



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA.

ESTUDIO DE LA SINTESIS DE LOS ÁCIDOS DE MOSHER
ASISTIDA POR METODOS ENZIMÁTICOS

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Químicas

Presenta

Luis Javier Benítez Puebla

Dirigida por:

Dr. Carlos González Romero

Dra. Maria Paulina Aydee Gracia Fuentes Benites

M.S.P. Sergio Humberto Pavón Romero.

Agradecimientos

- A la Universidad Autónoma del Estado de México por el financiamiento para la adquisición de reactivos y material mediante la secretaria de investigación y estudios avanzados, mediante el proyecto 3512/2013CHT.
- Al CCIQS UAEM-UNAM por el apoyo prestado para el análisis de resonancia magnética nuclear (RMN).
- Se agradece a la M. en C. María de las Nieves Zavala Segovia técnica académica del CCIQS por su ayuda en la obtención de espectros de RMN.
- Finalmente se agradece a CONACyT por la beca otorgada con numero de asignación 227581.

Indice

Indice.....	1
Abreviaturas.....	3
Abstract.....	4
Resumen	4
Antecedentes	5
Herramientas biológicas en la síntesis orgánica.....	12
Metabolismo de nitrilos	14
Mecanismo de hidrolisis de nitrilos con nitrilasas	15
Utilidad de los ácidos de Mosher	16
Síntesis de cianohidrinas con cianuro de trimetilsililo.....	19
Justificación.....	24
Hipótesis	25
Objetivos	25
Metodología.....	26
Resultados y discusión	30
Variaciones de la metodología	39
Cantidad de medio de crecimiento y buffer para la reacción.....	39
Codisolvente.....	40
Efecto del pH.....	40
Temperatura	40
Reactividad.....	41
Cálculos teóricos.	42
Conclusiones.....	46
Sugerencias y perspectivas.....	47
Parte experimental.....	48
Obtención de la cianohidrina protegida.....	49
Método microbiológico.....	51
Cálculos Teóricos.....	52
Referencias.....	53

Anexos.....	57
Cálculos teóricos	58

Abreviaturas

RMN ¹H: Resonancia magnética nuclear de hidrogeno

RMN ¹³C: Resonancia magnética nuclear de carbono 13

RMN ¹⁹F: Resonancia magnética nucleas de flúor 19

EM: Espectrometría de masas.

IR: Espectroscopia de infrarrojo

TBDMSCI: Cloruro de terbutildimetilsililo= TBS

DMAP: Dimetilaminopiridina

TBAF: Floruro de tetrabutilamonio

TEMPO: N-oxido de tetrametilpiperidina

MTPA: Metoxifeniltrifluoroacético

Pyr: Piridina

DCC: dicitclohexilcarbodimida

TMSCN: cianuro de trimetilsililo

DIBALH: hidruro de diisobutilaluminio

PS-TPP: Trifenilfosfina soportada en poliestireno

Abstract

Trifluoroacetophenone derivatives were synthesized to obtain a cyanohydrin gem. This cyanohydrin was tested to be hydrolyzed its nitrile group in the presence of the bacteria *Alcaligenes faecalis*. In this work we describe the effect of the trifluoromethyl group in the hydrolysis of the nitrile group. Its electrophilic and nucleophilic character were assessed and compared with mandelonitrile as, a model molecule the. We also describe the methodology to obtain the cyanohydrin gem.

Resumen

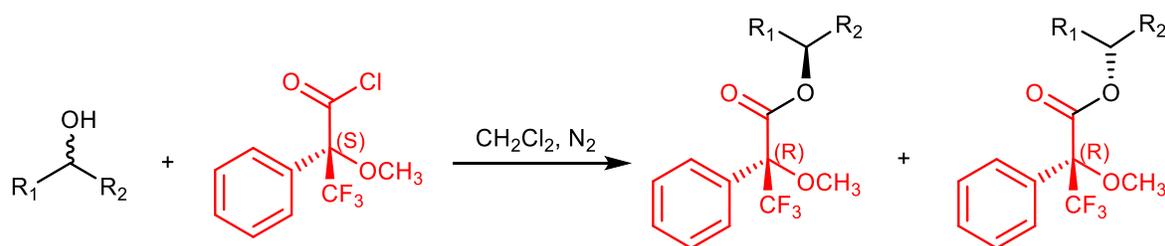
Durante el desarrollo de este trabajo de investigación se llevó a cabo la obtención de una cianohidrina precursora de los ácidos de Mosher. para la obtención de ésta se ensayaron varias metodologías hasta encontrar las condiciones óptimas. Utilizando como catalizador trifenilfosfina fue posible la obtención de la cianohidrina, la cual fue desprotegida posteriormente con ácido cítrico.

