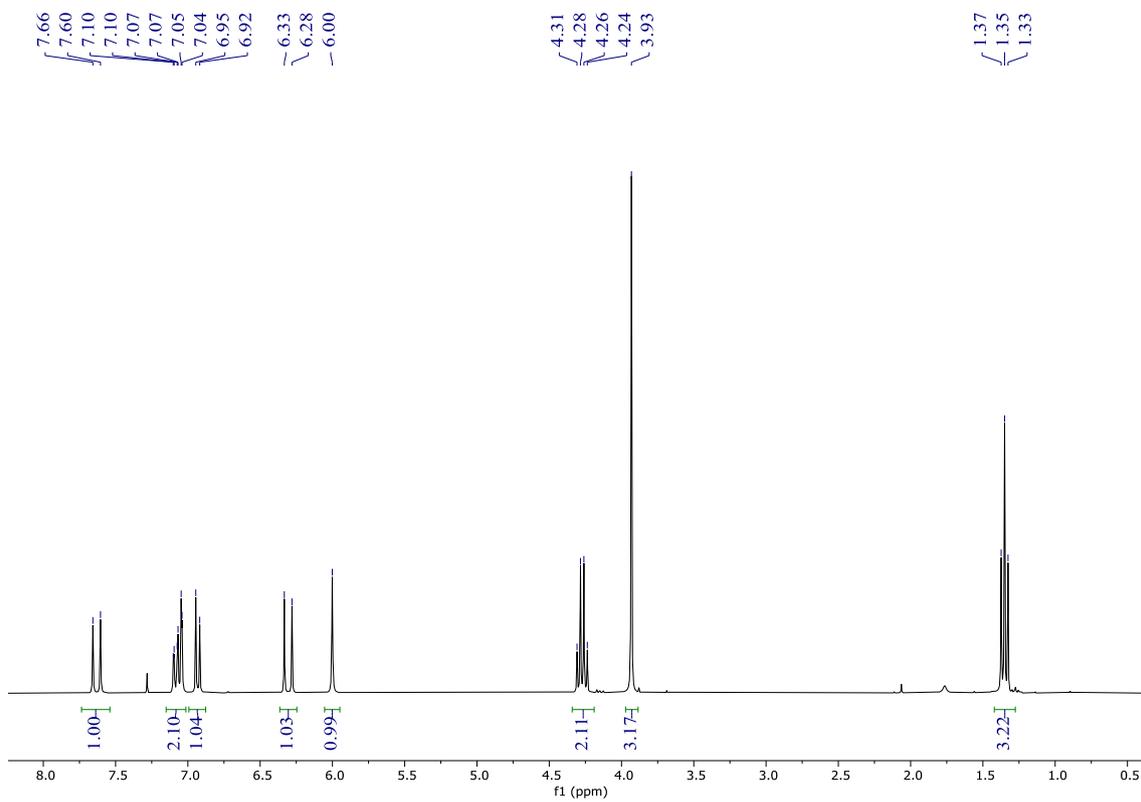
(2c)

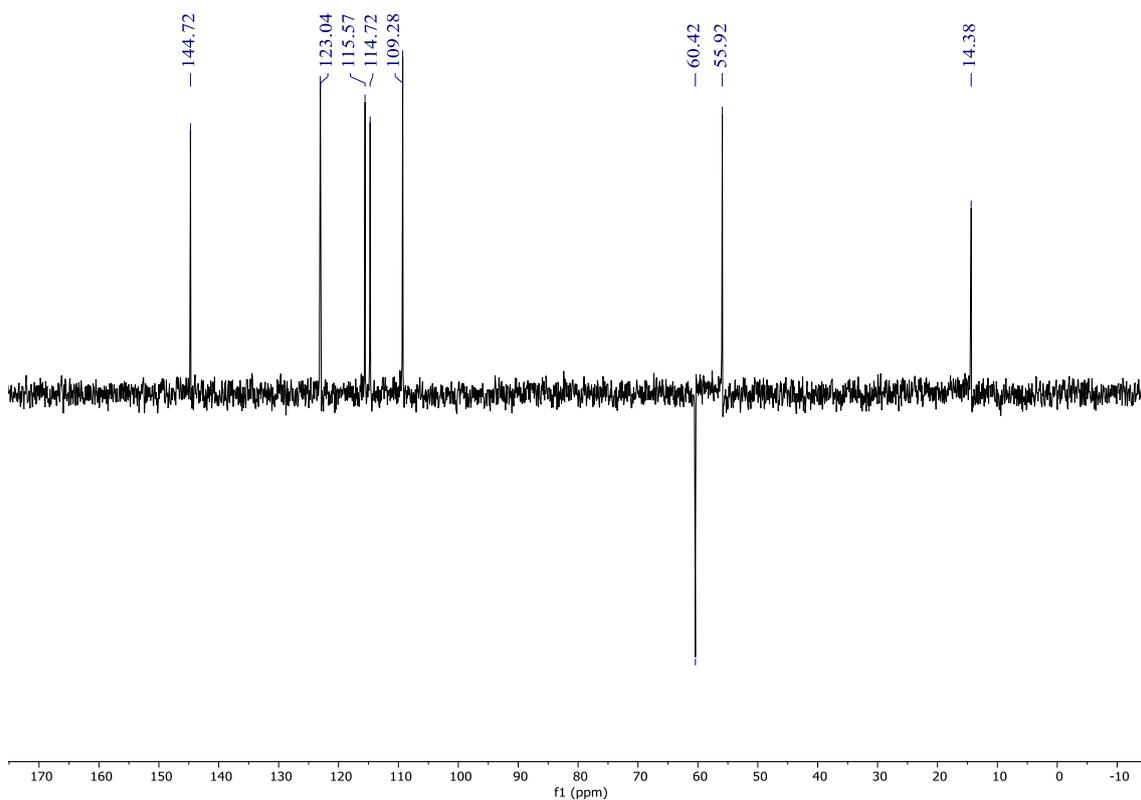
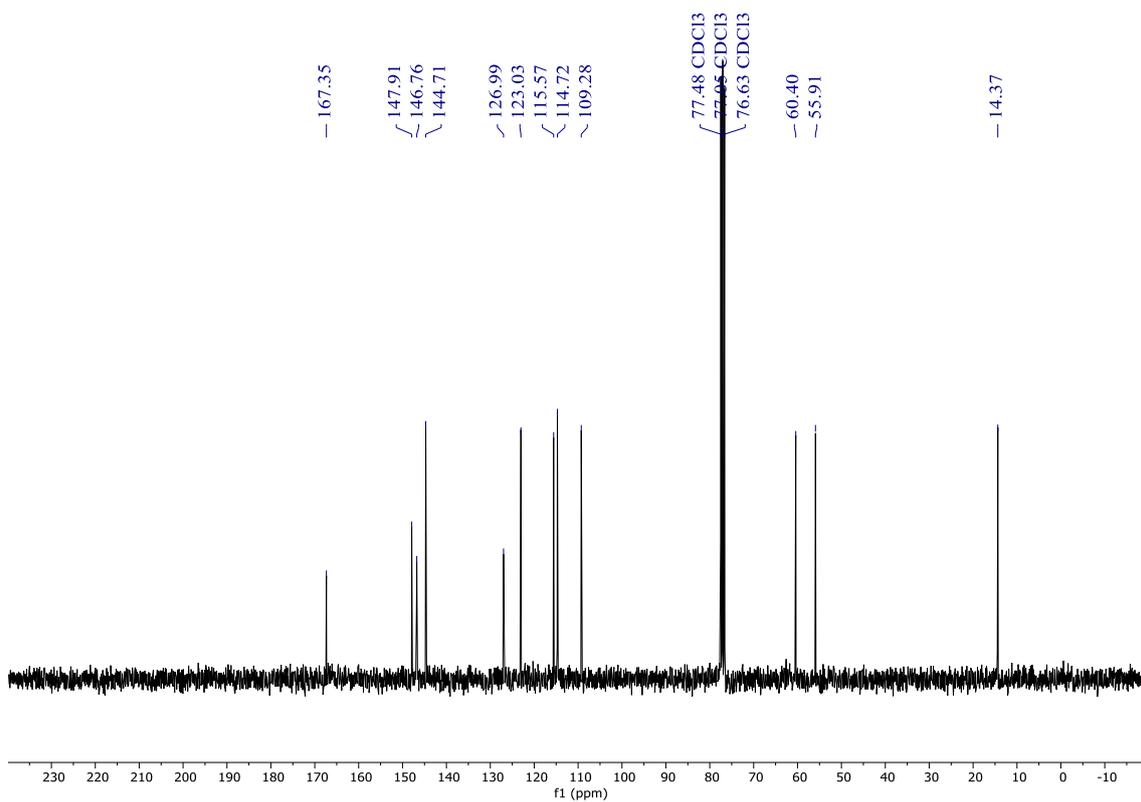


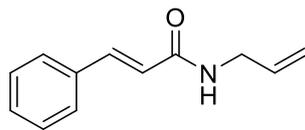




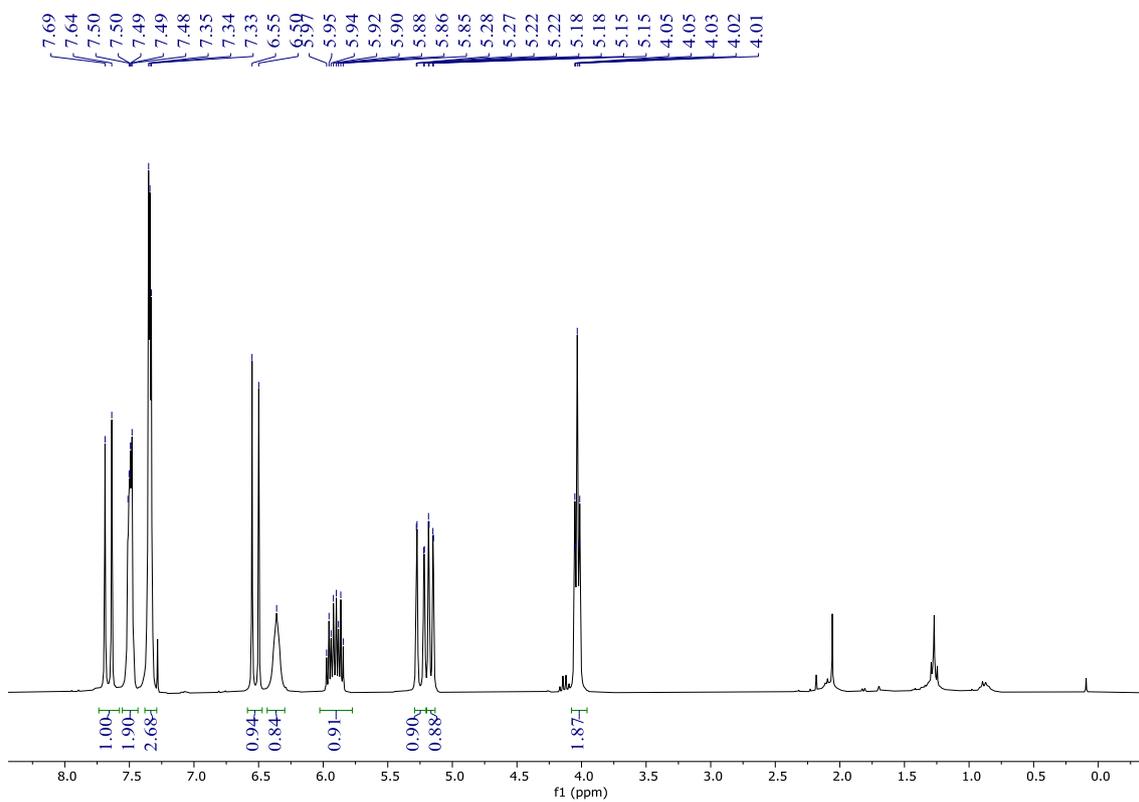
(2d)

