



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

TÍTULO:

SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE L-TEANINA

Asesor interno: Dr. Héctor Manuel Luna Contla 6252

Asesora Interna: Dra. Liliana Hernández Vázquez 27790

Alumno: Ángel Enrique Hernández Guerrero

Matrícula: 2202035409

Fecha de inicio: 08 de febrero del 2024

Fecha de inicio: 08 de agosto del 2024

Vo. Bo. de los asesores.

Dr. Héctor Manuel Luna Contla.

Dra. Liliana Hernández Vázquez.

1. RESUMEN	4
2. INTRODUCCIÓN	5
3. MARCO TEÓRICO	6
3.1 Biosíntesis.	7
3.2 Biocatálisis.	8
4. OBJETIVOS DEL PROYECTO	10
4.1 OBJETIVO GENERAL	10
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS O PARTICULARES	10
5. METODOLOGÍA UTILIZADA	11
5.1.1 Obtención de L-Teanina de referencia.	11
5.1.2 Cromatografía en capa fina (TLC) de Tabletas Mem-eh contra L-triptófano.	11
5.1.3 Preparación del 1er biocatalizador de polvo acetónico de hígado de pollo (LAP).	12
5.4 Síntesis enzimática de L-teanina catalizada con LAP	12
5.5 Filtración y seguimiento de la 1ª síntesis enzimática catalizada con LAP	13
5.6 Cromatografía en columna de sílica gel de la primera reacción catalizada con LAP.	13
5.7 2ª obtención de L-Teanina de referencia.	14
5.8 2ª síntesis enzimática de L-teanina c/ Ác L-glutámico y LAP	14
5.9 Síntesis enzimática de L-teanina utilizando Ac. L-glutámico catalizada con brotes de chícharo.	14
5.10 Síntesis enzimática de L-teanina utilizando Ac. L-glutámico catalizada con la raíz de brotes de chícharo.	15
5.12 Cromatografía en columna de sílica gel de la reacción de L-teanina c/ Ác L-glutámico y LAP	16
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
6.2 Cromatografía en capa fina (TLC) de L-triptófano/L-teanina contra L-triptófano.	17

6.3 Preparación del biocatalizador de polvo acetónico de hígado de pollo (LAP).	18
6.4 Síntesis enzimática de L-teanina catalizada con LAP.	18
6.5 Filtración y seguimiento de la 1ª síntesis enzimática catalizada con LAP.	20
6.6 Cromatografía en columna de sílica gel de la primera reacción catalizada con LAP.	21
6.7 2ª obtención de L-Teanina de referencia.	22
6.8 2ª Síntesis enzimática de L-teanina c/ Ác L-glutámico y LAP.	22
6.9 Síntesis enzimática de L-teanina utilizando Ac. L-glutámico catalizada con brotes de chícharo.	24
6.10 Síntesis enzimática de L-teanina utilizando Ac. L-glutámico catalizada con la raíz de los brotes de chícharo.	25
6.11 Reacciones blanco con LAP y sin LAP.	26
6.12 Cromatografía en columna de sílica gel de la reacción de L-teanina c/ Ác L-glutámico y LAP.	27
7. CONCLUSIONES	31
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1.RESUMEN

La industria farmacéutica está en constante búsqueda de métodos eficientes y sostenibles para la síntesis de moléculas innovadoras. La L-teanina, es un aminoácido no proteico, presente en las plantas del té (*Camellia sinensis*), ha generado un interés significativo en la industria farmacéutica debido a sus propiedades ansiolíticas, neuroprotectoras y promotoras de las funciones cognitivas en el ser humano. La síntesis de este compuesto no se genera por los métodos sintéticos tradicionales, sino a través de la biocatálisis. En este trabajo se busca estudiar reacciones enzimáticas utilizando Polvo Acetónico de Hígado de Pollo (LAP's, por sus siglas en inglés), Brotes de chícharo y Raíz de brotes de chícharo como biocatalizadores de fácil acceso para efectuar la síntesis de L-teanina. Durante la experimentación se demostró que con las 3 rutas propuestas no se logró la síntesis de L-teanina a pesar de las variaciones en las condiciones de reacción consideradas. Sin embargo, se logró establecer un método de extracción y purificación de L-teanina que sirvió para la obtención de dos muestras de referencia de diferentes marcas comerciales (*Biomiral*[®] y *Anáhuac*[®]) el cual es efectivo sin importar si la tableta es compuesta o no. También, se logró establecer una metodología de identificación y análisis comparativo usando Cromatografía en Capa Fina (TLC) y separación de compuestos a través de la Cromatografía en columna. Adicionalmente, se evaluaron las reacciones obtenidas a través del análisis por Resonancia Magnética Nuclear 1H (NMR-1H), dondó el análisis de los espectros obtenidos permitió demostrar que la síntesis no ocurrió. Además, se evidenció que compuestos como la Etilamina utilizada como reactivo era susceptible a evaporación a temperaturas superiores a los 20 °C, que la L-Teanina de referencia extraída de cada una de las dos tabletas comerciales (*Biomiral*[®] y *Anáhuac*[®]) eran susceptibles a degradarse con el tiempo, a pesar de modificarse sus condiciones de almacenamiento. Finalmente, el presente proyecto permitió establecer un marco experimental para la síntesis de L-teanina, proporcionando evidencias que servirán de referencia para nuevas líneas de investigación que pretendan incurrir en la síntesis enzimática de L-teanina utilizando biocatalizadores de fácil acceso.

2.INTRODUCCIÓN

En la industria farmacéutica, la constante búsqueda de métodos eficientes y sostenibles para la síntesis de moléculas innovadoras ha desarrollado un creciente interés en la aplicación de enzimas como herramientas catalíticas empleadas en reacciones sintéticas. Así, la L-teanina, un aminoácido no proteico presente en las plantas del té, ha generado un interés significativo dentro de la industria farmacéutica debido a sus efectos positivos en la salud del ser humano, dentro de los cuales se encuentran propiedades ansiolíticas, neuroprotectoras y promotoras de las funciones cognitivas.

Sin embargo, la forma más común de obtener la L-teanina es a través de dos procesos, en primer lugar, la extracción de las hojas de té (*Camellia sinensis*) esto implica que el proceso de obtención se vuelva costoso, la explotación de los recursos naturales, así como la pureza y el rendimiento del producto final se ven comprometidos. En segundo lugar, los métodos convencionales de síntesis están asociados con desafíos ambientales y económicos, pues las rutas sintéticas generan productos secundarios o se obtienen productos compuestos por mezclas racémicas, los cuales requieren un tratamiento especial para aislar el producto de interés. En este contexto, el uso de enzimas como biocatalizadores emerge como una herramienta alternativa que pueda emplearse dentro de las rutas sintéticas, brindando estereoselectividad y sostenibilidad en la producción de L-teanina.

La síntesis enzimática de L-teanina emplea enzimas que catalizan la unión entre sus dos precursores, L-glutamina y etilamina, para dar lugar a la formación de L-teanina a través de un proceso conocido como “transaminación”, la cual es la ruta biosintética que emplean las plantas de té para sintetizar la L-teanina en sus raíces. Así, la selección de las enzimas y el establecimiento de las condiciones de reacción son aspectos fundamentales para lograr una síntesis eficiente de L-teanina.

Debido a esto, la síntesis de L-teanina actualmente no se realiza por métodos sintéticos tradicionales, sino a través de *biocatálisis* partiendo de los mismos precursores que se emplean para la síntesis como ocurre en *C. sinensis* los

cuales pueden hacerse reaccionar a través de varios biocatalizadores, por ejemplo, en 1998 se reportó el uso de glutaminasa para la obtención de este compuesto (Tachiki *et. al.*, 1998), en 2005 se documentó el uso de glutamina sintetasa (Yamamoto, 2005) y en 1964 se reportó el uso de polvos acetónicos de hígado de pichón (LAPs) (Sasaoka *et. al.*, 1964).

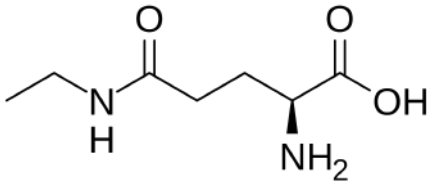
En este trabajo se busca explorar la síntesis enzimática de L-teanina, examinando diversas rutas enzimáticas con la posibilidad de diseñar rutas sintéticas que involucren el uso de varias enzimas, lo cual permitirá obtener diferentes rendimientos. Esto nos permitirá evaluar las limitaciones y examinar la viabilidad de implementarlas a un proceso industrial en base al rendimiento obtenido. Así, la selección de las enzimas y el establecimiento de las condiciones de reacción son aspectos fundamentales para lograr una síntesis eficiente de L-teanina. De esta manera, el éxito de este proyecto de investigación ofrece nuevas perspectivas a la producción sostenible de L-teanina, con una potencial aplicación dentro de la industria farmacéutica.

3. MARCO TEÓRICO

La Teanina (ver tabla 1) es un aminoácido no proteico que se encuentra de forma natural en las hojas del té (*Camellia sinensis*). Este compuesto comúnmente se encuentra en las infusiones de té negro, té blanco y principalmente en el té verde (Unno *et.al.*, 1999). Además de aportar el sabor *umami* característico a las infusiones de té (Sakato, Y. 2008). En su estructura química (ver figura 1) contiene un centro quiral, según Desai (2013), el enantiómero D presenta propiedades farmacocinéticas y metabólicas diferentes a las presentes en el enantiómero L, además de que demostró, a través de pruebas en modelos murinos, que al administrarse una mezcla racémica se inhibe la absorción de teanina, esto ocasionó un aumento en los niveles en plasma de etilamina debido a la degradación metabólica de la molécula. También, observaron que al administrarse por sí solos cada uno de los enantiómeros, la L-teanina presenta una mayor absorción en el intestino en comparación con la D-teanina. Es por esto que Desai *et. al.*, (2005) concluyeron que es evidente que en el metabolismo existe una absorción estereoselectiva y que la actividad farmacológica de la

administración de D-teanina y mezclas racémicas son desconocidas. Debido a esto, el interés farmacológico de la teanina se centra en la administración del enantiómero L, pues ha demostrado tener diversas propiedades benéficas en el organismo humano; Según Siamwala (2013) ayuda a proteger la función cardiovascular al promover la producción de óxido nítrico, un compuesto regulador de las funciones vasculares en las células del endotelio. En 2009, Liu *et. al.*, demostraron un efecto reductor en el crecimiento *in vitro* y *ex vitro* de líneas celulares de cáncer de pulmón. Según Kanarek *et. al.* (2011) la ingesta de este compuesto mitigaba las respuestas al estrés. En 2010, Takagi *et. al.*, a través del uso de modelos murinos demostraron que la administración combinada de L-teanina con L-cisteína mejoraba la producción de anticuerpos IgG específicos del virus de la gripe a través del aumento de la síntesis de glutatión (GSH), lo que promueve la eficacia de la respuesta inmune.