Posteriormente, se ensayaron diferentes condiciones para la hidrólisis de esta cianohidrina con la bacteria *Alcaligenes faecalis*. Se describen los diferentes intentos para llevar a cabo la reacción con el microorganismo. Se ensayaron diferentes condiciones para el cultivo de la bacteria y para la reacción con el microorganismo.

Por último, se realizaron cálculos teóricos para explicar la falta de reactividad de la cianohidrina sintetizada previamente. Estos cálculos mostraron la disminución de la densidad electrónica en el átomo de nitrógeno el nitrilo, el cual forma puentes de hidrogeno con la enzima según el mecanismo propuesto para esta transformación.

Antecedentes

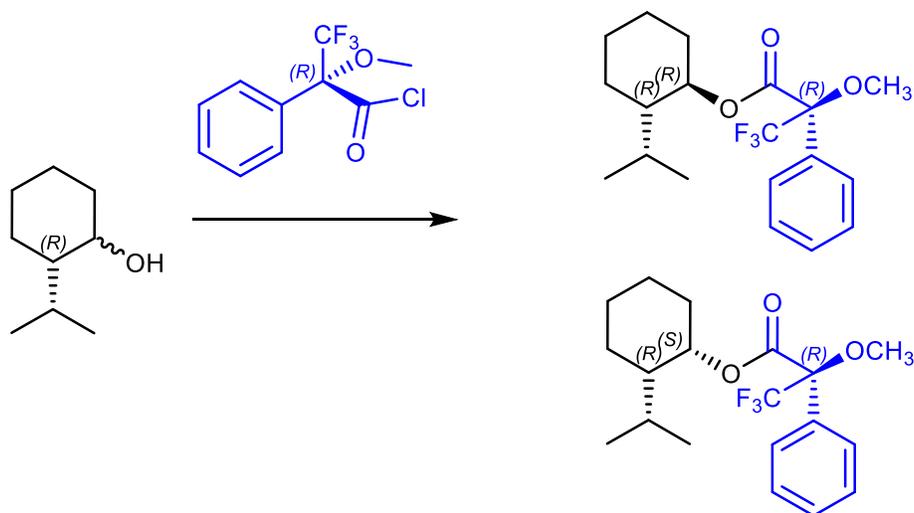
Uno de los problemas que se presentan a menudo en la síntesis asimétrica, en donde se generan mezclas racémicas de alcoholes o aminas, es la determinación y separación de los enantiómeros que componen a dicha mezcla. Para resolver el problema de determinación del exceso enantiomérico se recurre a los ácidos de Mosher (ácido α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético), que en su forma del cloruro de ácido se hacen reaccionar con la mezcla racémica de alcohol o amina para generar un par de diastereoisómeros a los cuales se les puede determinar su pureza (proporción diasteromérica) a través de $^1\text{H-RMN}$ (**Esquema 1**).



Esquema 1: Reacción de un alcohol racémico con un ácido de Mosher

Mediante este procedimiento se pueden obtener diastereoisómeros los cuales sí pueden ser separados a diferencia de los enantiómeros.

Los diastereoisómeros se pueden separar por varios métodos tales como cromatografía en columna o placas preparativas de cromatografía en capa fina. De esta forma, se pueden separar y purificar cada uno de los diastereoisómeros y, posteriormente, hidrolizar para obtener una molécula con la configuración absoluta (**R**) o (**S**) (**Esquema 2**).



Esquema 2: Formación de los dos diastereomeros.

Se llevaron a cabo múltiples intentos para preparar los ácidos de Mosher ópticamente activos a través de métodos que resultaran económicamente viables o accesibles, del cual se empleó el método enzimático; sin embargo, todos los intentos realizados fueron infructuosos.

Se utilizó como materia prima trifluoroacetofenona, para llegar a la cianohidrina; ésta se hidrolizó utilizando microorganismos como *Alcaligenes faecalis* y *Torulopsis candida* (*Candida famata*) que contienen nitrilasas, las cuales hidrolizan los nitrilos a los ácidos carboxílicos correspondientes, obteniéndose de esta manera el ácido carboxílico correspondiente y con una estereoquímica bien definida.