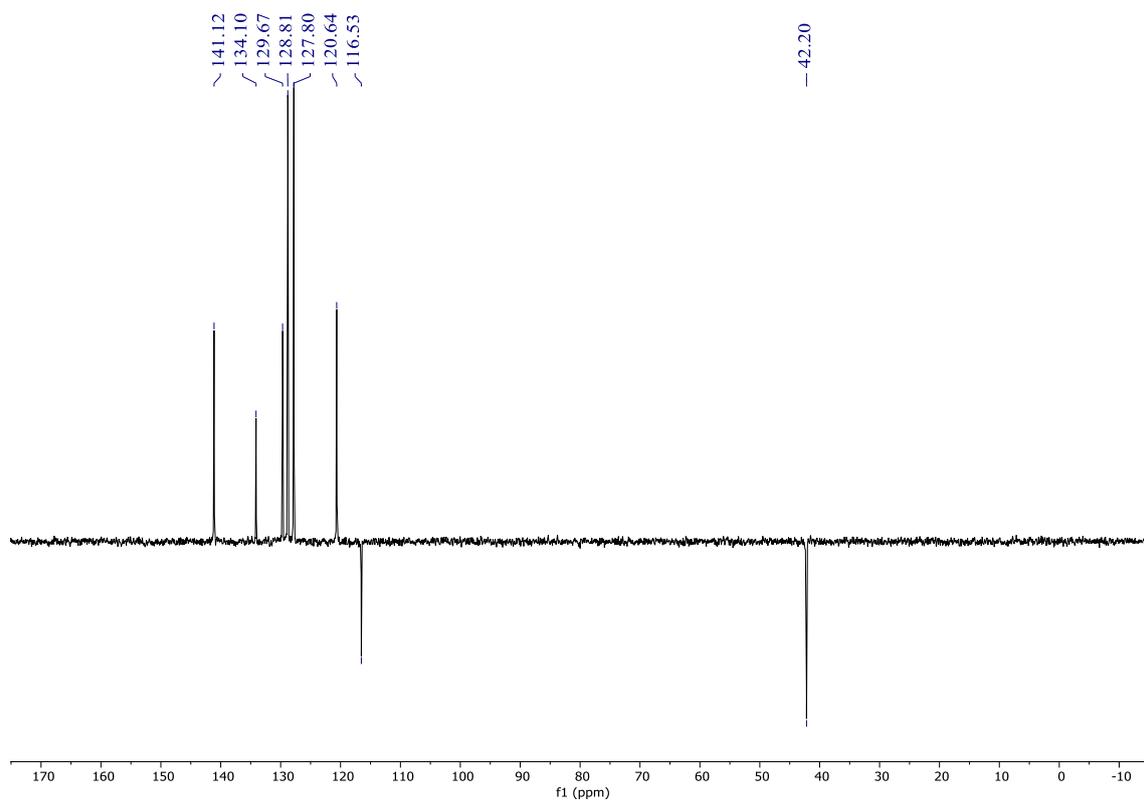
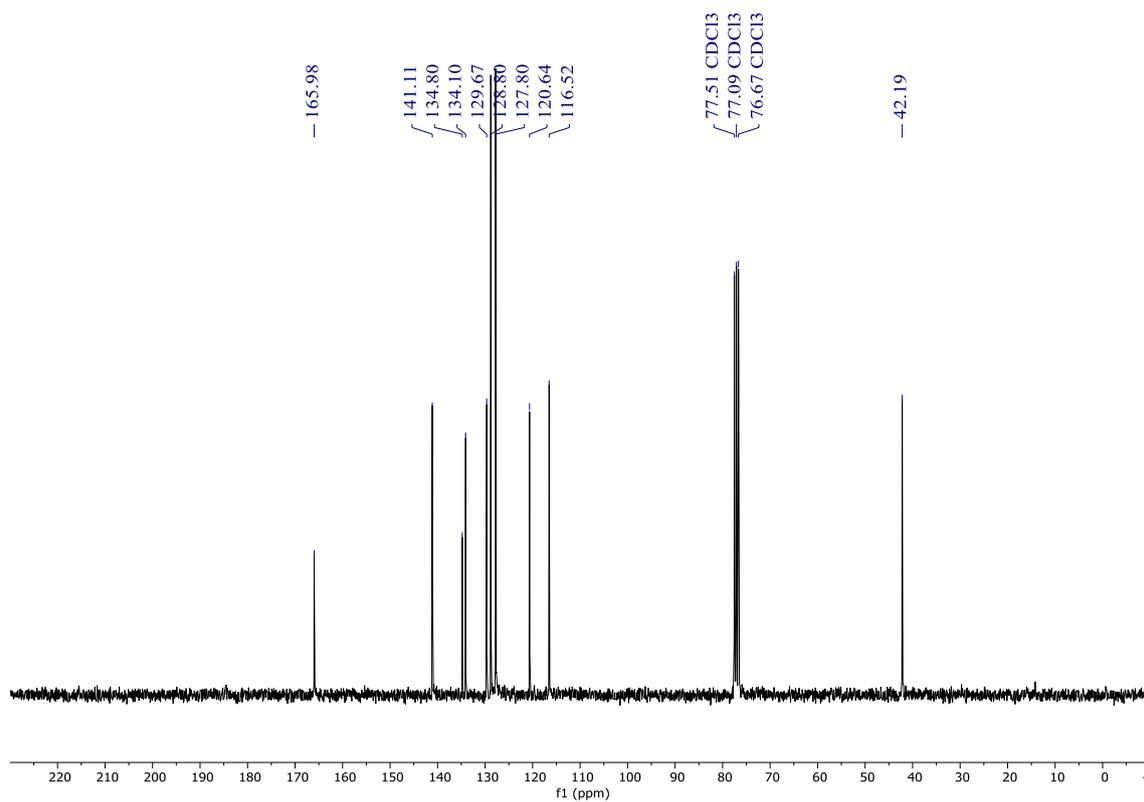


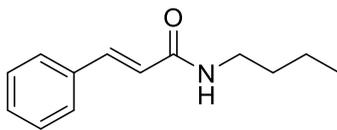




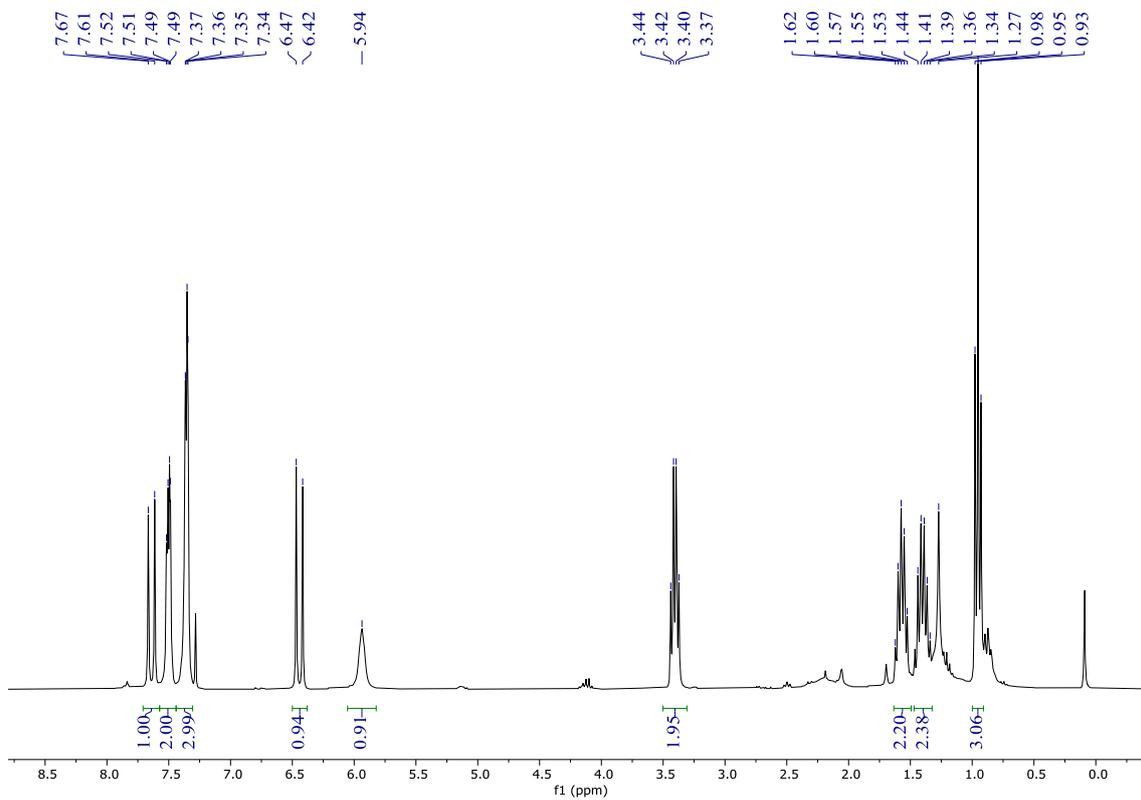
(4aa)

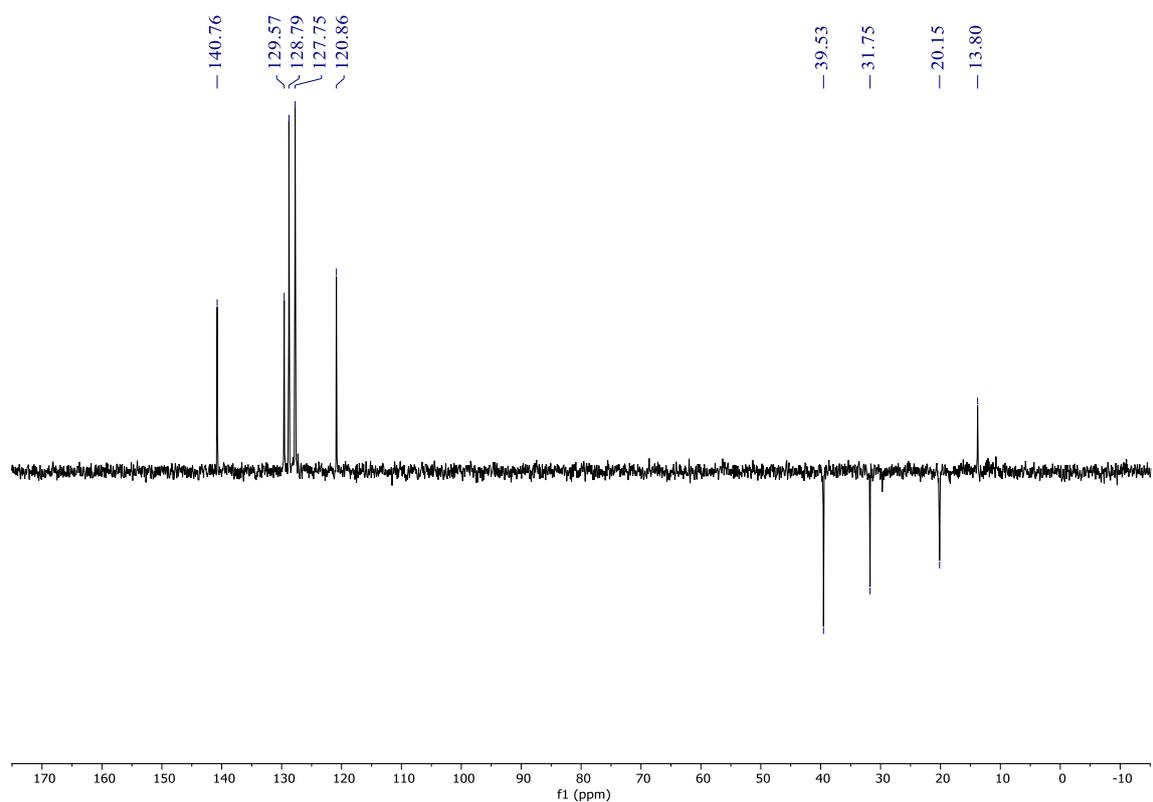
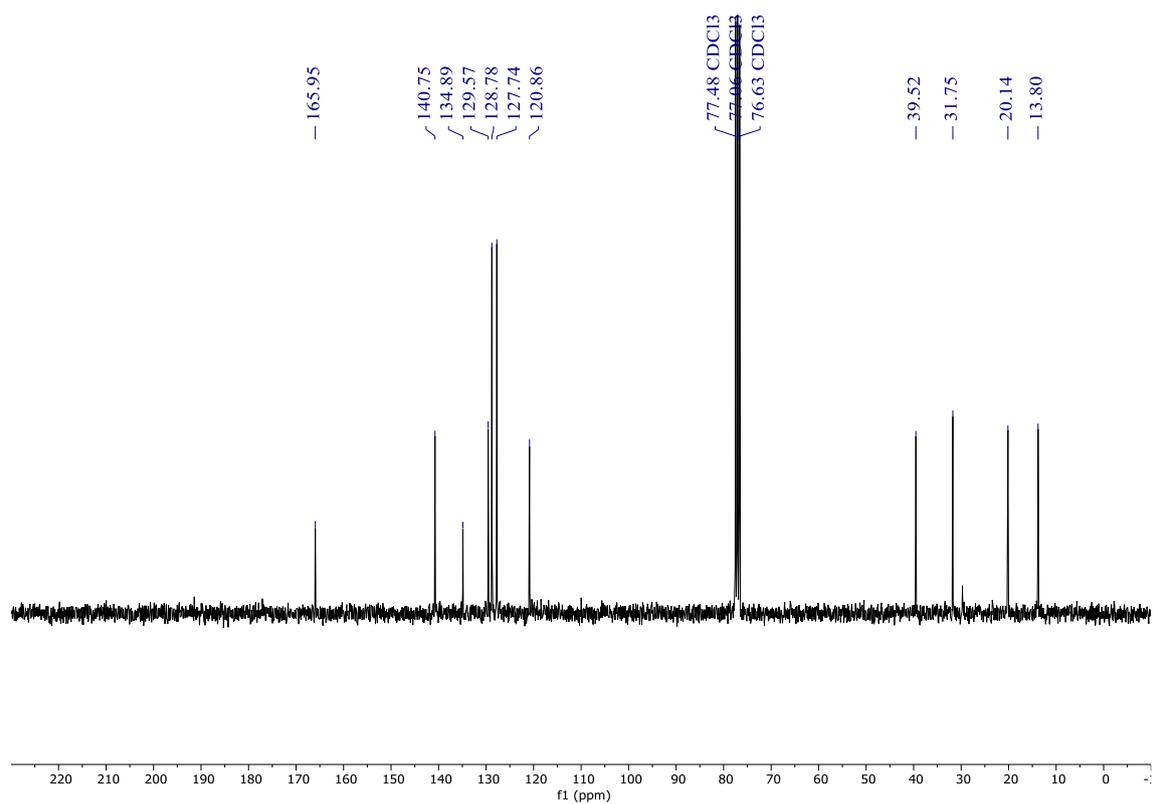