Tabla 1. Información general de la L-teanina.

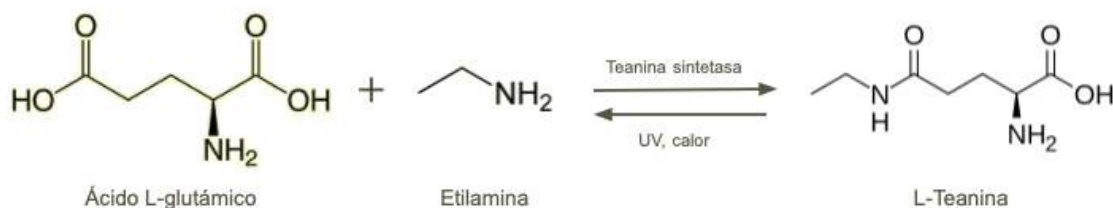
 <p>Figura 1. Estructura química de la L-Teanina.</p>	Nomenclatura IUPAC	ácido 2-amino-4-(etilcarbamoil) butírico.
	Número CAS	3081-61.6
	Fórmula molecular	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃
	Peso molecular	174.20 g/mol.
	Punto de fusión	117 °C (243 °F).
	Solubilidad	Soluble en agua. Insoluble en etanol, metanol, cloroformo y éter.
	Apariencia	Polvo cristalino blanco
	Rotación óptica	+7.5° a +8.5°

3.1 Biosíntesis.

En *C. sinensis* la síntesis de L-teanina ocurre principalmente en las raíces, donde posteriormente es translocada hasta las hojas (Deng, 2008). Los precursores empleados son el ácido l-glutámico y la etilamina, este último es producido a partir de la alanina a través de la actividad de la alanina descarboxilasa. Finalmente, la

L-teanina es formada a partir de la ligadura de estos precursores por la teanina sintetasa (ver figura 2).

Figura 2. Biosíntesis general de la L-teanina.



Además, la L-Teanina puede ser degradada de vuelta a sus precursores nuevamente, pero esto ocurre solamente una vez que se encuentra en las hojas de *C.sinensis*, donde se hidroliza a través de la exposición a la luz solar y al calor (Chu, 1997). Debido a esto las concentraciones de teanina en las hojas de té pueden variar dependiendo de las condiciones climáticas a las que haya estado expuesta la planta.

3.2 Biocatálisis.


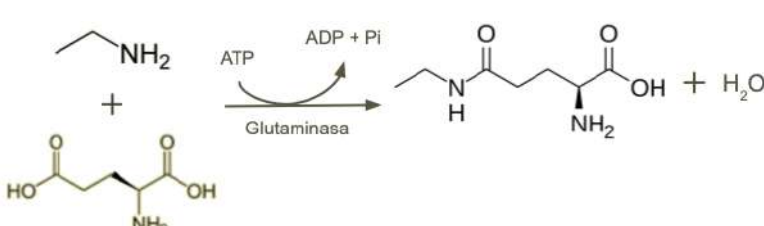
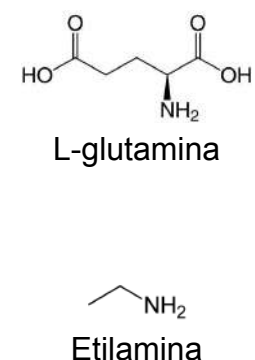
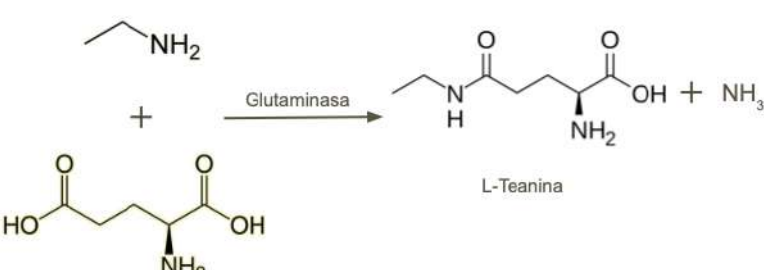
La L-teanina puede sintetizarse teóricamente a base de ácido L-glutámico y etilamina, precursores por los cuales se biosintetiza en *C. sinensis*. Sin embargo, la primera síntesis orgánica se realizó a partir de ácido pirrolidona-5-carboxílico y una solución del 33% v/v de etilamina acuosa en condiciones de 37 °C, obteniendo un rendimiento del 9% de γ -etilamida de ácido glutámico (nomenclatura que se le asignó antes de ser denominada popularmente como L-teanina) (Lichtenstein, 1942). En años recientes, se han propuesto más rutas sintéticas para la obtención de este compuesto con mejores rendimientos, pero implican diversas desventajas como un elevado costo, la obtención de mezclas racémicas entre sus dos enantiómeros, L-teanina y D-teanina y metodologías para el aislamiento de la L-teanina costosas y con generación de productos secundarios nocivos.

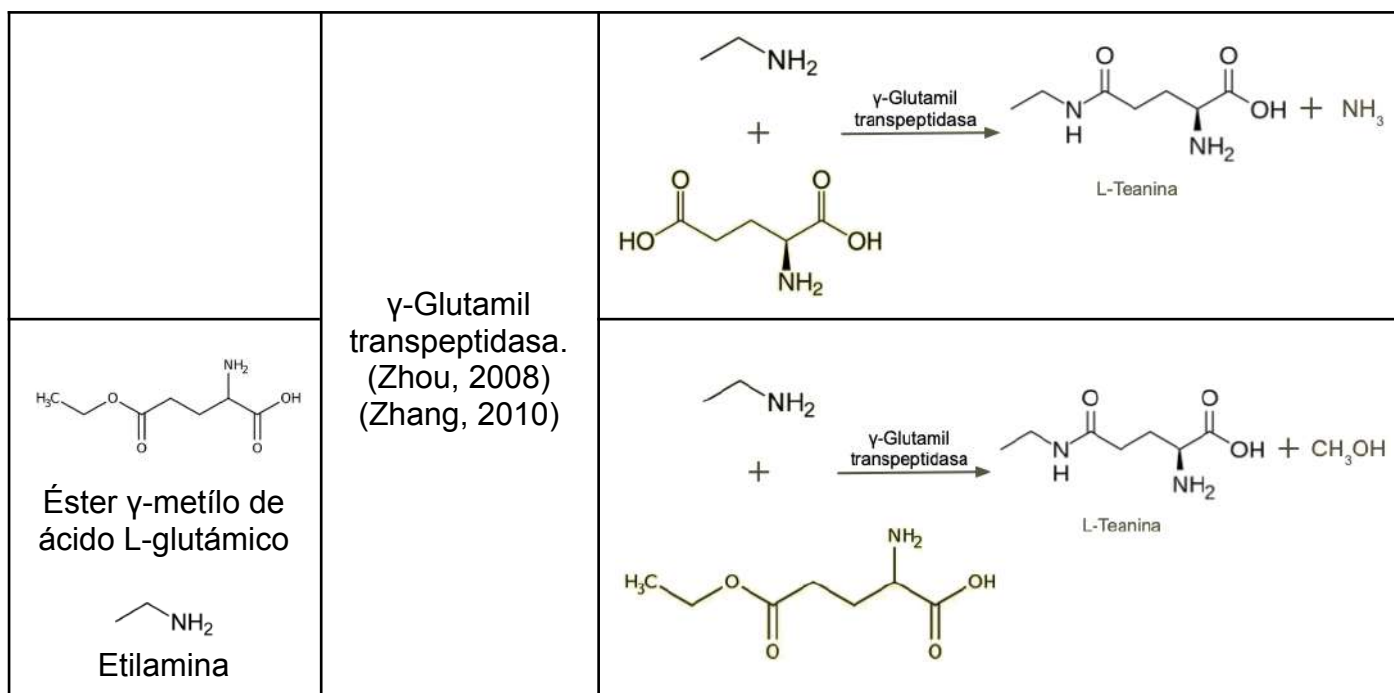
Debido a esto, la síntesis de L-teanina actualmente no se realiza por métodos sintéticos tradicionales, sino a través de *biocatálisis* que, por definición, se refiere al uso de células o enzimas aisladas que funcionan como catalizadores en reacciones orgánicas aplicadas a la obtención de un compuesto de interés

(Arroyo, 2014). Cuando se propone una ruta sintética para la obtención de L-teanina, se comienza con los mismos precursores (ver figura 2) que se emplean para la biosíntesis que ocurre en *C. sinensis*, las rutas propuesta (ver tabla 2) incluyen en uso de enzimas presentes en bacterias capaces de catalizar dicha reacción. Sin embargo, la obtención de enzimas que sirvan como catalizadores de reacciones no solo son obtenidas exclusivamente de bacterias, sino también se ha reportado en la literatura que pueden provenir de polvos alcohólicos de hígado de caballo (Jakovac, 1982), polvos acetónicos de hígado de pichón (Sasaoka, 1964), polvo de hígado de rata y cerdo (Porter, 1979).