Se buscó una ruta sintética que mantuviera la configuración absoluta deseada y se lograron caracterizar todos los compuestos utilizando técnicas de elucidación espectroscópica como resonancia magnética nuclear (RMN). Se llevaron a cabo experimentos de carbono 13 (RMN ^{13}C), hidrógeno (RMN ^1H) y debido a que los productos obtenidos contienen átomos de flúor además se llevaron a cabo experimentos de flúor 19 (RMN ^{19}F) y espectroscopía de infrarrojo (IR).

Uno de los problemas más frecuentes en síntesis asimétrica es la determinación de la pureza óptica de alcoholes y aminas. Para tal efecto, se utilizan los ácidos (R) o (S)- α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético (**1**) y (**2**) conocidos como ácidos de Mosher en su forma de cloruros de ácido, los cuales son reactivos extremadamente costosos (**Figura 1**).

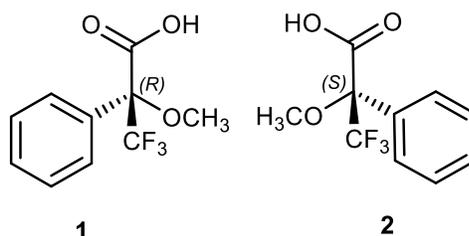
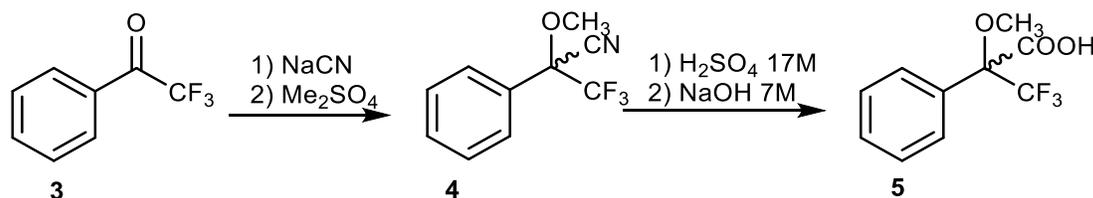


Figura 1: Enantiómeros de los ácidos de Mosher

Para la síntesis de los ácidos de Mosher **1** y **2** se han descrito varias rutas sintéticas; sin embargo, éstas presentan dificultades técnicas, condiciones poco favorables, rendimientos bajos, y una pureza óptica pobre.

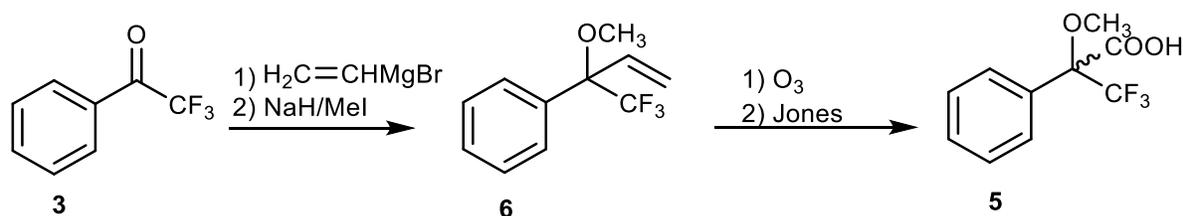
La primera síntesis del ácido racémico de Mosher **5** fue desarrollada en 1969 por H. A. Mosher. Ésta consiste en la adición de cianuro de sodio a trifluorometilfenilcetona (**3**), seguido por metilación de la cianohidrina generada con sulfato de dimetilo para proporcionar el éter **4**, y posterior hidrólisis del nitrilo con tratamientos fuertemente ácidos, para dar rendimientos entre el 58-63% del ácido racémico **5** (**Esquema 3**)¹.



Esquema 3: Síntesis de Mosher.

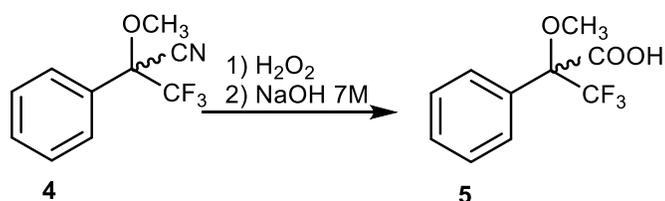
Otra síntesis fue descrita por Chong en 1993 y consiste en la formación de la olefina **6**, la cual se lleva a cabo mediante la adición de un reactivo de Grignard a la trifluoroacetofenona. Posteriormente, se realiza la alquilación para obtener el éter **6**, y enseguida se trata con ozono a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ para poder obtener el aldehído; el cual se oxidó al

ácido **5** con el reactivo de Jones, proporcionando el compuesto **5** correspondiente al ácido de Mosher en un rendimiento del 80% (**Esquema 4**)².