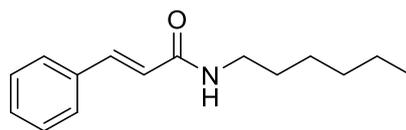




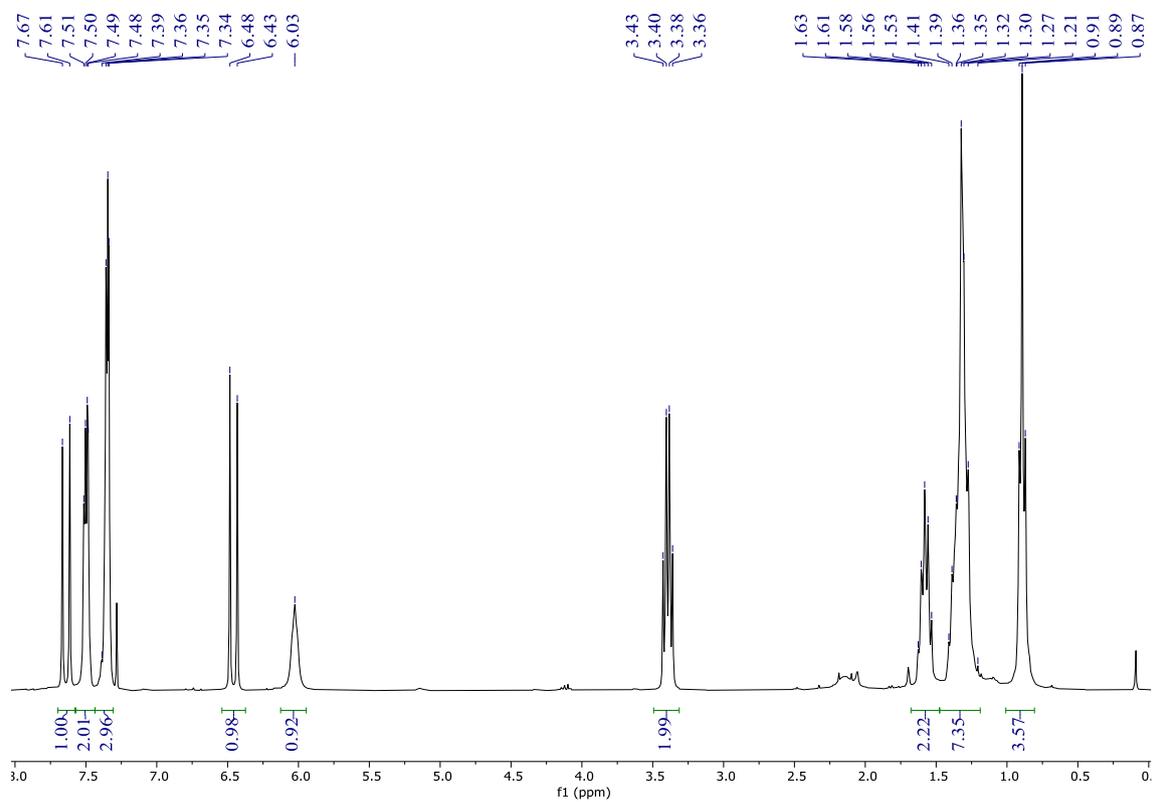
(4ab)

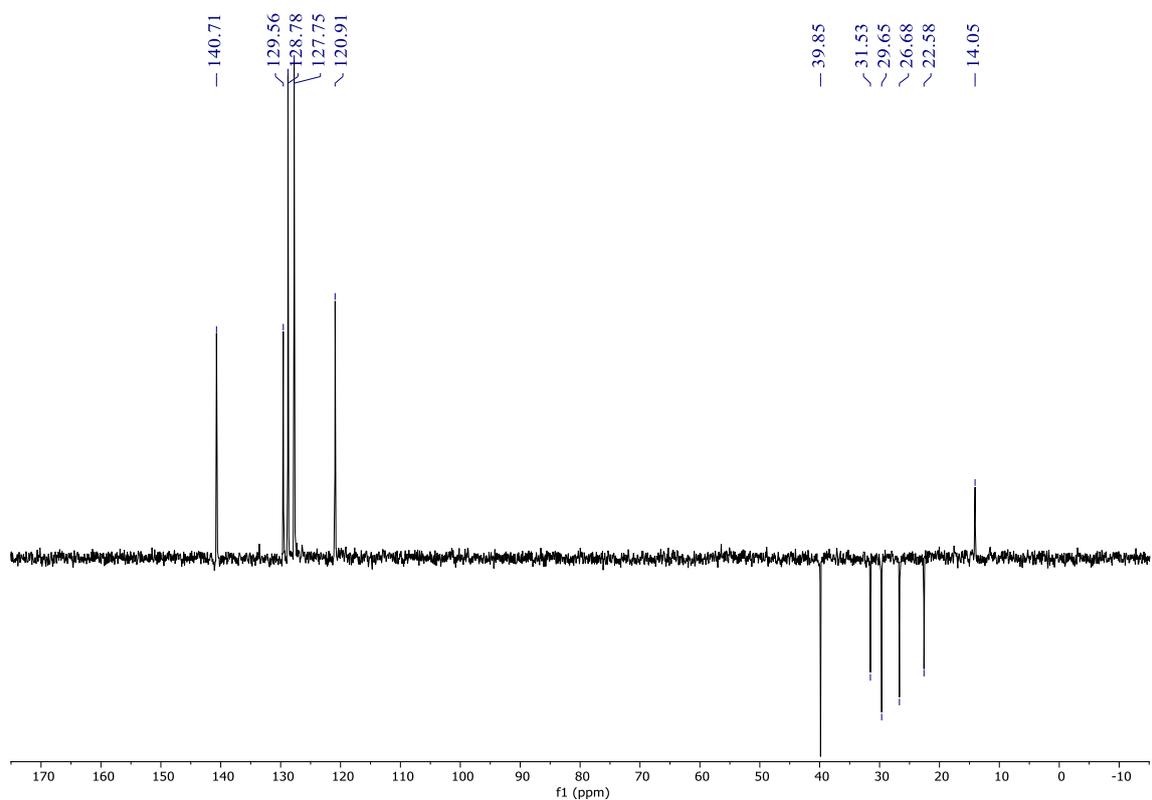
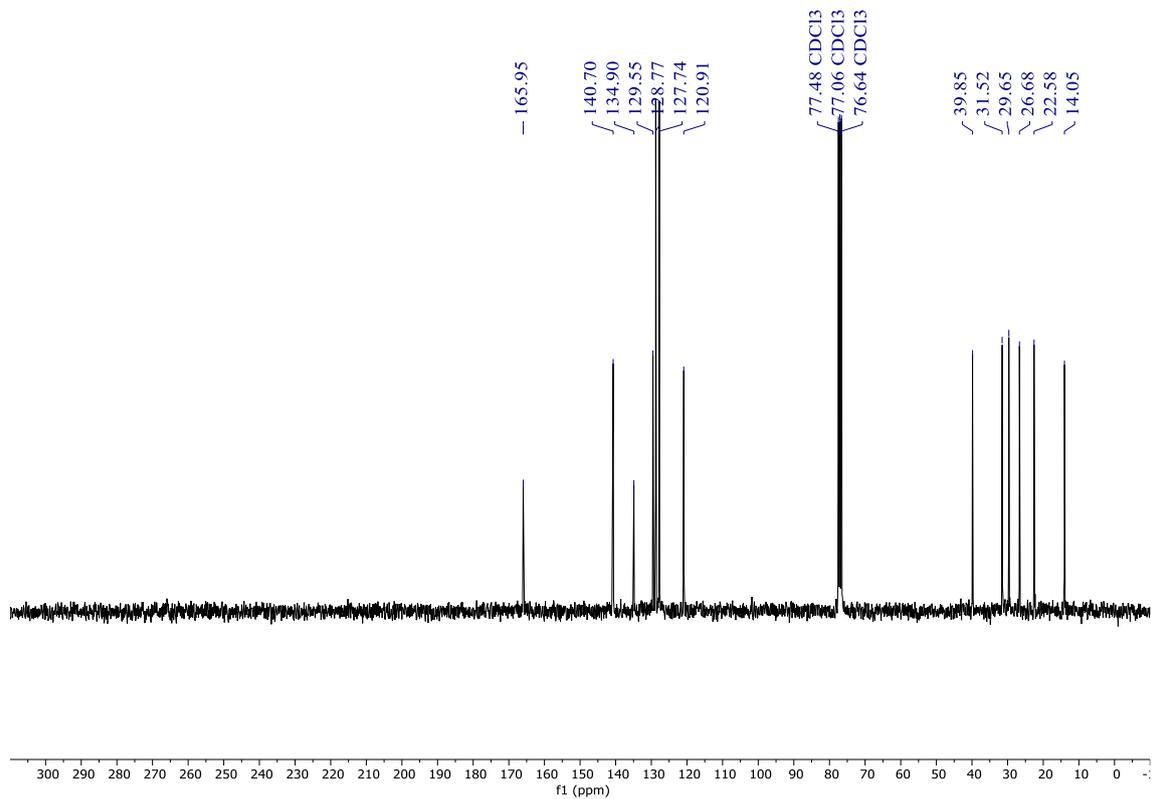


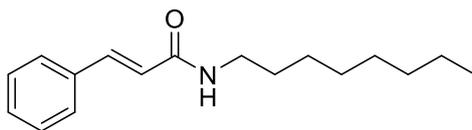




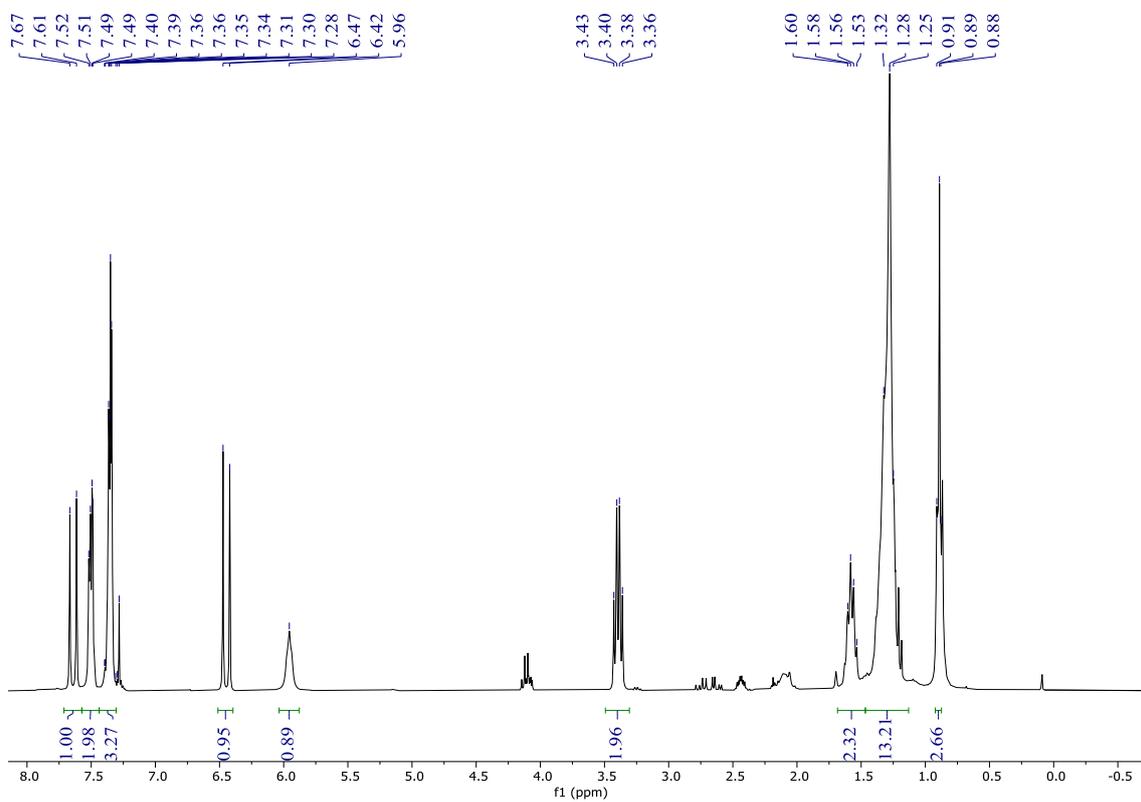
(4ac)