En general, se puede observar que el uso de estos órganos provenientes de mamíferos puede ser empleado como una fuente de enzimas para biocatálisis debido a su alto contenido de enzimas, en la Tabla 2 se mencionan algunas de las enzimas presentes en los órganos más empleados en esta técnica.

Tabla 2. Biosíntesis de L-teanina empleando enzimas bacterianas.

Reactivos	Enzima	Reacción
 <p>Ácido L-glutámico</p> <p>Etilamina</p>	<p>Glutamina sintetasa. (Yamamoto, 2005)</p>	
 <p>L-glutamina</p> <p>Etilamina</p>	<p>Glutaminasa. (Tachiki, 1998)</p>	 <p>L-Teanina</p>



4. OBJETIVOS DEL PROYECTO

4.1 OBJETIVO GENERAL

- 3.1.1 Estudiar reacciones enzimáticas utilizando biocatalizadores de fácil acceso para efectuar la síntesis de L-Teanina.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS O PARTICULARES

- 3.2.1 Realizar una búsqueda bibliográfica acerca de las metodologías donde se utilicen biocatalizadores para la síntesis de L-teanina.
- 3.2.2 Aislar y purificar la L-teanina de una fuente comercial para utilizarla como referencia.
- 3.2.3 Elaborar un modelo experimental que permita la obtención de L-teanina biocatalizada a partir del L-glutamina y etilamina utilizando biocatalizadores de fácil acceso.

- 3.2.4 Comparar el producto obtenido de la biocatálisis con el aislado a partir de una fuente comercial haciendo uso de la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

5. METODOLOGÍA UTILIZADA

5.1.1 Obtención de L-Teanina de referencia.

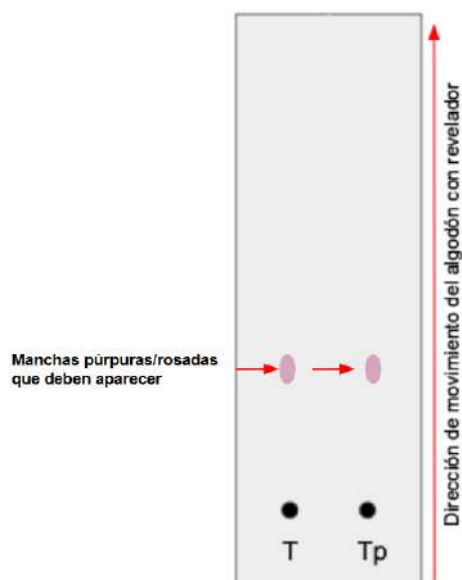
Se molieron 2 tabletas de L-triptófano/L-teanina (*mem-eh*, biomiral[®]) de 800 mg cada una, se disolvieron en un matraz bola con 40 ml de EtOH. La mezcla se sometió a un baño de aceite a 40 °C durante 24 horas con agitación moderada. Transcurrido el tiempo, se filtró al vacío durante 15 minutos y se dejó secar el EtOH durante 24 horas a temperatura ambiente dentro de una campana de extracción. Al día siguiente, el EtOH no se había evaporado, por lo que se procedió a evaporar en un rotavapor.

5.1.2 Cromatografía en capa fina (TLC) de Tabletadas *Mem-eh* contra L-triptófano.

Para identificar la marca característica de la L-teanina se empleó L-triptófano (Sigma-Aldrich) como referencia para identificar cuál de las marcas era la correspondiente a la teanina contenida en el polvo obtenido, la fase móvil de la cámara cromatográfica se preparó según las siguientes proporciones 1-BuOH/acetona/ác. acético/H₂O (7:7:2:4) respectivamente. Se utilizaron placas de sílica gel para TLC (Merck) de 1.5 cm x 6.5 cm de dimensiones. Las muestras se prepararon diluyendo un poco del polvo extraído en EtOH, su baja solubilidad requirió de calentar el EtOH para una mejor solubilización. El L-triptófano de referencia se intentó diluir en H₂O, sin embargo aunque se calentó esto no fue posible, en su lugar se sustituyó por n-BuOH caliente para diluirse (rápida cristalización). Para el revelado de la placa se preparó una solución según Feldheim *et. al.* en 1986 con las proporciones de Ninhidrina 97%/MeOH (2:1) respectivamente. La aplicación de la solución reveladora sobre la cromatoplaque se modificó de la referencia original, en su lugar se utilizó un trozo de algodón, el cual se impregnó de la solución y se hizo pasar sobre la placa partiendo desde su

base, procurando mojar bien la placa en un solo intento como se muestra en la figura 3. La placa se reveló con ayuda de una parrilla caliente sobre la cual se dejó la cromatoplaca hasta que revelara manchas púrpuras/rosadas.

Figura 3. Aplicación del revelador sobre placa.



5.1.3 Preparación del 1er biocatalizador de polvo acetónico de hígado de pollo (LAP).

Se emplearon 2 hígados de pollo, los cuales fueron obtenidos de un mercado local cercano a la universidad, los cuales se molieron en una licuadora con acetona cbp cubrirlos hasta obtener una solución color café claro con consistencia viscosa. Esta solución se filtró al vacío hasta eliminar por completo la acetona de la masa color café retenida. Se volvió a realizar un segundo procesamiento con acetona cbp cubrirlo y una segunda filtración al vacío hasta eliminar la acetona de la masa café. Para reducir los grumos de la masa se traspasó a un mortero y se molió hasta terminar de evaporar la acetona y deshacer los grumos contenidos en ella y obtener una consistencia de polvo. Finalmente se dejó secar el polvo dentro de un desecador al vacío durante 24 hrs. Transcurrido el tiempo se almacenó en refrigeración dentro de un frasco ámbar.

5.4 Síntesis enzimática de L-teanina catalizada con LAP

En un vial se agregaron 2.0 mL de buffer TRIS-HCl 1M a pH 8.5, 12.2 mg de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y 50 mg de LAP. El vial se introdujo en una incubadora a 35 °C

durante 30 minutos con agitación constante. Posteriormente, se adicionaron 50 mg de ácido glutámico (mezcla racémica L-D) y 0.15 mL de solución de etilamina (Et_2N). La reacción se introdujo a una incubadora a 35 °C con agitación constante durante 24 horas. Transcurrido el tiempo la reacción se siguió por TLC utilizando la misma metodología propuesta en el apartado 5.1.2.

Posteriormente del revelado, se añadieron 0.30 mL de Et_2N para asegurar la reacción, se introdujo en una incubadora a 35 °C con agitación constante durante 24 horas. Transcurrido el tiempo la reacción se realizó una segunda TLC utilizando la misma metodología propuesta en el apartado 5.1.2, añadiendo una segunda placa TLC del ácido glutámico de referencia contra la reacción con CLAP.

5.5 Filtración y seguimiento de la 1ª síntesis enzimática catalizada con LAP

Después de 312 horas, la reacción se filtró y sobre celita, se enjuagó con etanol/metanol (1:1) caliente y se dejó dentro de un desecador al vacío durante 24 horas. Posteriormente se le realizó TLC al filtrado para comparar con la L-teanina de referencia. Adicionalmente se realizó co-spot de tabletas vs reacción vs Ac. glutámico

5.6 Cromatografía en columna de sílica gel de la primera reacción catalizada con LAP.

El contenido del vial de la primera reacción catalizada con LAP se dejó dentro de un desecador durante 7 días, obteniendo una sustancia de consistencia viscosa color amarillo. Posterior a este tiempo, se preparó una columna de vidrio con sílica gel (fase estacionaria) y un tapón de arena en la parte superior. Se hizo correr un eluyente de $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (8:2) para humedecer y fijar la fase estacionaria. Posteriormente se preparó la fase móvil diluyendo 0.5 g de la sustancia obtenida del vial con el mismo eluyente y se calentó lo suficiente para disolverlo. Después, se hizo pasar la fase móvil a través de la columna con ayuda de aire comprimido, inmediatamente se recuperaron fracciones de 1 mL en tubos de ensayo hasta un total de 30 fracciones. Se procedió a realizar TLC en co-spot de 4 muestras en cada una de las placas de sílica gel.

5.7 2ª obtención de L-Teanina de referencia.

Se obtuvieron tabletas de L-teanina comerciales de la marca Anáhuac® y se procedió a seguir la misma metodología de extracción empleada en el punto 5.1. con la finalidad de sustituir la L-teanina de referencia extraída de las tabletas Mem-eh, y usarla en los próximos experimentos.

5.8 2ª síntesis enzimática de L-teanina c/ Ác L-glutámico y LAP

Se repite el experimento realizado en el punto 5.4, con la modificación de que se emplea como reactivo exclusivamente el enantiómero ácido L-glutámico, en lugar de la mezcla racémica de ácido L-D glutámico. En un vial se agregaron 2.0 ml de buffer TRIS-HCl 1M a pH 8.5, 12.2 mg de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y 50 mg de LAP. El vial se introdujo en una incubadora a 35 °C durante 30 minutos con agitación constante. Se añadieron 50 mg del enantiómero ácido L-glutámico y 0.15 mL de solución de etilamina (Et_2N). La reacción se introdujo a una incubadora a 35 °C con agitación constante realizando TLC y agregando 0.30 ml de Et_2N cada 24 horas durante 72 horas. Posterior a este tiempo, la reacción se dejó 120 horas más, donde se detuvo la reacción.

5.9 Síntesis enzimática de L-teanina utilizando Ac. L-glutámico catalizada con brotes de chícharo.

En primer lugar, se tuvieron que obtener brotes de chícharo (*Pisum sativum*), para lo cual se obtuvieron semillas de la marca Germinal® y se germinaron en un frasco por 7 días hasta obtener un brote de 4.5 cm (ver figura 4). Adicionalmente, se preparó un buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.2.

Después, en un vial se agregaron 2.0 mL de buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7.2, 12.2 mg de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ y el brote de chícharo el cual se macero en esta misma mezcla. El vial se introdujo en una incubadora a 35 °C durante 30 minutos con agitación constante. Posteriormente, se adicionaron 50 mg de ácido L-Glutámico y 0.15 mL de solución de etilamina (Et_2N). La reacción se introdujo a una incubadora a 35 °C con agitación constante, realizando TLC y agregando 0.30 mL de Et_2N cada 24 horas durante 48 horas. Posterior a este tiempo, la reacción se dejó 168 hrs donde se detuvo la reacción y se realizó TLC.