Esquema 4: Síntesis de Chong para obtener el ácido de Mosher.

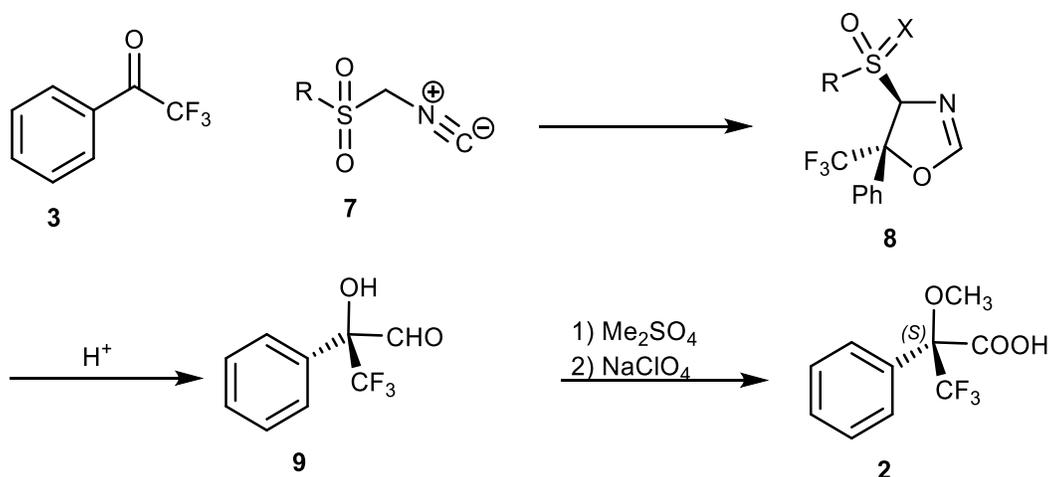
Por otro lado, Buscek en 2000 propuso la hidrólisis básica con H_2O_2 del nitrilo racémico **4** bajo reflujo con $\text{NaOH/H}_2\text{O}_2$; seguido por acidificación y extracción con cloroformo logrando un rendimiento del 98% del ácido después de su destilación (**Esquema 5**)³.



Esquema 5: Síntesis de Buscek para la obtención del ácido de Mosher **5**.

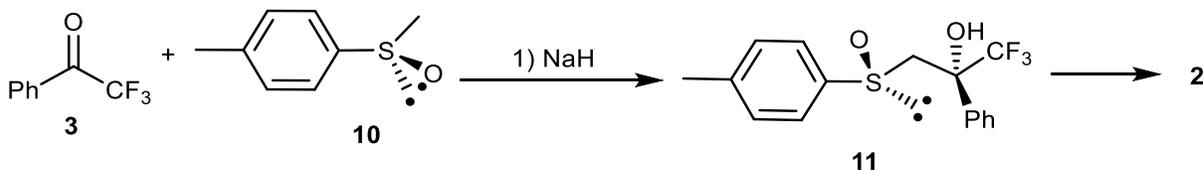
Bajo estas condiciones y en todos los casos se obtiene la forma racémica del ácido de Mosher, sin que los autores describan el aislamiento de cada uno de los enantiómeros.

La primera síntesis enantioselectiva fue descrita en 1987 por Hundscheid y consiste en la reacción entre isocianuro **7** y la trifluoroacetofenona **3** formando una oxazolina **8** y sometida a hidrólisis ácida proporciona el hidroxialdehído **9**, el cual se metila y se oxida con perclorato de sodio para obtener el ácido de Mosher (-)-(S)-**2** (**Esquema 6**)⁴.