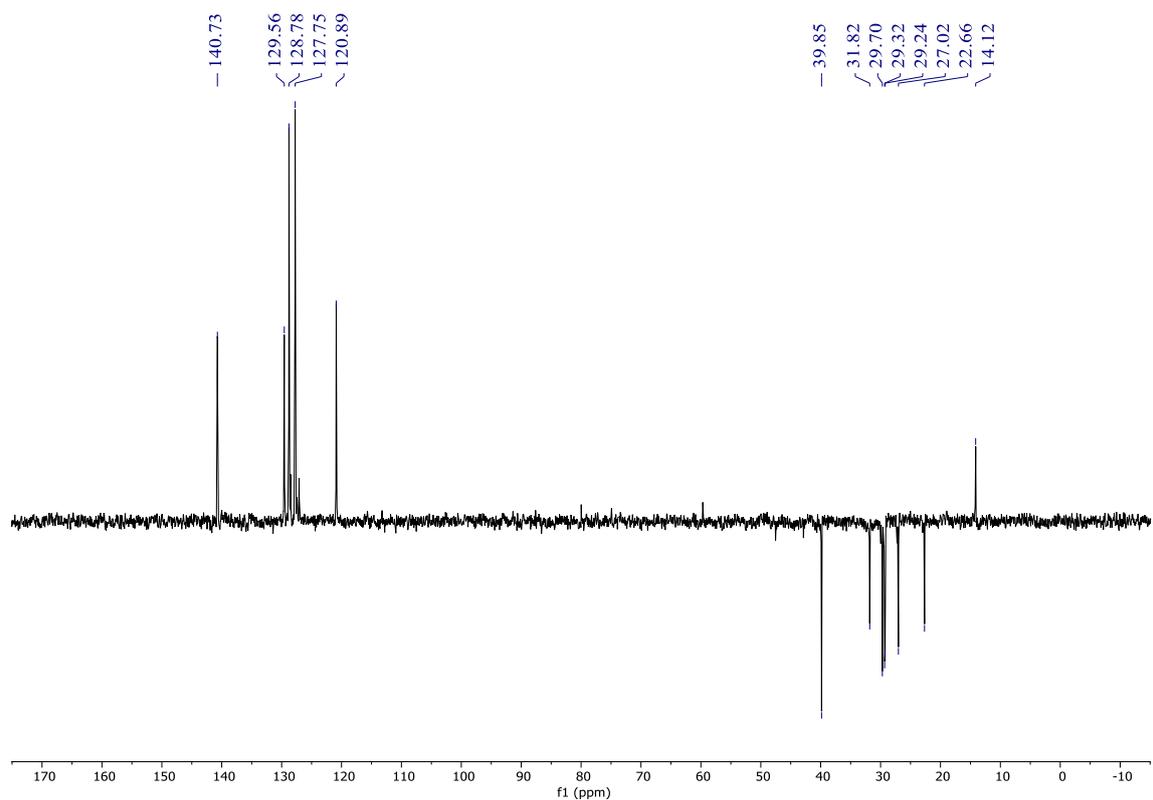
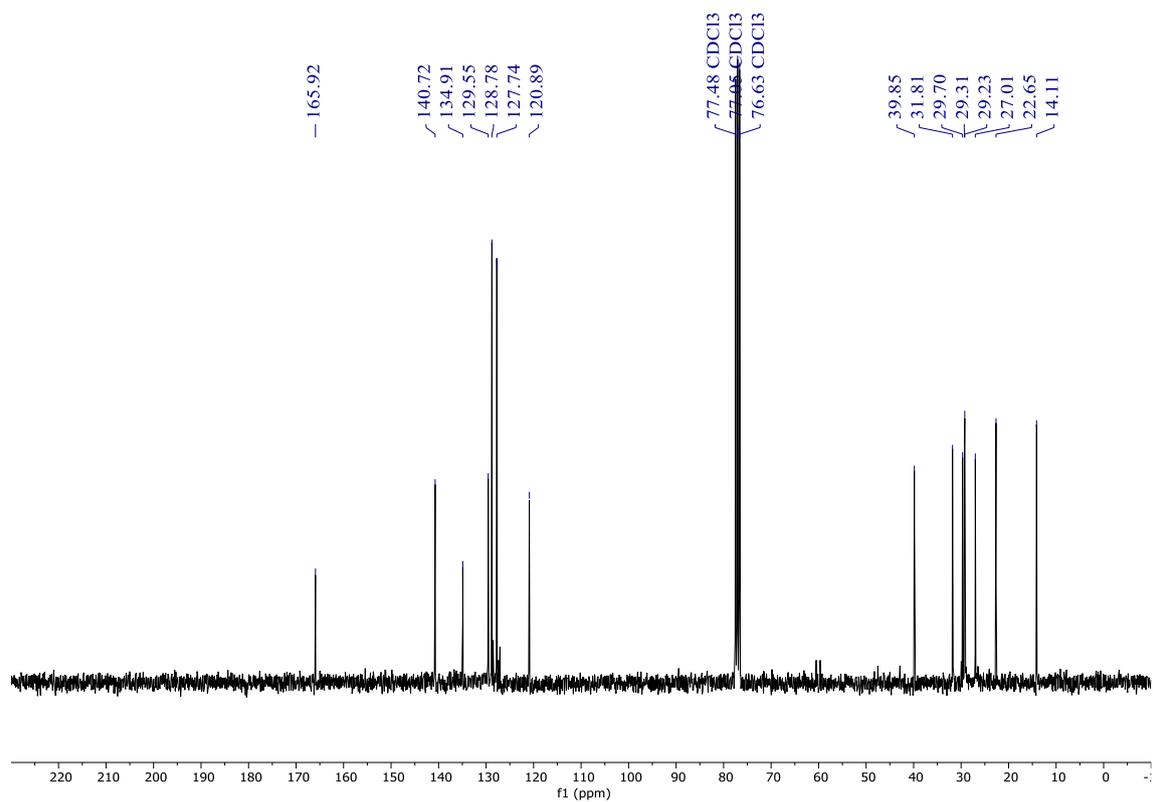


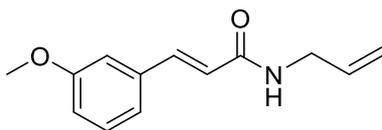




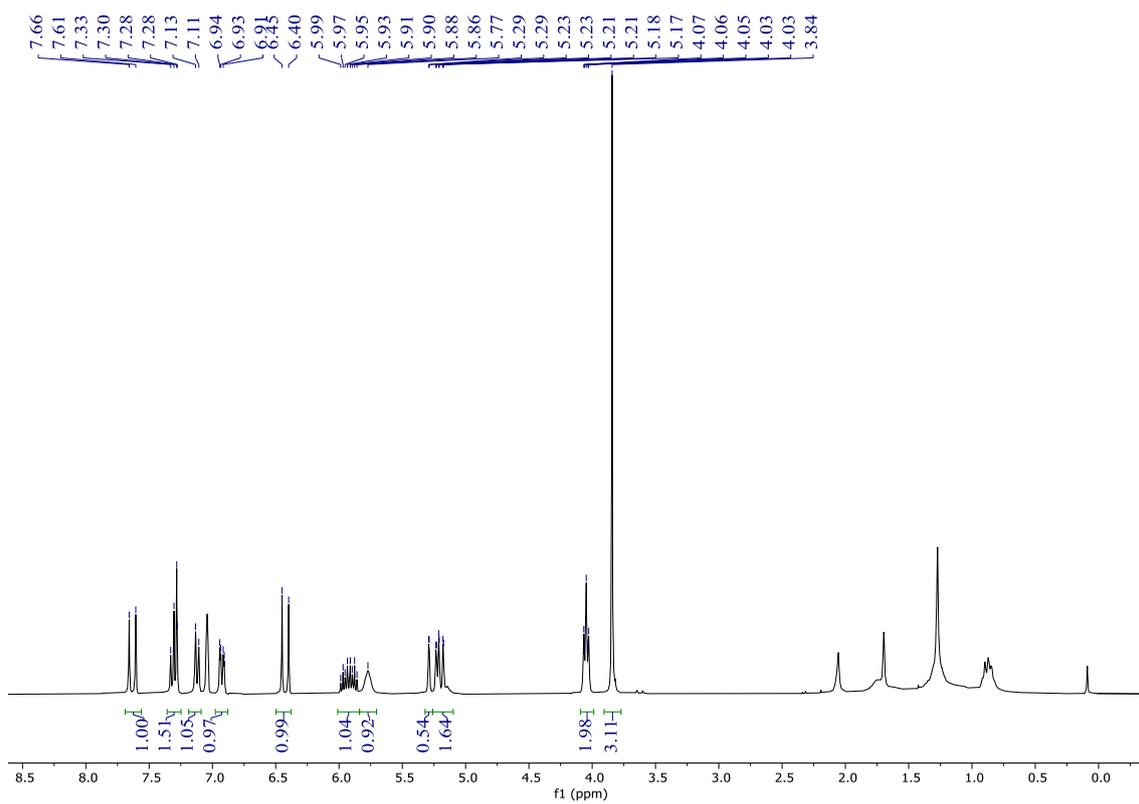
(4ad)

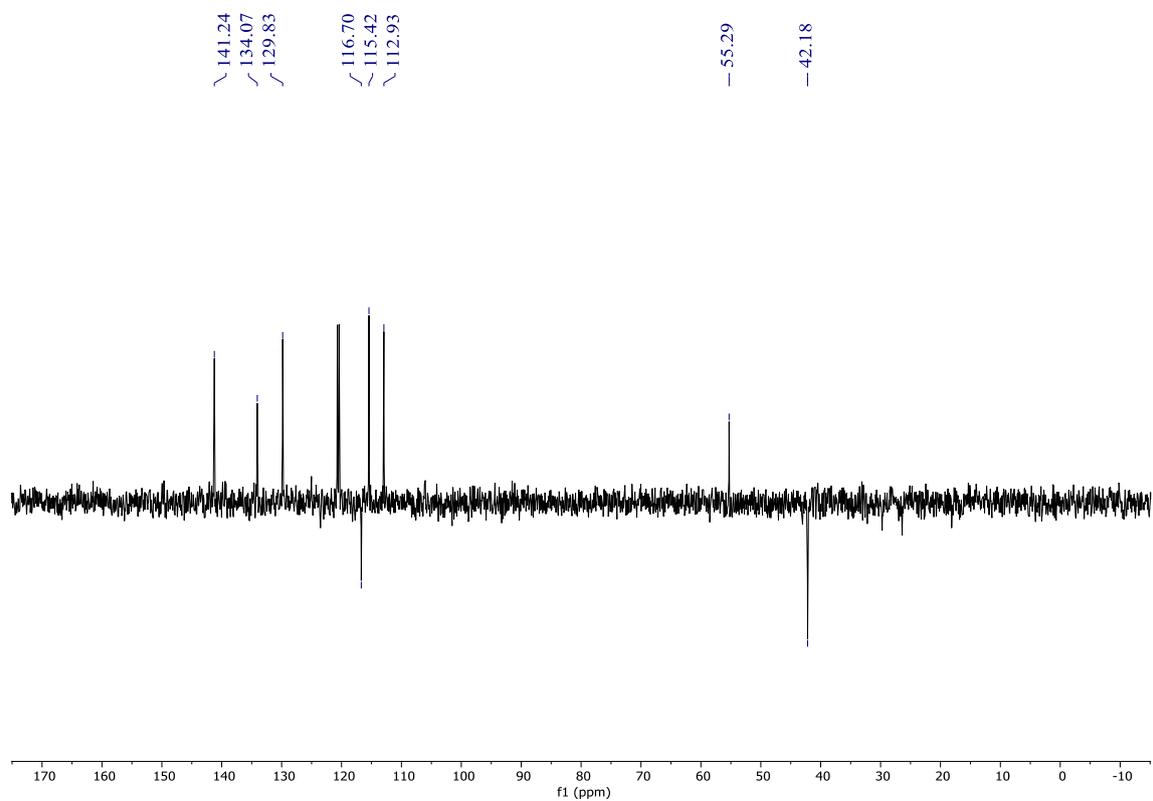
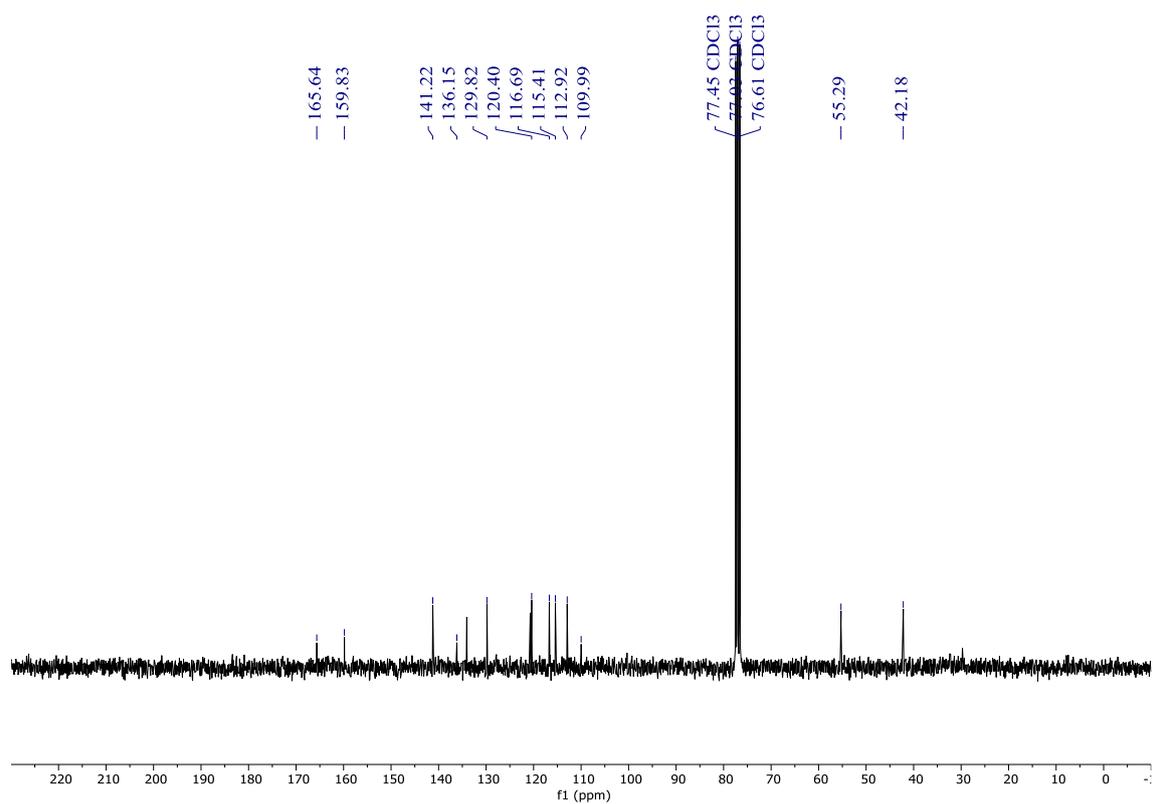