5.10 Síntesis enzimática de L-teanina utilizando Ac. L-glutámico catalizada con la raíz de brotes de chícharo.

De los brotes obtenidos en el punto 5.9, se retiró la raíz de las semillas germinadas de chícharo (6 cm extendidas) (ver figura 5).

Figura 4. Brote de chícharo

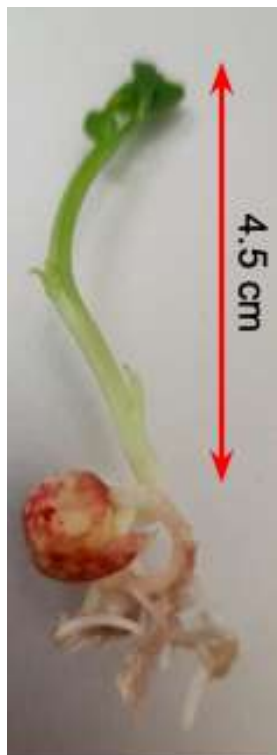


Figura 5. Raíz de chícharo.



Después, en un vial se agregaron los mismos reactivos que se adicionaron para hacer la maceración del punto 5.9, pero ahora sometiendo a maceración la raíz de los brotes. Posteriormente, se adicionaron las mismas cantidades de ácido L-glutámico y solución de etilamina para poder iniciar la reacción. Finalmente, se introdujo a una incubadora a 35 °C con agitación constante, realizando TLC y agregando 0.30 ml de Et₂N cada 24 horas durante 48 horas. Posterior a este tiempo, la reacción se dejó 168 hrs donde se detuvo la reacción y se realizó TLC.

5.11 Reacciones blanco con LAP y sin LAP.

Se realizó el seguimiento por TLC de dos blancos 1) Rxn c/LAP 2) Rxn s/LAP. Para la primera reacción se agregaron 2.0 ml de buffer TRIS-HCl 1M a pH 8.5, 12.2 mg de MgCl₂·6H₂O y 50 mg de LAP. El vial se introdujo en una incubadora a 35 °C durante 30 minutos con agitación constante. Posteriormente, se adicionaron

5 mg de teanina y 0.15 ml de solución de etilamina (Et_2N). La reacción se introdujo a una incubadora a 35 °C con agitación constante, realizando TLC cada 24 horas durante 96 horas. Posterior a este tiempo, la reacción se dejó 72 horas más donde se detuvo la reacción y se realizó TLC.

Para la segunda reacción, se agregaron 2.0 ml de buffer TRIS-HCl 1M a pH 8.5, 12.2 mg de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 mg de teanina y 0.15 ml de solución de etilamina (Et_2N). La reacción se introdujo a una incubadora a 35 °C con agitación constante, realizando TLC cada 24 horas durante 96 horas. Posterior a este tiempo, la reacción se dejó 72 horas más donde se detuvo la reacción y se realizó TLC.

5.12 Cromatografía en columna de sílica gel de la reacción de L-teanina c/ Ác L-glutámico y LAP

El contenido del vial de la segunda reacción catalizada con LAP se dejó dentro de un desecador durante 7 días, obteniendo una sustancia de consistencia viscosa color amarillo. Posterior a este tiempo, se preparó una columna de vidrio con sílica gel (fase estacionaria) y un tapón de arena en la parte superior. Se hizo correr un eluyente de EtOH/ H_2O (8:2) para humedecer y fijar la fase estacionaria. Posteriormente se preparó la fase móvil diluyendo 0.5 g de la sustancia obtenida del vial con el mismo eluyente y se calentó lo suficiente para disolverlo. Después, se hizo pasar la fase móvil a través de la columna con ayuda de aire comprimido, inmediatamente se recuperaron fracciones de 1 ml en tubos de ensayo hasta un total de 30 fracciones. Se procedió a realizar TLC en co-spot de 4 muestras en cada una de las placas de sílica gel. Posteriormente se juntaron en un vial aquellas fracciones que mostraron una mancha en la TLC para concentrar la muestra y volver a introducir al desecador durante 72 horas. Se le realizó TLC a ese concentrado. Finalmente, la muestra del vial se sometió a Espectroscopia de IR para corroborar si el espectro del producto obtenido correspondía al de la L-teanina.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Obtención de L-Teanina de referencia.

De la extracción de las dos tabletas color verde de *Mem-eh* se obtuvieron 107.3 mg de un polvo color verde de apariencia cristalina, dicha coloración se debe a la coloración que originalmente tenían las tabletas antes de procesarlas.

6.2 Cromatografía en capa fina (TLC) de L-triptófano/L-teanina contra L-triptófano.

Las tabletas de *Mem-eh* (Biomiral®) se componen de dos principios activos, la L-teanina y L-triptófano, la TLC se realizó con la intención de identificar las manchas características de cada compuesto y verificar cual de las dos correspondía a la L-teanina, esto se llevó a cabo a través de la comparación de una muestra de L-triptófano de referencia (Sigma-Aldrich®), donde la placa (ver figura 6) muestra 3 manchas, dos pertenecientes a las tabletas de *Mem-eh*, mientras que solo se mostró una para el L-triptófano de referencia. En este sentido, las manchas “T1” y “Tp1” muestran un mismo desplazamiento sobre la placa de sílica gel por lo que se demostró que la mancha “T1” corresponde al L-triptófano, esto indicó que la mancha “T2” corresponde a la L-teanina de las tabletas de *mem-eh*. Por lo tanto, se había extraído una muestra compuesta confiable de L-teanina/L-triptófano para utilizar como reactivo en las próximas reacciones.

Figura 6. Revelado de placa tabletas (referencia) vs L-triptófano.



Composición de la fase móvil: 1-BuOH, acetona, Ac. Acético, H₂O (7:7:2:4).

T=Tabletas de *mem-eh* (Biomiral®), Tp= L-triptófano (Sigma-Aldrich®).

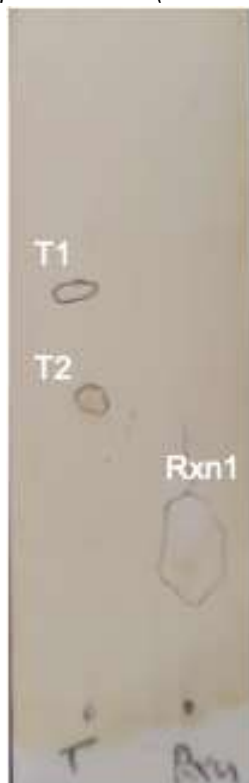
6.3 Preparación del biocatalizador de polvo acetónico de hígado de pollo (LAP).

De la preparación enzimática se obtuvo 197 g de extracto de un polvo marrón que se conservó en refrigeración. Se tomaban 50 mg y estos se utilizaban en cada una de las reacciones. Este procedimiento se realizaba para cada una de las reacciones propuestas.

6.4 Síntesis enzimática de L-teanina catalizada con LAP.

La placa (ver figura 7) reveló 3 manchas, dos para la referencia de L-teanina (*Mem-eh*) "T1" y "T2" y una para la reacción "Rxn1" la cual no realizó el mismo desplazamiento que las de la muestra de referencia, esto pudo significar tres aspectos; en primer lugar, que no hubo una reacción después de 24 hrs, por lo que la reacción necesitaba más tiempo para poder reaccionar. En segundo lugar, que la etilamina se estaba evaporando del medio de reacción ya que esta se evapora entre los 17 °C a 20 °C y las condiciones de reacción implicaban una temperatura de 35 °C, una evidencia más de esto es que cuando se tomaba la muestra del vial para realizar la TLC el olor característico de la etilamina no se percibía en el vial, por lo que era necesario adicionar más etilamina cada 24 horas. Finalmente, la reacción si estaba ocurriendo pero se estaba obteniendo el producto en una proporción despreciable para TLC. Para cada uno de estos aspectos se propuso una modificación a la metodología para asegurarnos que significaran un impedimento a la obtención de la L-teanina; para el primer aspecto se dejaría más tiempo la reacción con las mismas condiciones (Temperatura y agitación constante) hasta obtener alguna evidencia; para el segundo aspecto, cada 24 horas se añadía 0.30 ml de etilamina para asegurar la cantidad necesaria del reactivo y que su evaporación no fuese un aspecto limitante de la reacción.

Figura 7. Revelado de placa tabletas (Biomiral®) vs reacción con LAP.



Composición de la fase móvil: 1-BuOH, acetona, Ac. Acético, H₂O (7:7:2:4). Composición del revelador: Ninhidrina/MeOH (2:1). T=Tabletas *Mem-eh* (Biomiral®). Rxn=Reacción.

La placa de TLC (ver figura 8) reveló para la muestra de referencia (*Mem-eh*®) mostró las mismas marcas "T1" correspondiente al L-triptófano y "T2" correspondiente a la L-teanina, mientras que el desplazamiento de "Rxn1" no corresponde con el de "T2", por lo tanto, se mostró que no hubo reacción después de 48 horas de reacción. Adicionalmente, como método confirmatorio, se realizó una segunda placa TLC de ácido glutámico contra la reacción (Ver figura 9) con la finalidad de observar si el reactivo se estaba consumiendo del medio de reacción, se observa que para el ácido glutámico la marca "A1" y la mancha "Rxn1" que, aunque desplazada por el buffer TRIS-HCl (mancha amarilla "BTHCl"), ambas presentan el mismo desplazamiento, por lo tanto, el reactivo no estaba reaccionando en el medio o el producto se estaba formando en pequeñas proporciones casi imperceptibles para TLC. De cualquier forma, se planteó dejar más tiempo la reacción agregando 0.30 ml de etilamina al medio de reacción.