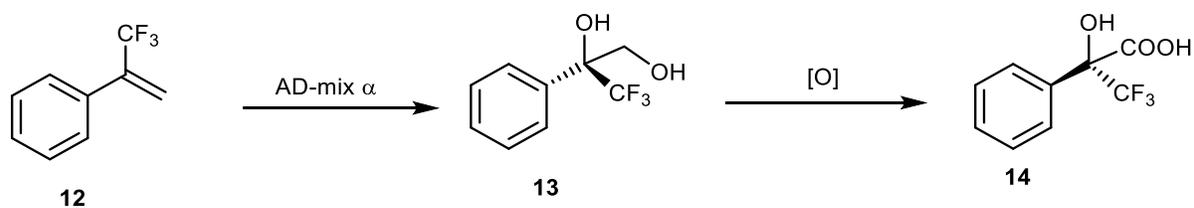
Esquema 6: Síntesis enantioselectiva del ácido de Mosher (-)-(S) de Hundscheid et al.

Otra alternativa es el método descrito por Bravo y colaboradores, que consiste en la reacción de trifluoroacetofenona con (R)-metil *p*-tolil sulfóxido **10** para obtener la forma (S) del ácido mediante la formación del compuesto **11** como intermediario (**Esquema 7**)⁵.



Esquema 7: Síntesis enantióselectiva del ácido de Mosher (S) por Bravo et al.

En la investigación llevada a cabo en 1994 por Sharpless et al; se obtuvo un precursor del ácido (*R*)- α -hidroxi- α -trifluorometilfenilacético **14** utilizando como materia prima α -trifluorometilestireno (**12**), el cual fue dihidroxilado en condiciones de dihidroxilación asimétrica para obtener el diol **13** y posteriormente oxidado para obtener el compuesto **14** (**Esquema 8**)⁶.



Esquema 8: Síntesis del enantiómero (*R*) del precursor del ácido de Mosher.

Posteriormente el equipo de investigación de Fernández obtuvo este ácido mediante la reacción entre la trifluoroacetofenona **3** y la 1-(metilnamino)pirrolidona **15** o 1-metilnamina-5,5-(difenilmetil)pirrolidona **16** (Figura 2)⁷.

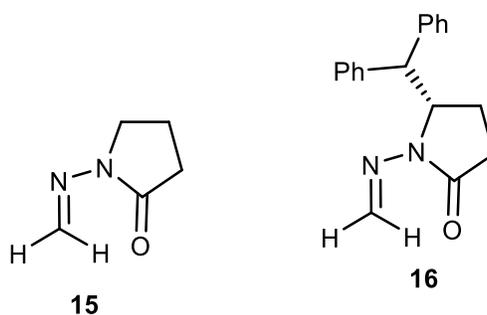
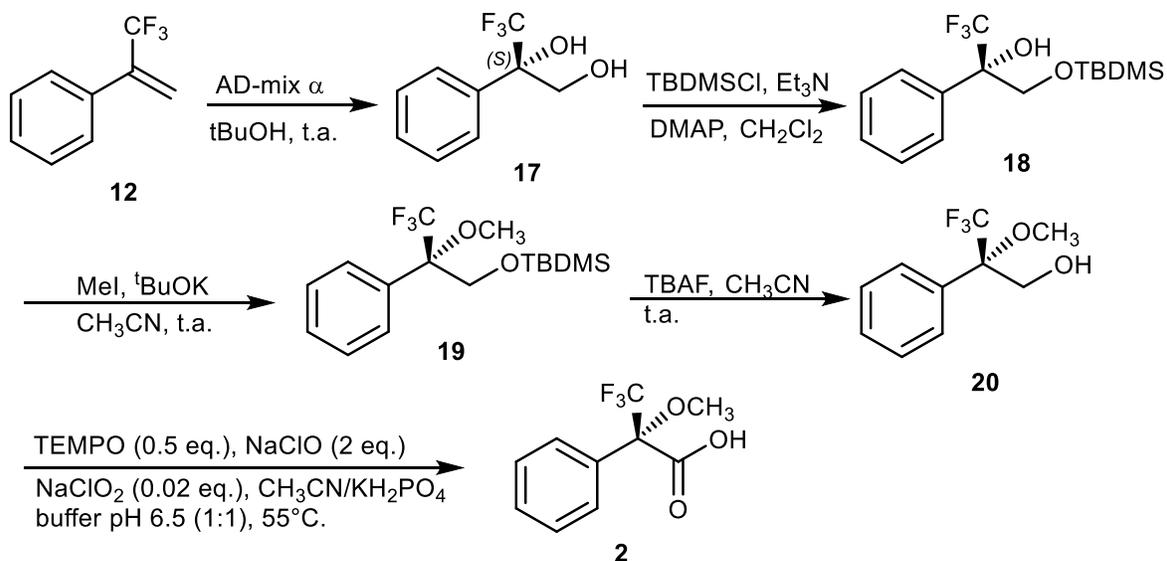


Figura 2: 1-(metilnamino)pirrolidona **15** y 1-metilnamina-5,5-(difenilmetil)pirrolidona **16**.