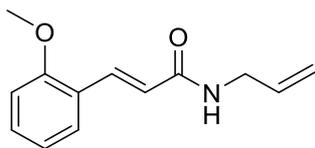




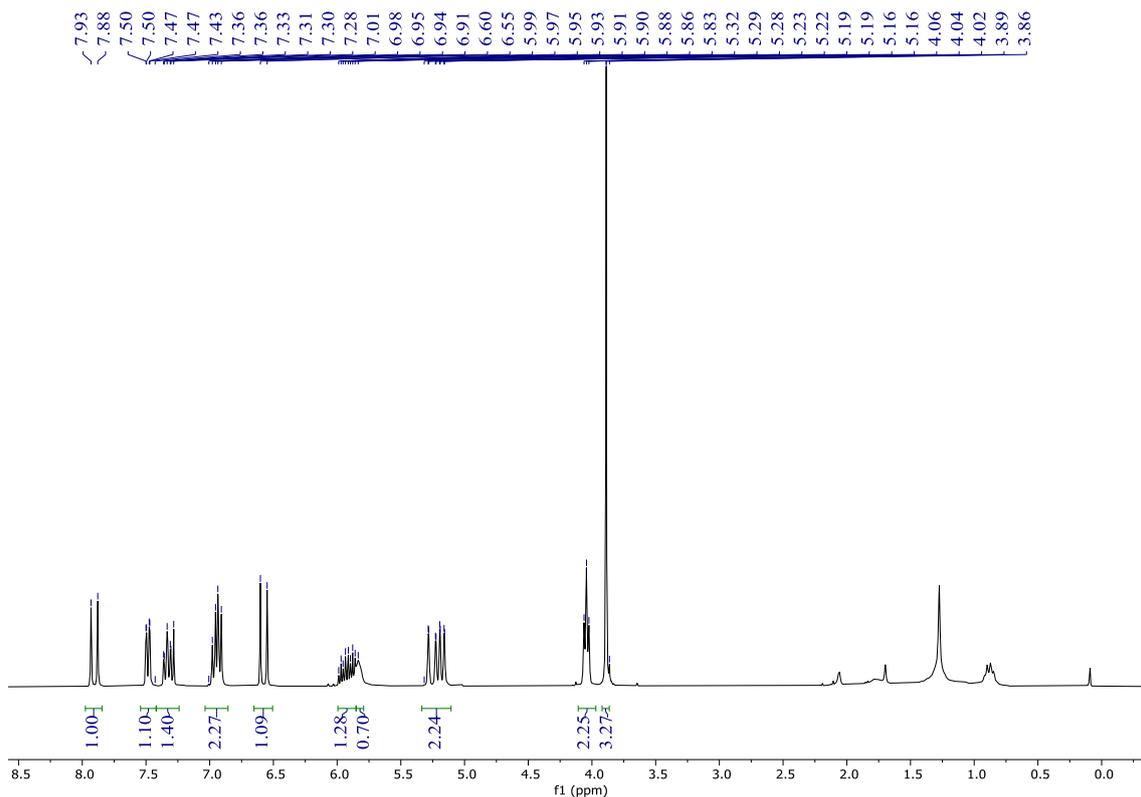
(4ba)

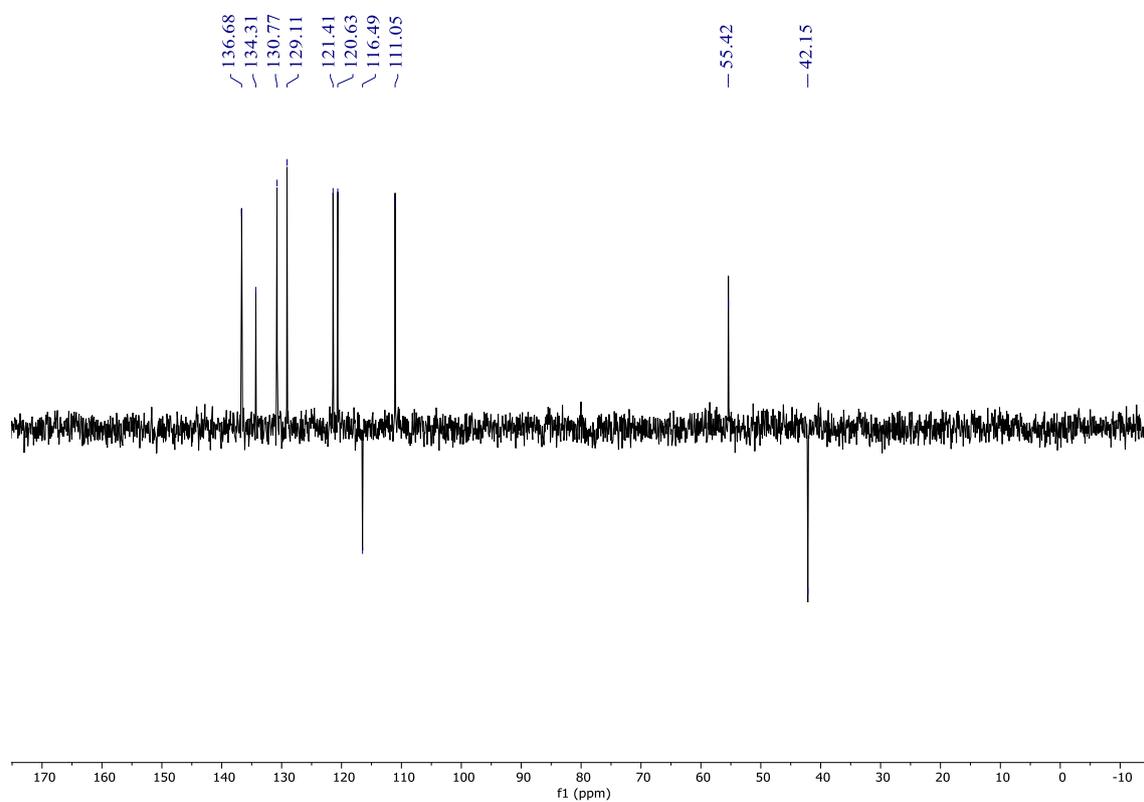
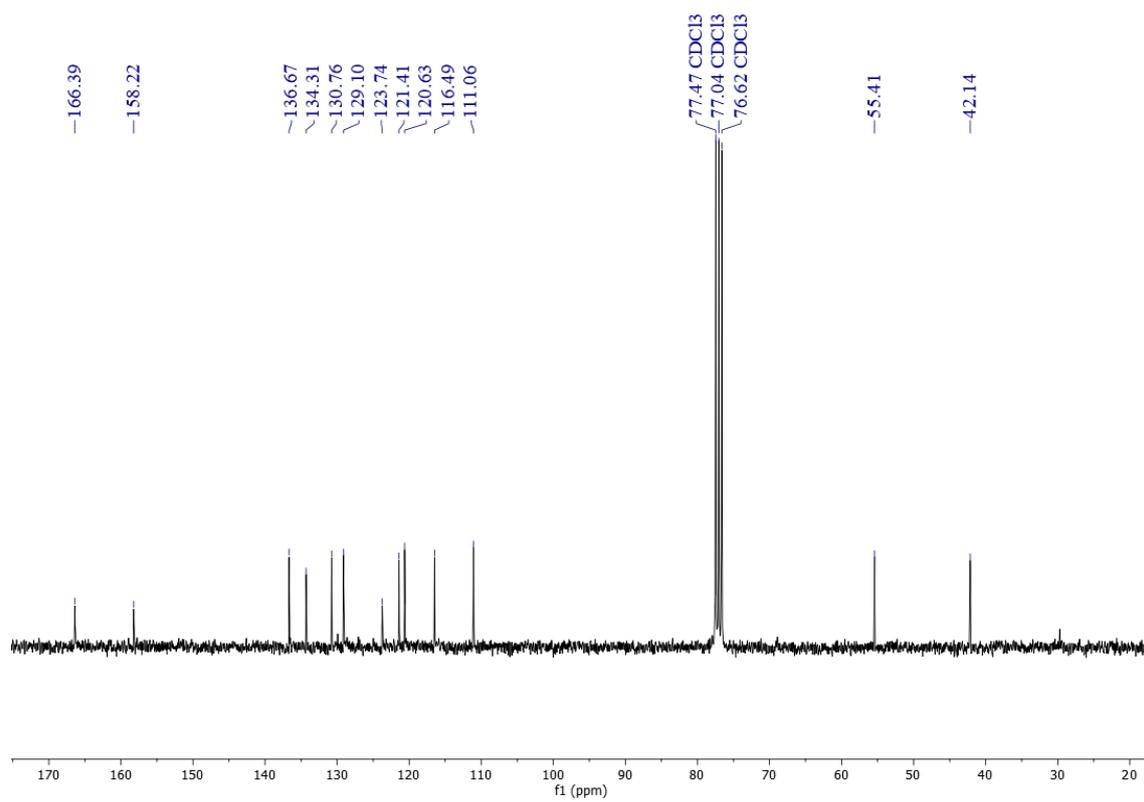


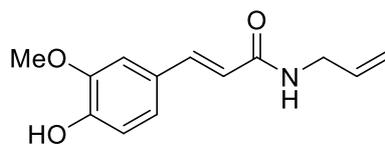




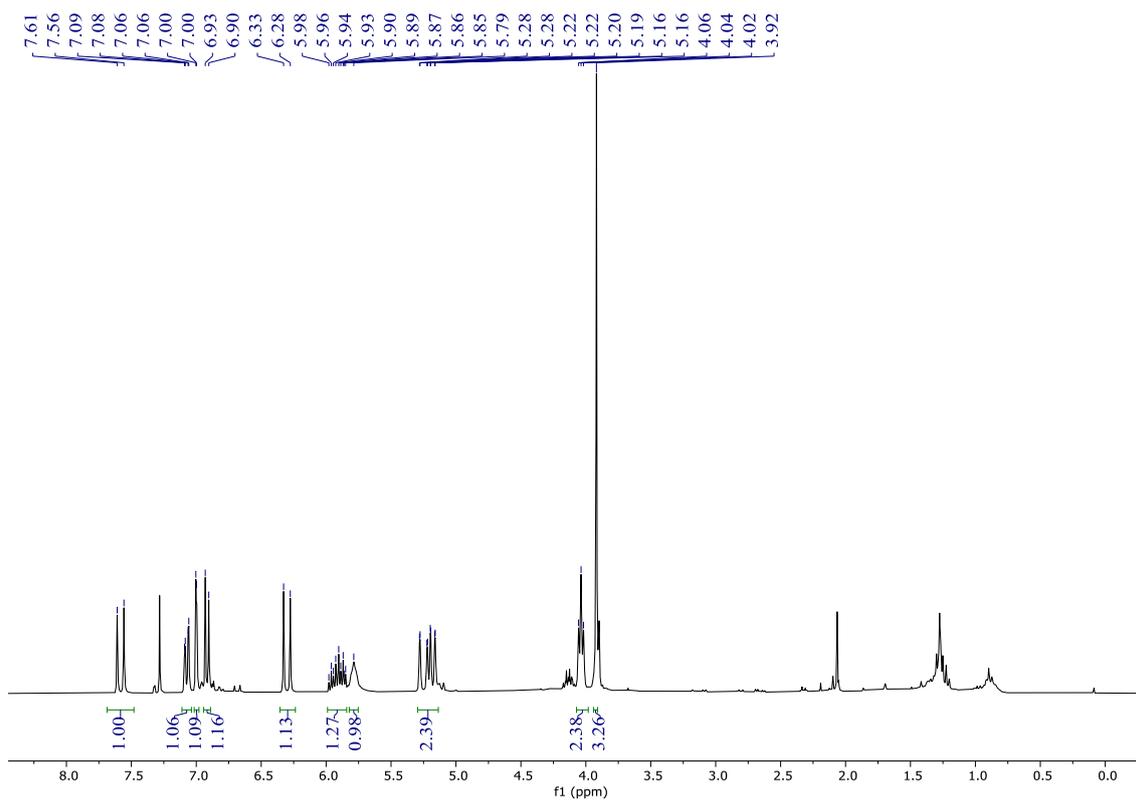
(4ca)