Figura 8. 2do Revelado de placa teanina vs reacción LAP 48 horas

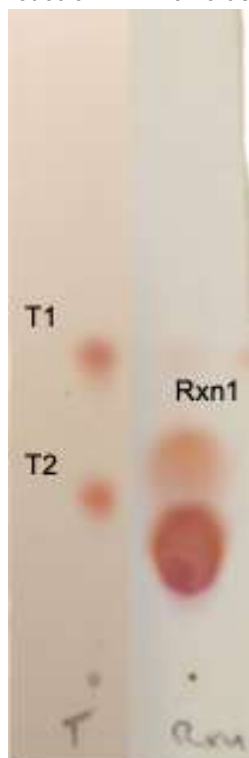
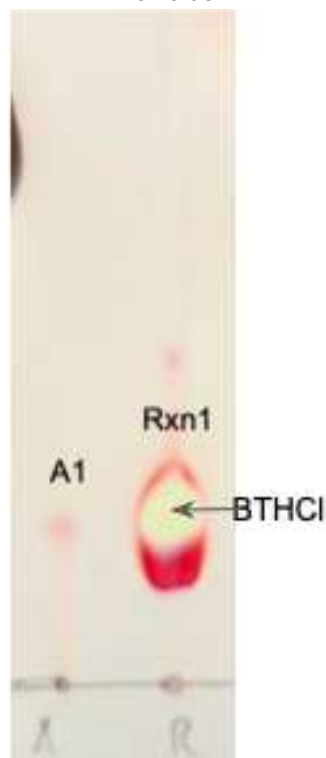


Figura 9. Revelado de placa síntesis L-teanina con LAP 48 horas.



Composición de la fase móvil: 1-BuOH, acetona, Ac. Acético, H₂O (7:7:2:4). Composición del revelador: Ninhidrina/MeOH (2:1). T=Tabletas *Mem-eh*(Biomiral®). Rxn=Reacción. A=Ácido glutámico. BTHCl= Buffer TRIS-HCl

6.5 Filtración y seguimiento de la 1ª síntesis enzimática catalizada con LAP.

Después de dejar la reacción durante 264 horas más, la TLC reveló (ver figura 10) que la reacción no ocurrió, ya que, aunque la mancha “T2” corresponde con el recorrido de “Rxn1”, en el co-spot (ver figura 11) empleado como método confirmatorio, el recorrido de “T2” no corresponde con el de “Rxn1” que ahora se muestra menos desplazado por el buffer Tris-HCl, e inclusive dejó un espacio vacío donde debería de estar el desplazamiento de la teanina producida en la reacción. En este momento, se optó por detener la reacción y purificarla a través de cromatografía en columna para comprobar si el producto esperado, la L-teanina, se estaba formando en bajas concentraciones en el medio de reacción.

Figura 10. Revelado de placa tabletas (referencia) vs reacción LAP.

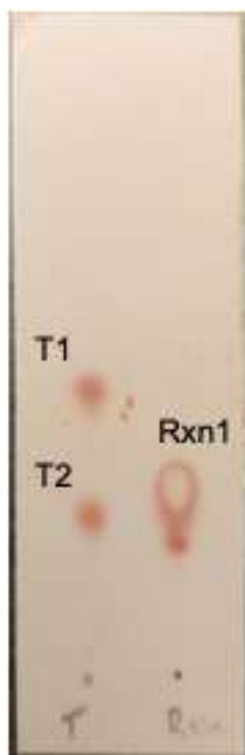
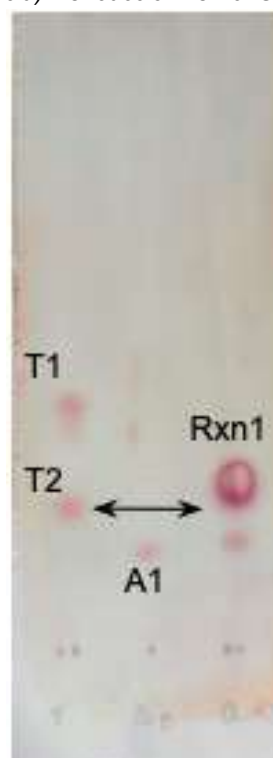


Figura 11. Revelado de placa co-spot tabletas (referencia) vs reacción vs Ác. Glutámico.

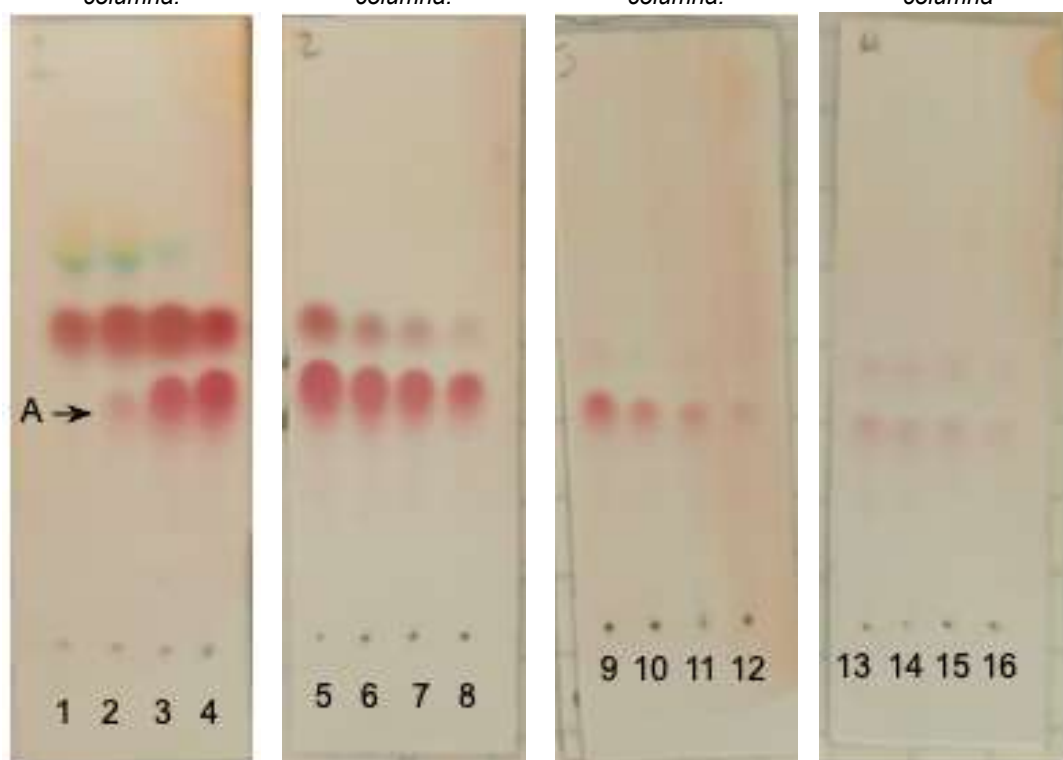


Composición de la fase móvil: 1-BuOH, Ac. Acético, H₂O (4:1:1). Composición del revelador: Ninhidrina/MeOH (2:1). T=Tabletas *Mem-eh*(Biomiral®). Rxn=Reacción

6.6 Cromatografía en columna de sílica gel de la primera reacción catalizada con LAP.

La TLC de la cromatografía mostró lo siguiente (ver figuras 12, 13, 14, 15) donde se juntaron 4 fracciones por placa para co-spot, el TLC se detuvo en la placa 5, ya que a partir de la fracción 17, las manchas eran imperceptibles. Por otro lado, la TLC nos mostró que el ácido glutámico "A" no se consumió durante la reacción ya que está presente en la mayor parte de las fracciones obtenidas en la cromatografía en columna y desaparece de la misma, a la par de los demás reactivos. Finalmente, se determinó que la reacción no ocurrió, que el tiempo de reacción, la evaporación de la etilamina como reactivo eran un limitante en el medio de reacción y, por último, que la L-teanina no se estaba obteniendo en bajas concentraciones ya que nunca se obtuvo se observó el desplazamiento de la mancha en ninguna de las fracciones obtenidas.

Figura 12. Revelado de placa 1 cromatografía en columna. Figura 13. Revelado de placa 2 cromatografía en columna. Figura 14. Revelado de placa 3 cromatografía en columna. Figura 15. Revelado de placa 4 cromatografía en columna.



Composición de la fase móvil: EtOH, H₂O (4:1). Composición del revelador: Ninhidrina/MeOH (2:1).
A=Ácido glutámico

6.7 2ª obtención de L-Teanina de referencia.

Después de la primera síntesis catalizada con LAP, se optó por intentar otras reacción catalizada con distintos biocatalizadores de fácil acceso, adicionalmente se propuso hacer estas reacciones más específicas, para esto se consiguieron tabletas de L-teanina (Anáhuac®) sin L-triptófano y se realizó la extracción de dos tabletas de L-teanina y se obtuvieron 392.3 mg de polvo blanco cristalino. Además, se consiguió ácido L-glutámico (Sigma-Aldrich®). Esto permitió sustituir la L-teanina compuesta con L-triptófano, para así tener una muestra de referencia exclusivamente compuesta por L-teanina. Por lo que ambas muestras de referencia no se mezclaron.

6.8 2ª Síntesis enzimática de L-teanina c/ Ác L-glutámico y LAP.

Se intentó una segunda reacción catalizada con LAP con las modificaciones mencionadas en el punto 6.7 y se realizó TLC según se indica en las siguientes figuras. Ahora para la muestra de la tableta de referencia (Anáhuac®) se obtiene

una única mancha "T1" (ver figuras 16, 17, 18 y 19) a diferencia de la reacción anterior (ver punto 8.4) y en la un conjunto de manchas "Rxn1" para la reacción, se observa que la reacción no ocurrió transcurridas 192 horas o es desplazada por la mancha del buffer TRIS-HCl "BTHCl". Sin embargo, a partir de las 72 horas (ver figura 18) en adelante, se observa la aparición de una segunda mancha "T2" en la tableta de referencia que inicialmente no aparecía, esto pudo deberse a que la L-teanina obtenida de las tabletas de referencia (Anahuac®) sufrían un proceso de degradación y se descompone en en subproductos lo que ocasiona la formación de "T2", debido a esto se desechó la primera muestra obtenida, se volvió a extraer la L-teanina según se indica en la metodología (ver punto 5.7) y se tomaron precauciones adicionales para almacenar el polvo extraído de las tabletas de referencia, al almacenarlo en un frasco ámbar, alejado de la exposición directa a la luz solar y en refrigeración.