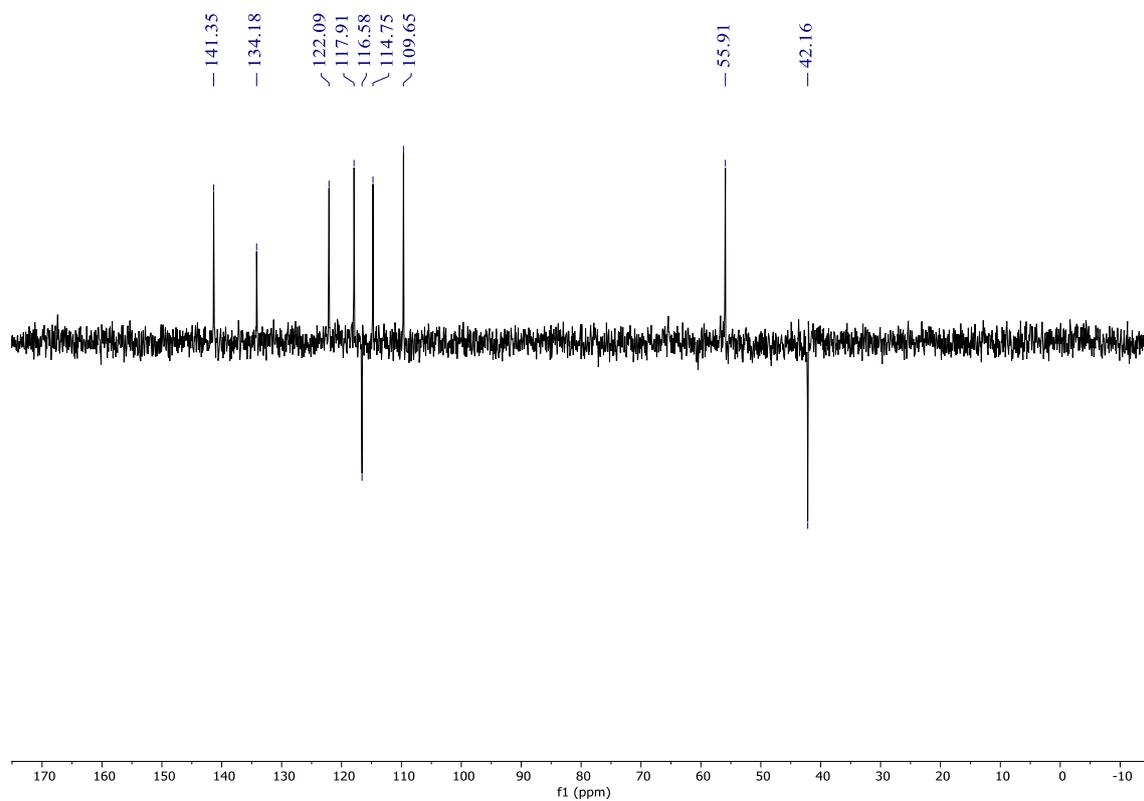
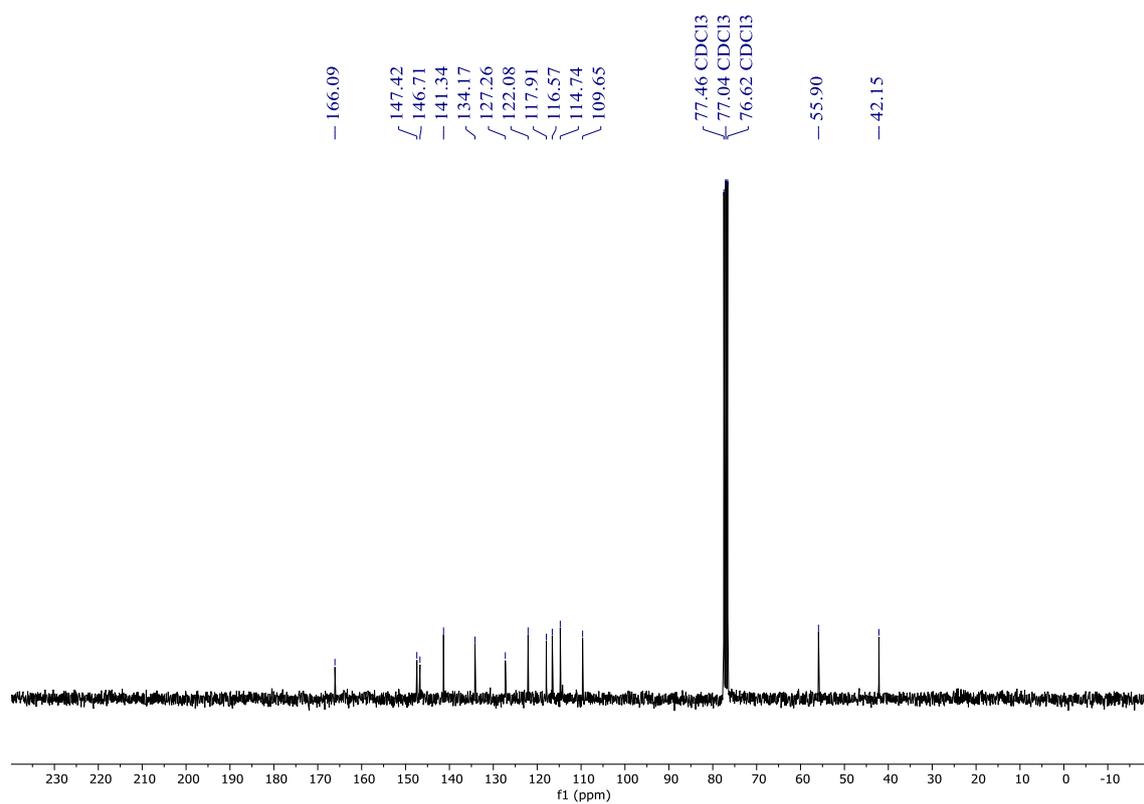


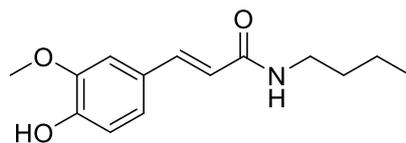
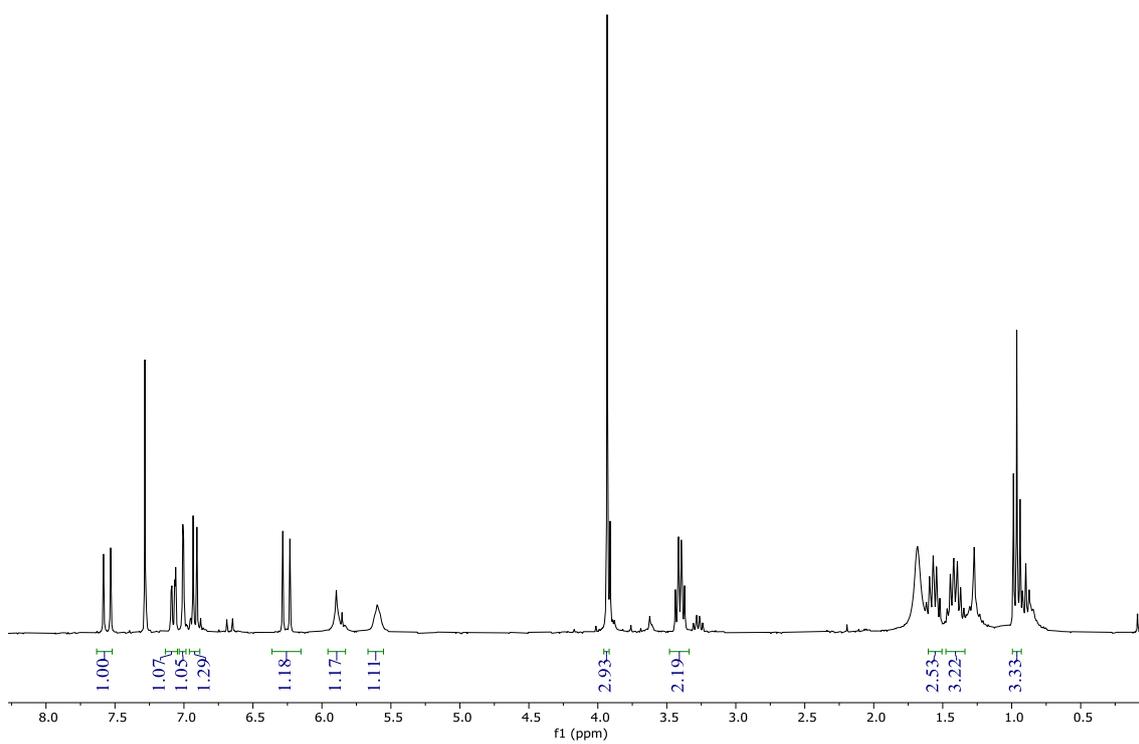


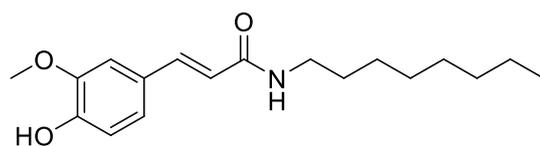


(4da)