Figura 16. Revelado de placa 24 horas.

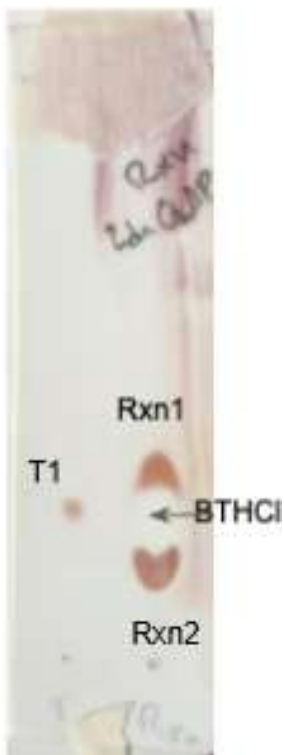


Figura 17.: Revelado de placa 48 horas.

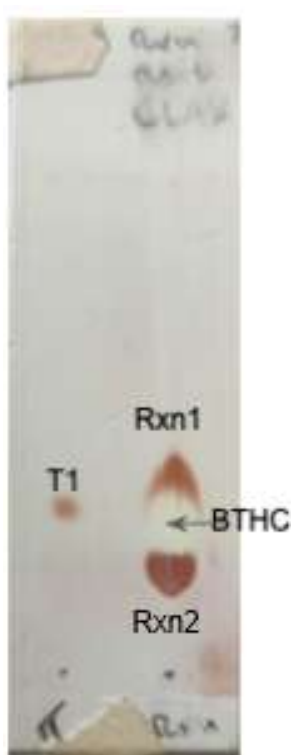


Figura 18. Revelado de placa 72 horas.



Figura 19. Revelado de placa 192 horas.



Composición de la fase móvil: 1-BuOH, Ac. Acético, H₂O (4:1:1). Composición del revelador: Ninhidrina/MeOH (2:1). T=Tabletas *L-teanina* (Anáhuac®). Rxn=Reacción. BTHCl= Buffer TRIS-HCl.

Se puede observar que no hay alguna otra variación, además de la degradación de la muestra de referencia reportada anteriormente, en comparación con la primera reacción catalizada con LAP (ver figura 8). Sin embargo, la mancha

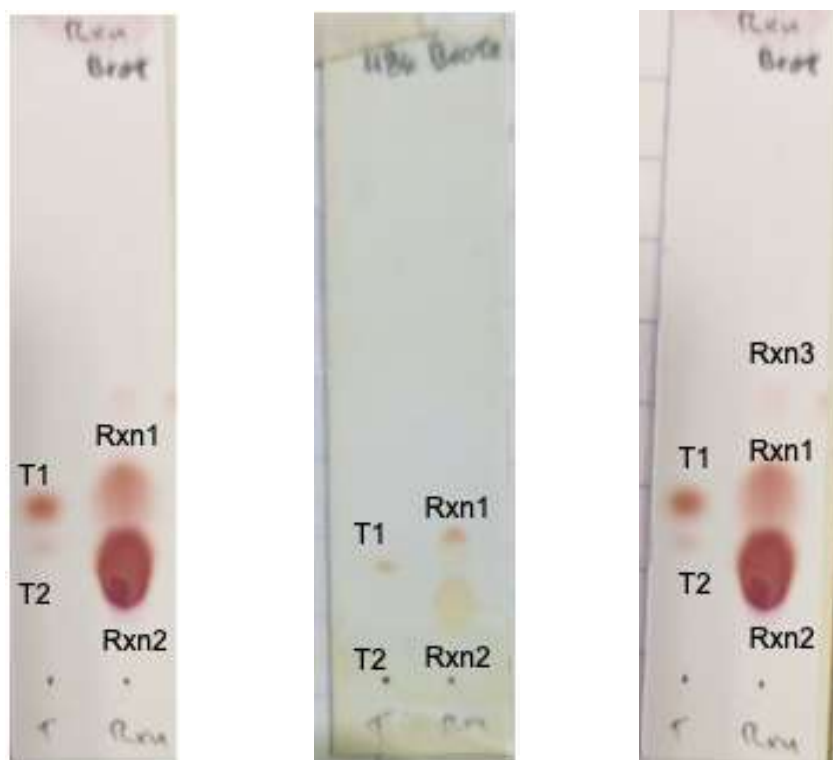
“Rxn1” en la muestra de la reacción es desplazada por la mancha del buffer TRIS-HCl “BTHCl”, esto no permitió ver si la reacción estaba desplazándose hacia la formación de la L-teanina. Esta mancha era un impedimento para la correcta visualización de los arrastres de las manchas sobre la placa de sílica gel, por lo que para las demás síntesis planteadas se necesitó buscar un buffer diferente en el que se la reacción se pudiera llevar a cabo.

6.9 Síntesis enzimática de L-teanina utilizando Ac. L-glutámico catalizada con brotes de chícharo.

Como buffer se decidió utilizar fosfatos, ya que este buffer permite mantener un Ph estable, además de que permitiría que los biocatalizadores del medio de reacción mantuvieran su actividad enzimática. Por otro lado, en las placas (ver figura 20, 21 y 22) se puede observar que la mancha del buffer TRIS-HCl ha desaparecido por completo y ahora se identifican dos manchas “Rxn1” y “Rxn2” de diferente intensidad de color y con diferente desplazamiento sobre la placa de sílica gel, inclusive se observa la misma degradación de la tableta de referencia observada en la figura 18, por lo que la degradación continuó a pesar de las medidas consideradas.

Por otro lado, en la figura 20 se podría pensar que la formación de la L-teanina está concurriendo en la reacción ya que se observa que la mancha “T1” y “Rxn1” se traslapan. Sin embargo, como método confirmatorio, después de 48 horas de reacción (ver figura 21), se utilizó una muestra de la reacción y de la tableta de referencia más pequeña para que cada mancha fuera más pequeña y se observarían más separadas y definidas. En este sentido, si había formación de L-teanina 24 horas después de iniciada la reacción, la concentración del producto sería mayor a las 48 horas, esto sería suficiente para mostrar una mancha en la TLC, aunque no se observa la formación de esta mancha en la figura 21. Finalmente, después de 168 horas más, la reacción esperada no sucedió, sin embargo se observa la formación de una mancha adicional “Rxn3” en la muestra de la reacción, esto podría significar que en el medio del vial estaba ocurriendo una reacción completamente distinta a la esperada y se formó un compuesto a tal concentración capaz de formar una mancha visible en la TLC.

Figura 20. Revelado de placa 24 horas. Figura 21. Revelado de placa 48 horas. Figura 22. Revelado de placa 168 horas.



Composición de la fase móvil: 1-BuOH, Ac. Acético, H₂O (4:1:1). Composición del revelador: Ninhidrina/MeOH (2:1). T=Tabletas *L-teanina* (Anáhuac®). Rxn=Reacción

6.10 Síntesis enzimática de L-teanina utilizando Ac. L-glutámico catalizada con la raíz de los brotes de chícharo.

Para esta reacción se volvió a utilizar buffer de fosfatos por los mismos motivos expuestos en el punto anterior. Además, también se identifican dos manchas “Rxn1” y “Rxn2” de diferente intensidad de color y con diferente desplazamiento sobre la placa de sílica gel, inclusive se observa la misma degradación de la tableta de referencia observada en la figura 18. También se realizó el mismo método confirmatorio que en el punto anterior. Y de igual manera, no se observó la formación de la mancha de la L-teanina después de 48 horas de reacción (ver figura 24), ni después de 168 horas (ver figura 25). Por lo tanto, la reacción no sucedió.

Figura 23. Revelado de placa 24 horas



Figura 24. Revelado de placa 48 horas



Figura 25. Revelado de placa 168 horas

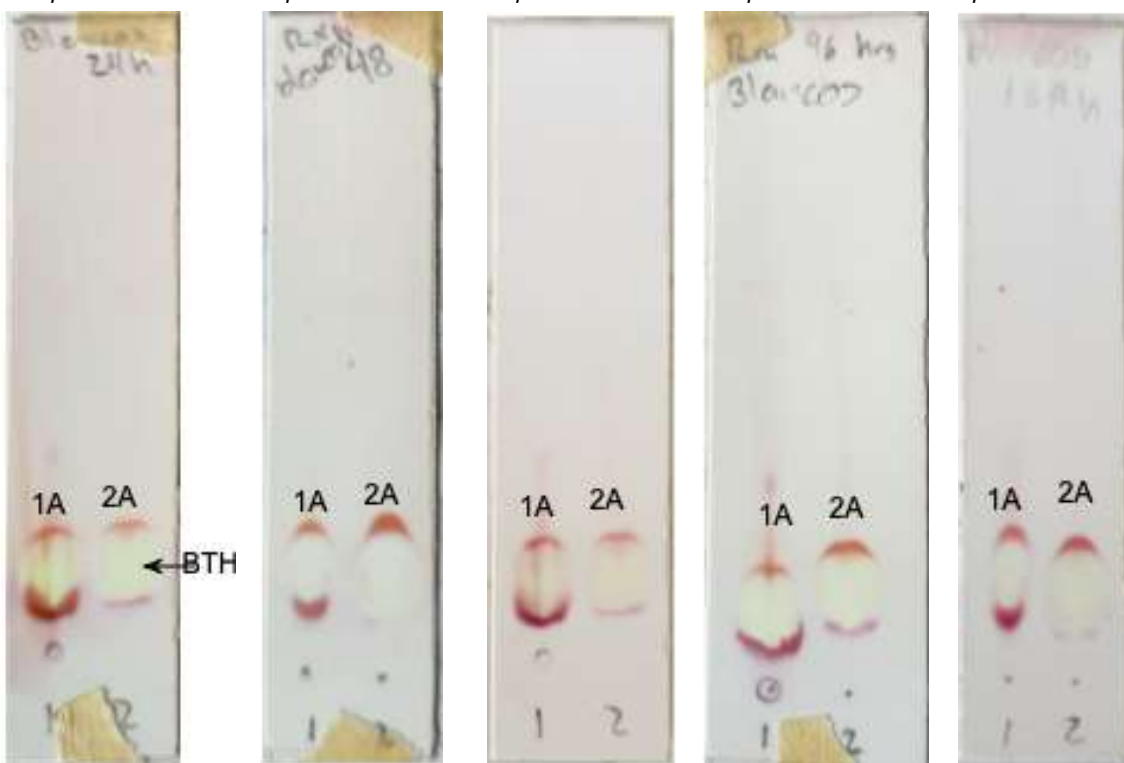


Composición de la fase móvil: 1-BuOH, Ac. Acético, H₂O (4:1:1). Composición del revelador: Ninhidrina/MeOH (2:1). T=Tabletas *L-teanina* (Anáhuac®). Rxn=Reacción

6.11 Reacciones blanco con LAP y sin LAP.

Adicionalmente al experimento del punto 6.8, se realizó una comparación entre una reacción catalizada con LAP y una sin LAP como un método confirmatorio para verificar si se formaba una mancha correspondiente a un nuevo producto formado en el medio de reacción. Se procedió a seguir la metodología propuesta en el punto 5.8, sin embargo, como se observa (ver figura 26, 27, 28, 29 y 30), la visualización de ambas manchas “1A” y “2A” es impedida por la de TRIS-Base “BTHCl”. Por lo que se descarta la reacción al no observar un cambio significativo en las placas de TLC obtenidas.

Figura 26. Revelado de placa 24 horas. Figura 27. Revelado de placa 48 horas. Figura 28. Revelado de placa 72 horas. Figura 29. Revelado de placa 96 horas. Figura 30. Revelado de placa 168 horas.



Composición de la fase móvil: 1-BuOH, Ac. Acético, H₂O (4:1:1). Composición del revelador: Ninhidrina/MeOH (2:1). 1=Rxn c/LAP. 2=Rxn s/LAP. BTHCl= Buffer TRIS-HCl

6.12 Cromatografía en columna de sílica gel de la reacción de L-teanina c/ Ác L-glutámico y LAP.

Como método confirmatorio de la reacción realizada en el punto 6.8, se realizó cromatografía en columna para purificar lo obtenido y quitar la mancha de TRIS-HCl que no permitía visualizar bien las manchas obtenidas de la reacción, aunque muy tenue la coloración se observa que las únicas fracciones que muestran una mancha en la TLC son las 5 a la 12 y para concentrar aún más la muestra se juntó en un vial para posteriormente realizar TLC del concentrado de estas fracciones.

Figura 31. Revelado de la placa 1 cromatografía en columna de la 2ª reacción con LAP



Figura 32. Revelado de la placa 2 cromatografía en columna de la 2ª reacción con LAP



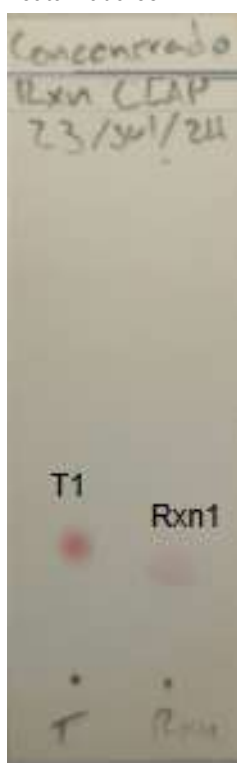
Figura 33. Revelado de la placa 3 cromatografía en columna de la 2ª reacción con LAP



Composición de la fase móvil: EtOH, H₂O (4:1). Composición del revelador: Ninhidrina/MeOH (2:1).

La TLC de las tabletas de L-teanina de referencia (Anáhuac[®]) vs concentrado de las fracciones 5 a la 12 (ver figura 34) reveló una mancha con una coloración más intensa que en las manchas obtenidas en la TLC de las fracciones anteriores, sin embargo, la intensidad del color no deja de ser tenue en comparación con la muestra de referencia. Por otro lado, el desplazamiento de la muestra del concentrado es diferente al de referencia. Esto pudo significar dos cosas, en primer lugar, que la mancha "Rxn1" (ver figura 34) puede ser la misma "Rxn2" que se observó en la figura 16 a 19 causada por los componentes del medio de reacción pero sin el desplazamiento ocasionado por la mancha del buffer TRIS-HCl. En segundo lugar, que siempre se trató de un producto formado en el medio de reacción y que se generaba en concentraciones bajas.

Figura 34. Revelado del concentrado de la 2ª reacción catalizada con LAP.

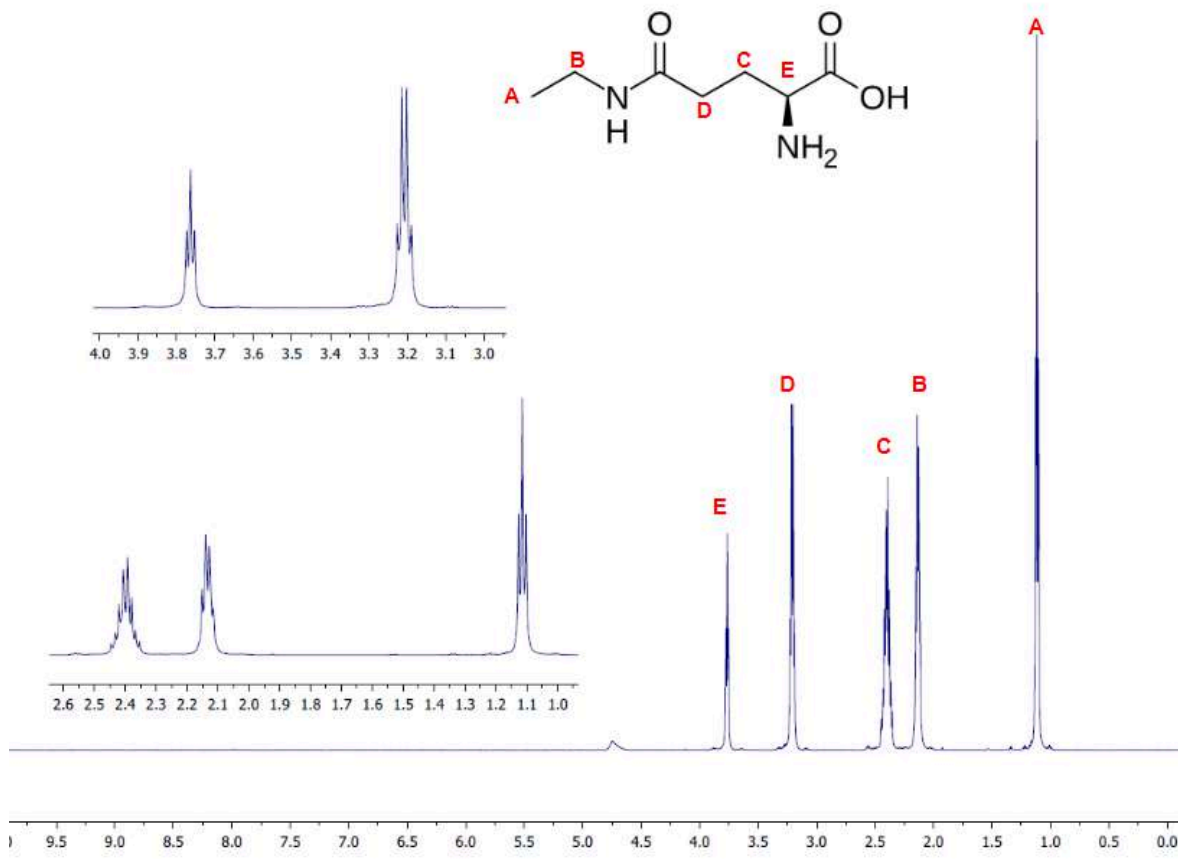


Composición de la fase móvil: 1-BuOH, Ac. Acético, H₂O (4:1:1). Composición del revelador: Ninhidrina/MeOH (2:1). =Tabletas *L-teanina* (Anáhuac®). Rxn=Reacción

En base a lo anterior, como método confirmatorio, se mandaron a analizar ambas muestras a través de Resonancia Magnética Nuclear (NMR) y se obtuvieron los siguientes espectros. Para el espectro de la *L-teanina* de referencia (Anáhuac®) (ver figura 35) se observa la señal en 1.1 de un H₃ del carbono primario (A) unido a la amida, en 2.1 el H₂ del carbono secundario (B) unido a la amida, en 2.4 el H₂ del carbono secundario (C), en 3.2 el H₂ del carbono secundario (D) y en 3.76 el H del carbono terciario (E) del grupo amino. Por lo tanto, el espectro corresponde con la estructura de la *L-teanina*, con esto se confirmó que la referencia utilizada durante los experimentos efectivamente fue *L-teanina*.