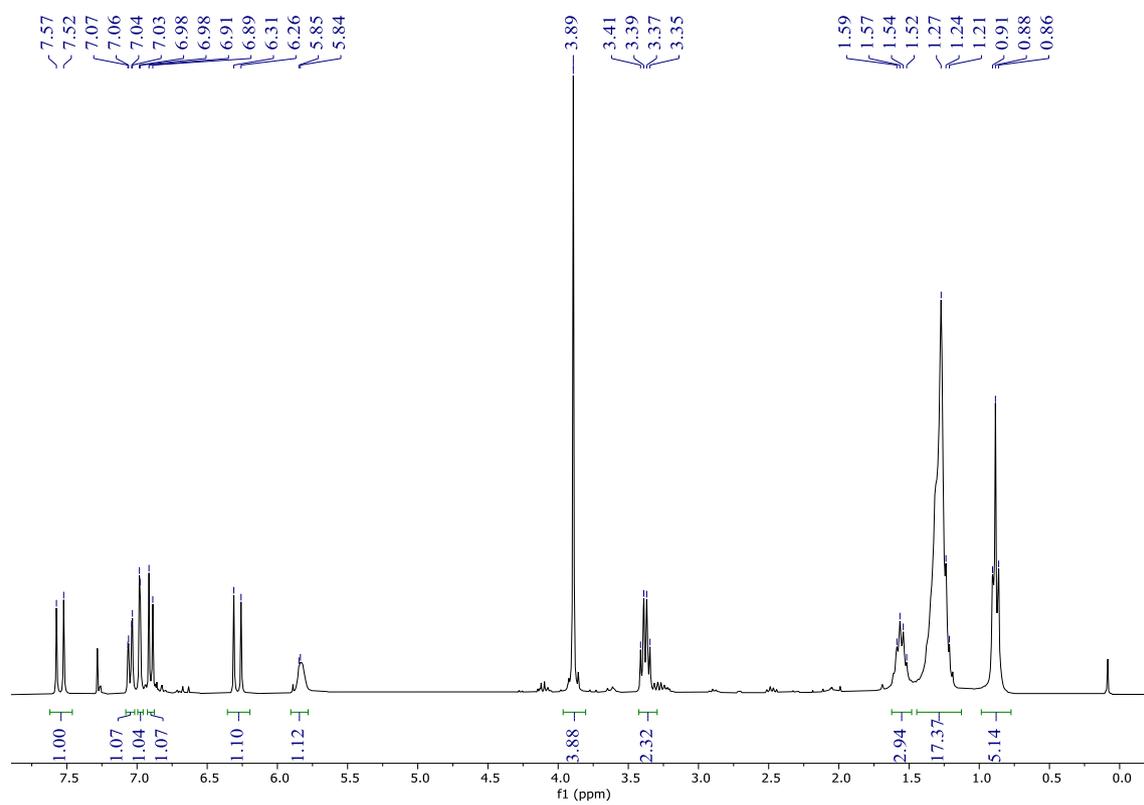


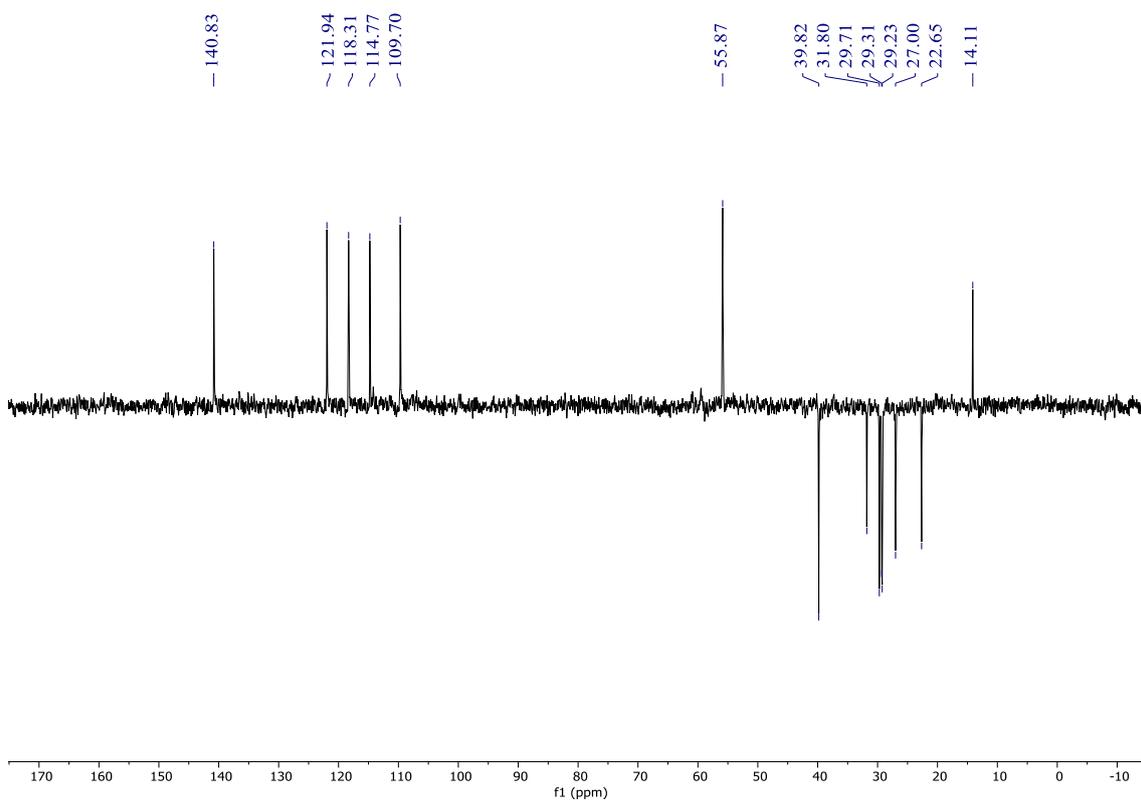
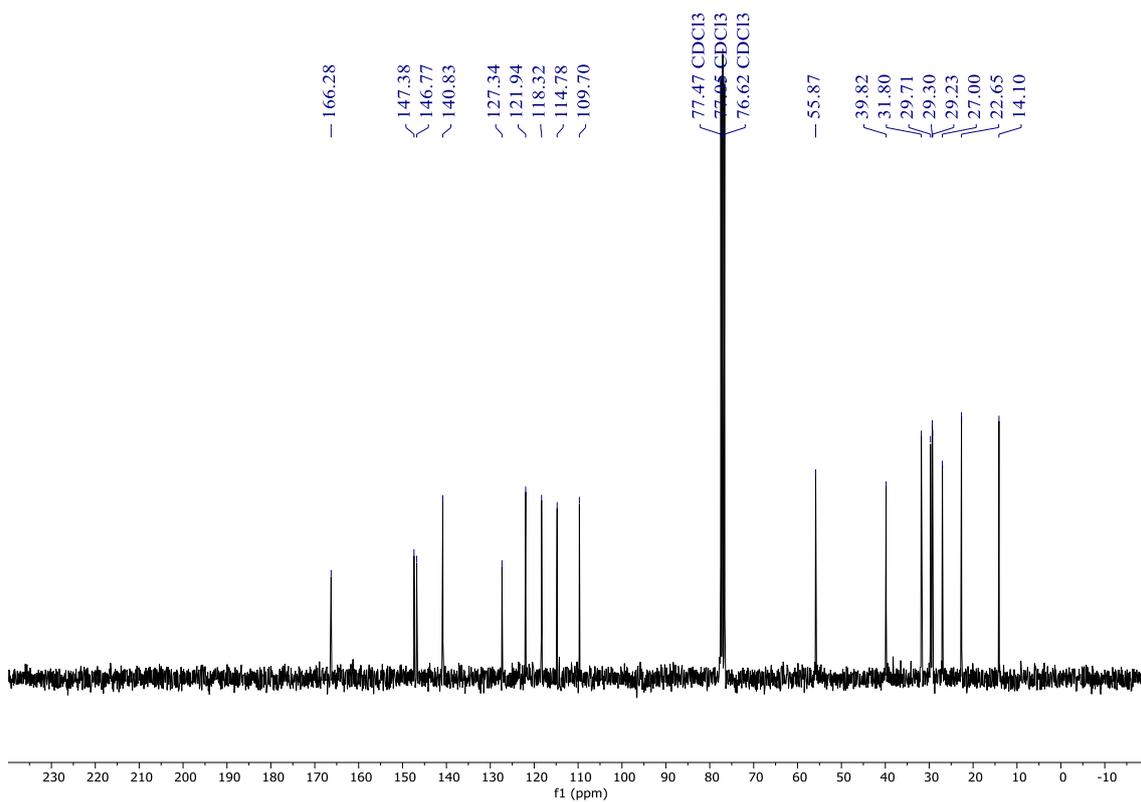


**(4b)**

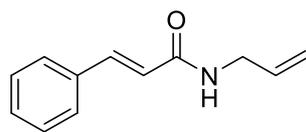


(4dd)

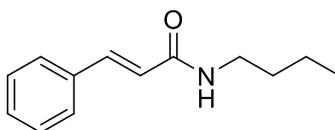
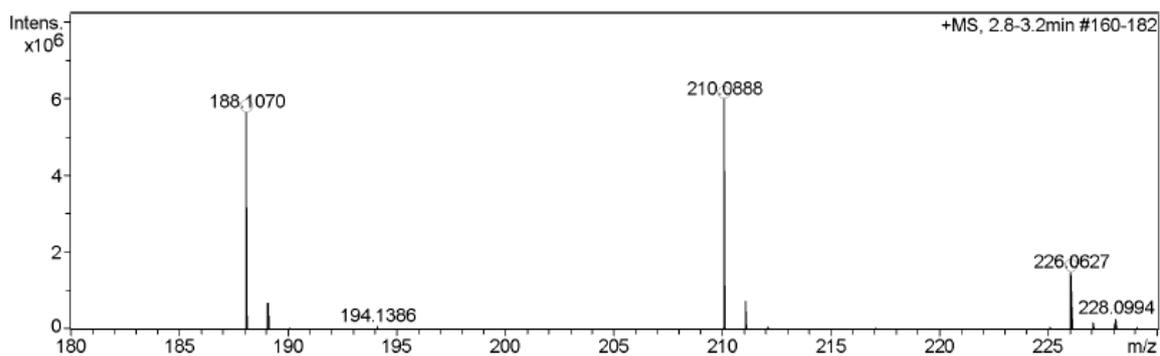




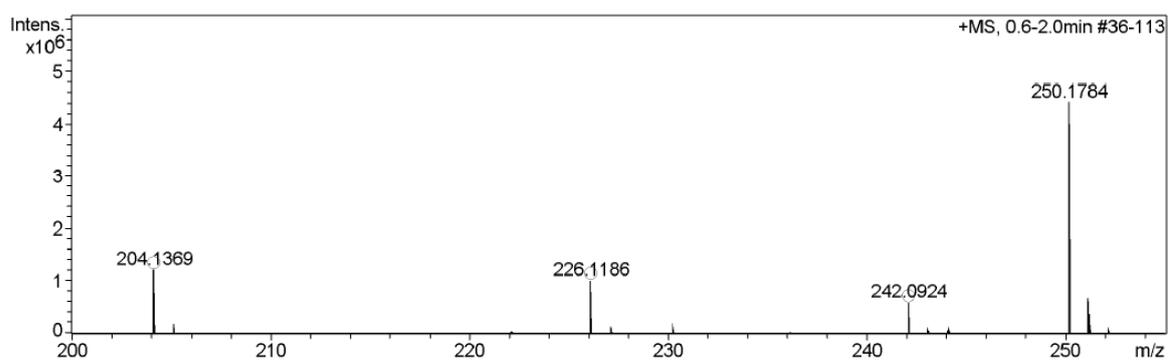
7.2. Espectros de masas

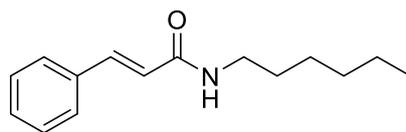
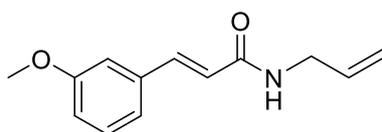
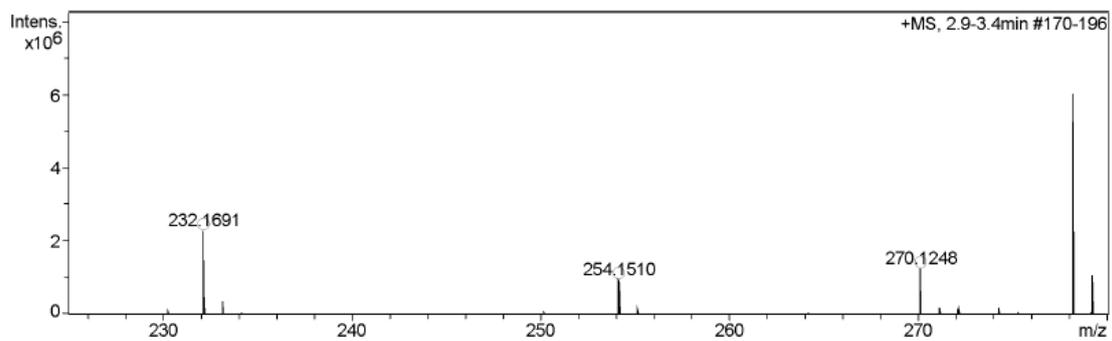
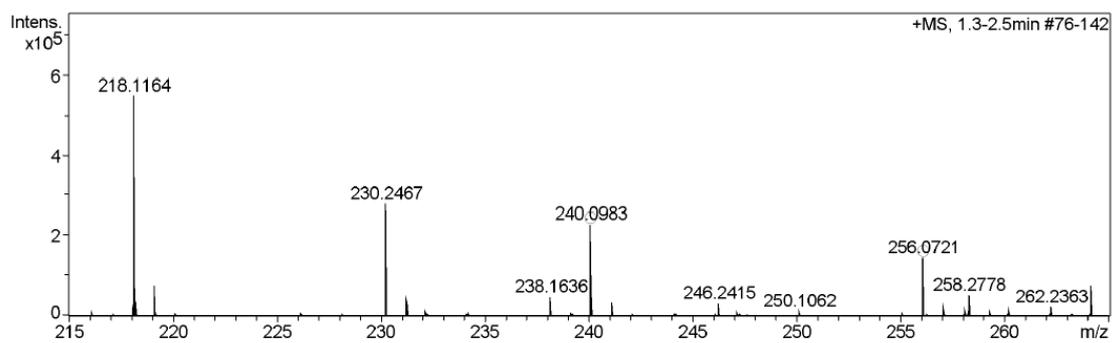


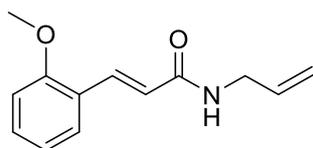
(4aa)



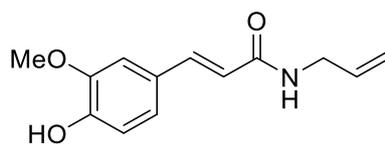
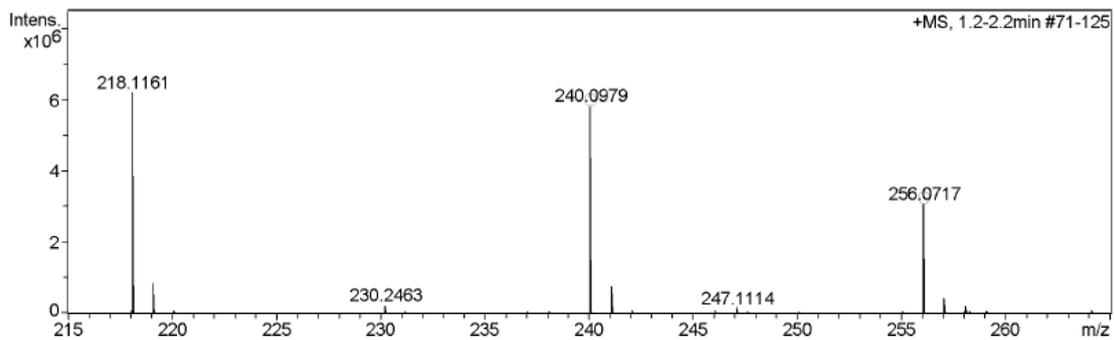
(4ab)