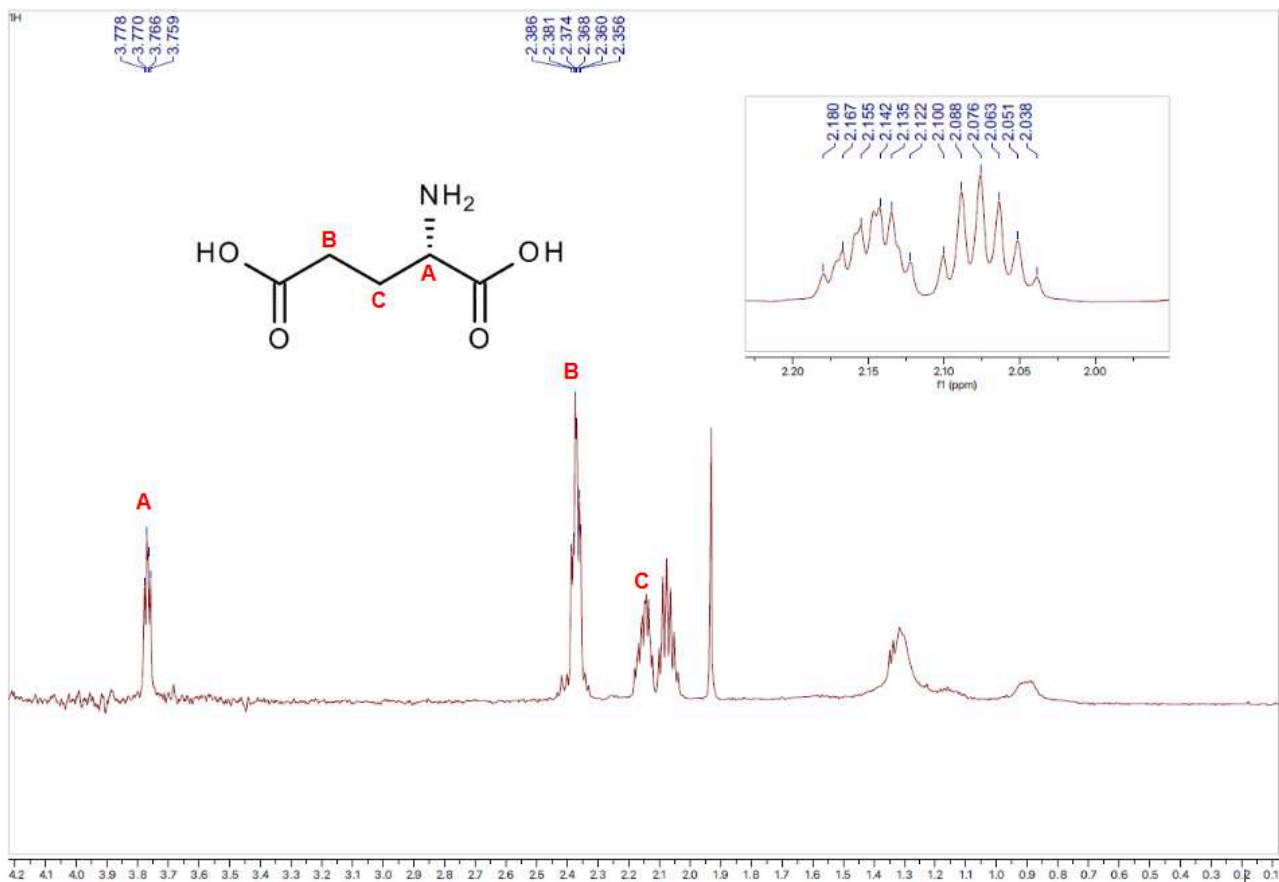
Por otro lado, para el concentrado de las reacciones de la reacción del punto 6.8, se observa (ver figura 36) que hay una ausencia de la señal característica del grupo metilo el cual introduce una señal en 1.0 a 1.2 aproximadamente debido a un desplazamiento ocasionado por el grupo amida (ver figura 35, E) la cual no está presente.

Figura 35. Espectro NMR de Tabletas L-teanina (Anáhuac®).



Además de que, visualmente, las señales están muy desplazadas a diferencia del espectro obtenido en la L-teanina de referencia, lo que indica que hay un grupo funcional adicional en la estructura analizada que ocasiona un fuerte desplazamiento de las señales. Se especula que el compuesto analizado podría ser el mismo ácido L-Glutámico empleado como reactivo ya que en su estructura (ver figura 36) contiene un grupo carboxilo adicional en comparación con la L-Teanina (ver figura 1). Además, en su espectro de RMN ¹H se observa un patrón en 3.7 a 3.8 perteneciente al H carbono terciario unido a la amino, una señal en 2.3 a 2.4 que pertenece al H₂ de carbono secundario (B) cercano al grupo carboxilo y una señal en 2.1 a 2.2 perteneciente al H₂ del carbono secundario (C). Esto nos sugiere que el compuesto aislado no es L-teanina.

Figura 36. Espectro RMN del concentrado de la 2da síntesis enzimática de L-Teanina c/Ác. L-Glutámico y LAP



7. CONCLUSIONES

7.1. En la bibliografía actual se reportan diversas rutas sintéticas que emplean biocatalizadores de fácil acceso para la obtención del L-teanina, como glutaminasa y glutamina sintetasa. Se observa que el uso de extractos enzimáticos crudos implica retos en términos de eficiencia, optimización de las condiciones de reacción y la implementación de controles de reacción. Sin embargo, ofrece ventajas sobre las rutas sintéticas tradicionales como mayor estereoselectividad y sostenibilidad.

7.2. Se logró establecer un método de extracción y purificación de L-teanina a partir de dos tabletas comerciales (Biomiral® y Anáhuac®) sin importar si la tableta era compuesta o no, obteniendo un polvo que se usó como muestra de referencia. Además, el análisis de los espectros de RMN-¹H obtenidos permitieron confirmar que el extracto empleado corresponde a la L-teanina. No obstante, se

demostró que las muestras de referencia se degradan con el tiempo a pesar de tomar las precauciones necesarias para su almacenamiento, esto influyó en la confiabilidad de los análisis comparativos.

7.3. Se diseñaron tres experimentos base empleando biocatalizadores (LAP, extractos enzimáticos de la raíz y los brotes de chícharos), modificando parámetros clave de las condiciones de reacción. Sin embargo, a pesar de las modificaciones no se obtuvo evidencia concluyente de la formación de L-teanina en cantidades significativas, esto nos indica la complejidad de la reacción y la necesidad de una optimización más exhaustiva.

7.4. A lo largo de los experimentos propuestos, se logró establecer una metodología de identificación y análisis comparativo usando Cromatografía en Capa Fina (TLC) y separación de compuestos usando la Cromatografía en Columna. Además, se implementó el uso de Resonancia Magnética Nuclear y los espectros obtenidos, por un lado, ayudaron a la identificación de la L-teanina de referencia. Además, los mismos aspectos demostraron que en los medios de reacción no se estaba formando L-teanina, sino ácido L-glutámico por lo analizado en los espectros de RMN-¹H, sin embargo, para poder asegurar que se trata de este compuesto hizo falta el uso de técnicas auxiliares de análisis e identificación como NMR-¹³C y determinar su punto de fusión una vez purificado. Esto sugiere que los biocatalizadores no fueron efectivos bajo las condiciones empleadas y por lo cuál no se hizo uso de técnicas de análisis más sofisticadas como la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arroyo, M., Acebal, C., & de la Mata, I. (2014). Biocatálisis y biotecnología. *Arbor*, 190(768), a156. <https://doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4010>

Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2019, February 22). *kidney*. *Encyclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/science/kidney>

Dasgupta, A. (2015). Liver enzymes as alcohol biomarkers. En *Elsevier eBooks* (pp. 121-137). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800339-8.00005-5>

Desai, M. J., Gill, M. S., Hsu, W. H., & Armstrong, D. W. (2005). *Pharmacokinetics of theanine enantiomers in rats*. *Chirality*, 17(3), 154–162.

Feldheim, W., Yongvanit, P., & Cummings, P. H. (1986). *Investigation of the presence and significance of theanine in the tea plant*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37(6), 527–534. doi:10.1002/jsfa.2740370604

Jakovac, I. J., Goodbrand, H. B., Lok, K. P., & Jones, J. B. (1982). *Enzymes in organic synthesis. 24. Preparations of enantiomerically pure chiral lactones via stereospecific horse liver alcohol dehydrogenase catalyzed oxidations of monocyclic meso diols*. *Journal of the American Chemical Society*, 104(17), 4659–4665. doi:10.1021/ja00381a024

Kanarek, R.; Mahoney, C.; Brunye, T.; Giles, G. Theanine mitigates caffeine-accentuated stress response and reduces attentional processing biases following exposure to stress. *Eur. J. Pharmacol.* 2011, 668, e16.

Kei Sasaoka, Makoto Kito & Yoriko Onishi (1964) Synthesis of Theanine by Pigeon Liver Acetone Powder Extract, *Agricultural and Biological Chemistry*, 28:5, 325-330, DOI:10.1080/00021369.1964.10858240

Lichtenstein, N. Preparation of γ -Alkylamides of Glutamic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* 1942, 64, 1021–1022.

Liu, Q.; Duan, H.; Luan, J.; Yagasaki, K.; Zhang, G. Effects of theanine on growth of human lung cancer and leukemia cells as well as migration and invasion of human lung cancer cells. *Cytotechnology* 2009, 59, 211–217.

Porter, J. W., & Spurgeon, S. L. (1979). Enzymatic synthesis of carotenes. In *Carotenoids* 5 (pp. 609-622). Pergamon.

Siamwala, J. H.; Dias, P. M.; Majumder, S.; Joshi, M. K.; Sinkar, V. P.; Banerjee, G.; Chatterjee, S. L-theanine promotes nitric oxide production in endothelial cells through eNOS phosphorylation. *J. Nutr. Biochem.* 2013, 24, 595–605.

Tachiki T, Yamada T, Mizuno K, Ueda M, Shiode J, Fukami H. 1998. Reacciones de transferencia de gamma-glutamil por glutaminasa de *Pseudomonas nitroreducens* IFO 12694 y su aplicación para la síntesis de teanina y gamma-glutamilmetilamida. *Biociencia. Biotecnología. Bioquímica*. 62:1279-1283.

Takagi, Y.; Kurihara, S.; Higashi, N.; Morikawa, S.; Kase, T.; Maeda, A.; Arisaka, H.; Shibahara, S.; Akiyama, Y. Combined administration of L-cystine and L-theanine enhances immune functions and protects against influenza virus infection in aged mice. *J. Vet. Med. Sci.* 2010, 72, 157–165.

Unno, T.; Suzuki, Y.; Kakuda, T.; Hayakawa, T.; Tsuge, H. Metabolism of Theanine, γ -Glutamylethylamide, in Rats. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 1593–1596.