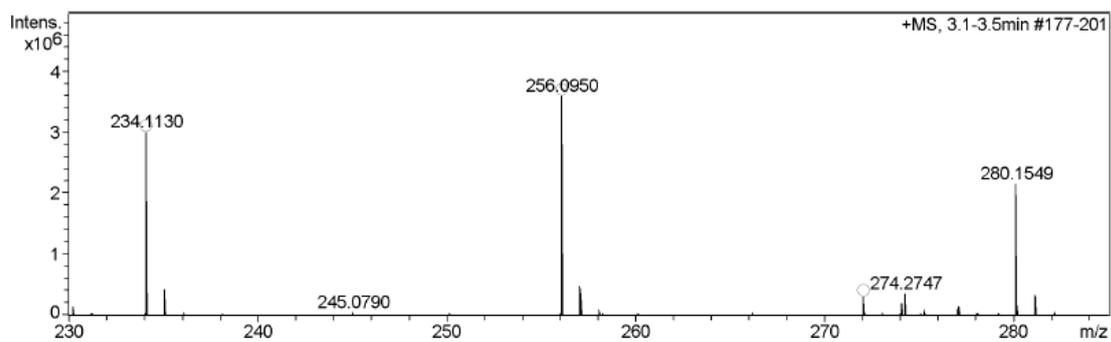
**(4ac)****(4ba)**

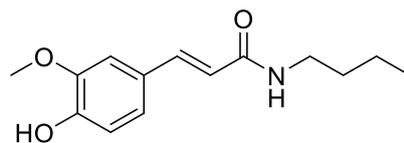
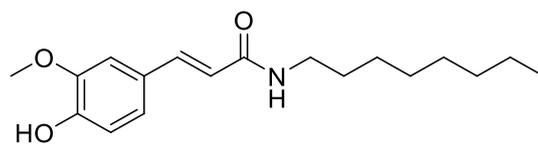
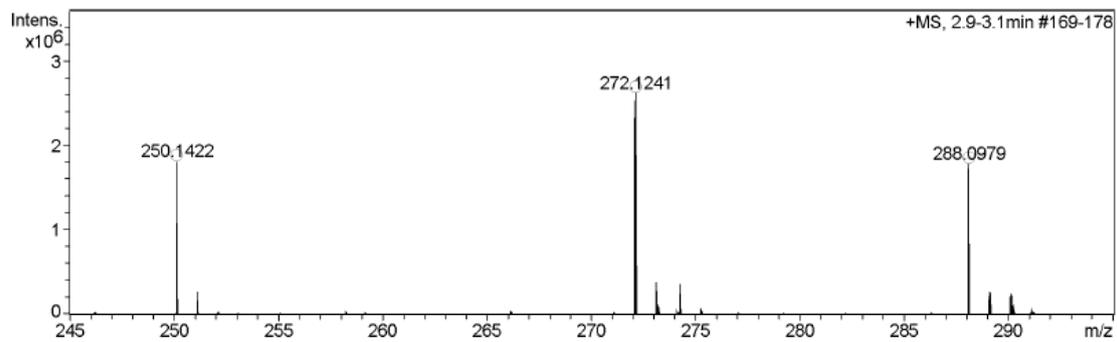
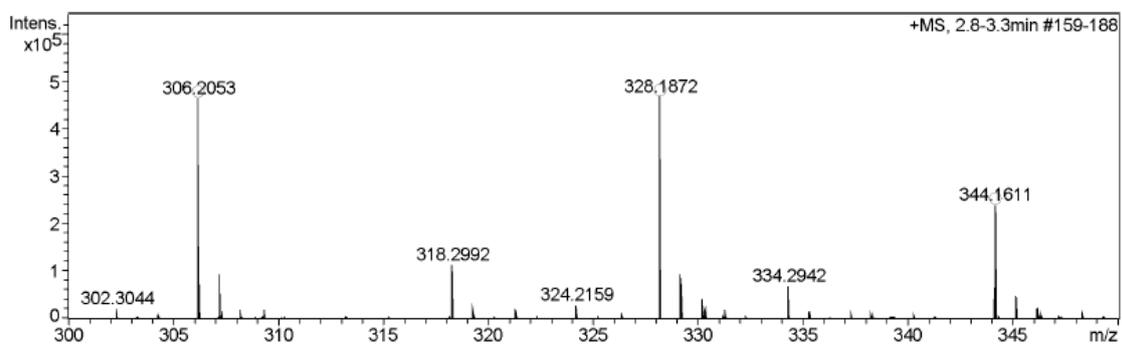


(4ca)



(4da)



**(4db)****(4dd)**

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Anastas, P.; Eghbali, N. Green Chemistry: Principles and Practice. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (1), 301-312.
2. Faber, K. *Biotransformations in Organic Chemistry. A Textbook*, 7^a Ed., Springer, Berlín (Alemania), **2017**.
3. Holtmann, D.; Hollmann, F.; Bouchaut, B. Contribution of Enzyme Catalysis to the Achievement of the United Nations' Sustainable Development Goals. *Molecules* **2023**, *28* (10), 4125.
4. Adams, J. P.; Brown, M. J. B.; Diaz-Rodriguez, A.; Lloyd, R. C.; Roiban, G. D. Biocatalysis: A Pharma Perspective. *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361* (11), 2421-2432.
5. Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. Engineering the Third Wave of Biocatalysis. *Nature* **2012**, *485* (7397), 185-194.
6. <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/> (último acceso: 26/06/2023).
7. Bornscheuer, U.T; Kazlauskas, R. J. *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*, Wiley-VCH, Weinheim (Alemania), **2005**.
8. Reyes-Reyes, A.L; Valero-Barranco, F; Sandoval, G. Recent Advances in Lipases and Their Applications in the Food and Nutraceutical Industry, *Catalysts* **2022**, *12* (9), 960.
9. Carvalho, A. C.; Fonseca, T. S.; de Mattos, M. C.; de Oliveira M. C.; de Lemos, T. L.; Molinari, F.; Romano, D.; Serra, I. Recent Advances in Lipase-Mediated Preparation of Pharmaceuticals and Their Intermediates. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (12), 29682-29716.

10. Rodrigues, R. C.; Virgen-Ortíz, J. J.; dos Santos, J. C. S.; Berenguer-Murcia, Á.; Alcantara, A. R.; Barbosa, O.; Ortiz, C.; Fernandez-Lafuente, R. Immobilization of Lipases on Hydrophobic Supports: Immobilization Mechanism, Advantages, Problems, and Solutions. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37* (5), 746-770.
11. Jaeger, K.-E.; Eggert, T. Lipases for Biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13* (4), 390-397.
12. Verger, R. 'Interfacial Activation' of Lipases: Facts and Artifacts. *Trends Biotechnol.* **1997**, *15* (1), 32-38.
13. van Rantwijk, F.; Sheldon, R. A. Enantioselective Acylation of Chiral Amines Catalysed by Serine Hydrolases. *Tetrahedron* **2004**, *60* (3), 501-519.
14. Ghanem, A.; Aboul-Enein, H. Y. Lipase-Mediated Chiral Resolution of Racemates in Organic Solvents. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15* (21), 3331-3335.
15. Lutz, S. Engineering lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15* (18), 2743-2748.
16. Kirk, O.; Wirtz-Christensen, M. Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin, *Org. Process Res. Dev.* **2002**, *6* (4), 446-451.
17. Ortiz, C.; Ferreira, M. L.; Barbosa, O.; dos Santos, J. C. S.; Rodrigues, R. C.; Berenguer-Murcia, Á.; Briand, L. E.; Fernandez-Lafuente, R. Novozym 435: the "Perfect" Lipase Immobilized Biocatalyst? *Catal. Sci. Technol.* **2019**, *9* (10), 2380-2420.
18. Gotor-Fernández, V.; Busto, E.; Gotor, V. *Candida antarctica* Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. *Adv. Synth. Catal.* **2006**, *348* (7-8), 797-812.

19. Kazlauskas, R. J.; Weissfloch, A. N. E.; Rappaport, A. T.; Cuccia, L. A. A Rule to Predict Which Enantiomer of a Secondary Alcohol Reacts Faster in Reactions Catalyzed by Cholesterol Esterase, Lipase from *Pseudomonas cepacia*, and Lipase from *Candida rugosa*. *J. Org. Chem.* **1991**, *56* (8), 2656-2665.
20. Lima, R. N.; dos Anjos, C. S.; Orozco, E. V. M.; Porto, A. L. M. Versatility of *Candida antarctica* Lipase in the Amide Bond Formation Applied in Organic Synthesis and Biotechnological Processes. *Mol. Catal.* **2019**, *466*, 75-105.
21. Ruwizhi, N.; Aderibigbe, B. A. Cinnamic Acid Derivatives and Their Biological Efficacy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (16), 5712.
22. Sova, M. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Cinnamic Acid Derivatives. *Mini-Rev. Med. Chem.* **2012**, *12* (8), 749-767.
23. Gunia-Krzyzak, A.; Sloczynska, K.; Popiol, J.; Koczurkiewicz, P.; Marona, H.; Pekala, E. Cinnamic Acid Derivatives in Cosmetics: Current Use and Future Prospects. *Int. J. Cosmet. Sci.* **2018**, *40* (4), 356-366.
24. Taofiq, O.; Gonzalez-Paramas, A. M.; Barreiro, M. F.; Ferreira, I. C. Hydroxycinnamic Acids and Their Derivatives: Cosmeceutical Significance, Challenges and Future Perspectives, a Review. *Molecules* **2017**, *22* (2), 281.
25. Galano, A.; Francisco-Marquez, M.; Alvarez-Idaboy, J. R. Mechanism and Kinetics Studies on the Antioxidant Activity of Sinapinic Acid. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13* (23), 11199-11205.
26. Kunjapur, A. M.; Prather, K. L. Microbial Engineering for Aldehyde Synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81* (6), 1892-1901.
27. Kumar, V.; Bhatt, V.; Kumar, N., Chapter 9 - Amides From Plants: Structures and Biological Importance. *Studies in Natural Products Chemistry*, **2018**; Vol. 56, pp 287-333.

28. del Río, J. C.; Rencoret, J.; Gutiérrez, A.; Elder, T.; Kim, H.; Ralph, J. Lignin Monomers from beyond the Canonical Monolignol Biosynthetic Pathway: Another Brick in the Wall. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2020**, *8* (13), 4997-5012.
29. Kashyap, A.; Jimenez-Jimenez, A. L.; Zhang, W.; Capellades, M.; Srinivasan, S.; Laromaine, A.; Serra, O.; Figueras, M.; Rencoret, J.; Gutierrez, A.; Valls, M.; Coll, N. S. Induced Ligno-Suberin Vascular Coating and Tyramine-Derived Hydroxycinnamic Acid Amides Restrict *Ralstonia solanacearum* Colonization in Resistant Tomato. *New Phytol.* **2022**, *234* (4), 1411-1429.
30. Song, Y.; Mei, T.; Liu, Y.; Kong, S.; Zhang, J.; Xie, M.; Ou, S.; Liang, M.; Wang, Q. Metabolites Identification of Chemical Constituents From the Eggplant (*Solanum melongena* L.) Calyx in Rats by UPLC/ESI/qTOF-MS Analysis and Their Cytotoxic Activities. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 655008.
31. Taussat, A.; de Figueiredo, R. M.; Campagne, J.-M. Direct Catalytic Amidations from Carboxylic Acid and Ester Derivatives: A Review. *Catalysts* **2023**, *13* (2), 366.
32. Morais, G. R.; Watanabe, M.; Tanaka, Y.; Thiemann, T. Simple Amidation of Unprotected Phenol-Containing 2-Alkenoic Acids. *J. Chem. Res.* **2005**, *2005* (12), 802-807.
33. Bernal, F. A.; Gerhards, M.; Kaiser, M.; Wunsch, B.; Schmidt, T. J., (+/-)-*trans*-2-Phenyl-2,3-Dihydrobenzofurans As Leishmanicidal Agents: Synthesis, In Vitro Evaluation And SAR Analysis. *Eur J Med Chem* **2020**, *205*, 112493.
34. Xing, X.; Ho, P.; Bourquin, G.; Yeh, L.-A.; Cuny, G. D. Synthesis, Stereochemistry Confirmation and Biological Activity Evaluation of a Constituent from *Isodon excisus*. *Tetrahedron* **2003**, *59* (50), 9961-9969.

-
35. Garg, P.; Milton, M. D. Sodium Carbonate Mediated Regioselective Synthesis of Novel N-(Hydroxyalkyl)cinnamamides. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54* (51), 7074-7077.
36. Dufrenoy, P.; Charlet, R.; Hechelski, M.; Daich, A.; Waterlot, C.; Jawhara, S.; Ghinet, A. New Efficient Eco-Friendly Supported Catalysts for the Synthesis of Amides with Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties. *ChemMedChem* **2020**, *15* (5), 459-467.
37. Zeng, F.; Zhang, H.; Xu, M.; Huang, K.; Zhang, T.; Duan, J. Immobilized Lipase Catalytic Synthesis of Phenolamides and their Potential against alpha-Glucosidase. *J. Biotechnol.* **2021**, *334*, 51-57.
38. Alrub, M. A.; Basri, M.; Malek, E. A.; Alang Ahmad, S. A.; Salleh, A. B.; Abdul Rahman, M. B. Lipase Catalysed Synthesis of N-*trans*-Feruloyltyramine and a Quantitative HPLC-UV Method for Analysis. *Biocatal. Biotransform.* **2012**, *30* (4), 385-390.
39. Du, L.; Zheng, L.; Pan, Y.; Sheng, Z.; Zhang, S.; Lin, H.; Zhang, A.; Xie, H.; Luo, X. Highly Efficient Synthesis of Cinnamamides from Methyl Cinnamates and Phenylethylamines Catalyzed by Lipozyme® TL IM under Continuous-Flow Microreactors. *Catalysts* **2022**, *12* (10), 1265.
40. Sánchez, V.; Rebolledo, F.; Gotor, V. Highly Efficient Enzymatic Ammonolysis of α , β -Unsaturated Esters. *Synlett* **1994**, (7), 529-530.
41. Suárez-Escobedo, L.; Gotor-Fernández, V. Solvent Role in the Lipase-Catalysed Esterification of Cinnamic Acid and Derivatives. Optimisation of the Biotransformation Conditions. *Tetrahedron* **2021**, *81*, 131873.

42. Gotor-Fernández, V.; Gotor, V. Enzymatic Aminolysis and Ammonolysis Processes in the Preparation of Chiral Nitrogenated Compounds. *Curr. Org. Chem.* **2006**, *10* (10), 1125-1143.
43. de Gonzalo, G.; Alcántara, A. R.; Domínguez de María, P. Cyclopentyl Methyl Ether (CPME): A Versatile Eco-Friendly Solvent for Applications in Biotechnology and Biorefineries. *ChemSusChem* **2019**, *12* (10), 2083-2097.
44. Lavandera, I.; Fernández, S.; Ferrero, M.; Gotor, V. First Regioselective Enzymatic Acylation of Amino Groups Applied to Pyrimidine 3',5'-Diaminonucleoside Derivatives. Improved Synthesis of Pyrimidine 3',5'-Diamino-2',3',5'-trideoxynucleosides. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (11), 4079-4082.
45. Theil, F. Enhancement of Selectivity and Reactivity of Lipases by Additives. *Tetrahedron* **1999**, *56* (19), 2905-2919.