Ambos enantiómeros **1** y **2** se pueden sintetizar a partir del alqueno **12** mediante una dihidroxilación asimétrica y posterior oxidación. La dihidroxilación asimétrica se lleva a cabo con los enantiómeros del 1,4-ftalazinadiil di-éterdihidroquinina (AD-mix), de la cual existen la mezcla AD-mix α y β (Figura 3). El isómero **1**-(*R*) se obtiene con la mezcla β , y el isómero **2**-(*S*) con la mezcla α ⁸.



Esquema 9: Síntesis comercial del ácidos de Mosher **2**-(S).

La mezcla AD-mix α contiene el osmiato potásico $\text{K}_2\text{OsO}_2(\text{OH})_4$ como fuente de tetraóxido de osmio, ferrocianuro potásico $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, carbonato potásico, y el ligante quiral (**Figura 3**).

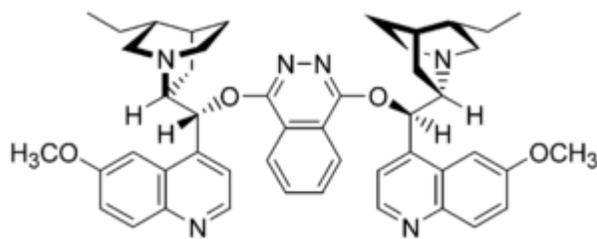


Figura 3: Ligante quiral del AD-mix α

Herramientas biológicas en la síntesis orgánica.

En años recientes el uso de herramientas biológicas en procesos de síntesis para la obtención de productos alimenticios, farmacéuticos y reactivos químicos ha tenido un desarrollo importante. Dichas herramientas biológicas pueden ser bacterias u hongos, mutados o no, que en su composición celular contengan enzimas capaces de biocatalizar reacciones específicas; o bien que dichas enzimas puedan ser aisladas y purificadas y trabajar con ellas.

En 1982, Asano y colaboradores observaron que *Arthrobacter* sp J.1 presentaba la enzima nitrilohidratasa capaz de catalizar la hidrólisis de acetonitrilo (**21**) para formar acetamida (**22**) y posteriormente formar ácido acético (**23**) (**Figura 4**) y amoníaco, con la cooperación de una amidasa también presente en *Arthrobacter* sp. Estas enzimas fueron inducidas durante la fase exponencial del cultivo en acetonitrilo como única fuente de carbono y nitrógeno⁹.

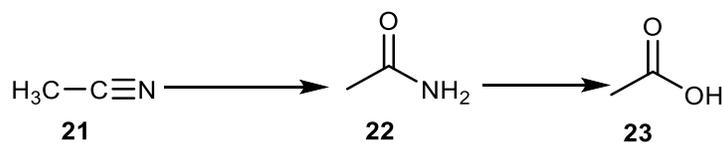


Figura 4: Hidrólisis enzimática del acetonitrilo (**22**).

Años después, en 1991, Yamamoto y colaboradores obtuvieron el ácido (-)-(R)-mandélico (**25**) a partir del mandelonitrilo racémico **24** por *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 obteniendo un rendimiento del 91% y con un exceso enantiomérico del 100% (**Figura 5**), ya que dicha bacteria contiene una enzima nitrilasa que convierte el mandelonitrilo al ácido correspondiente en un solo paso. El ácido (-)-(R)-mandélico también puede ser obtenido a partir de mandelamida, la cual es obtenida por la hidrólisis del mandelonitrilo debido a la enzima nitrilohidratasa y por acción posterior de la enzima amidasa también presente en *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750.¹⁰

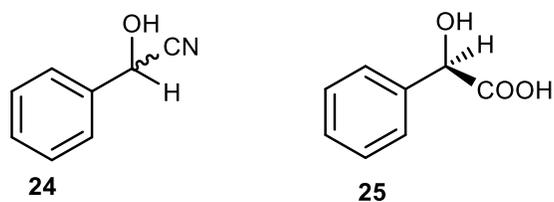
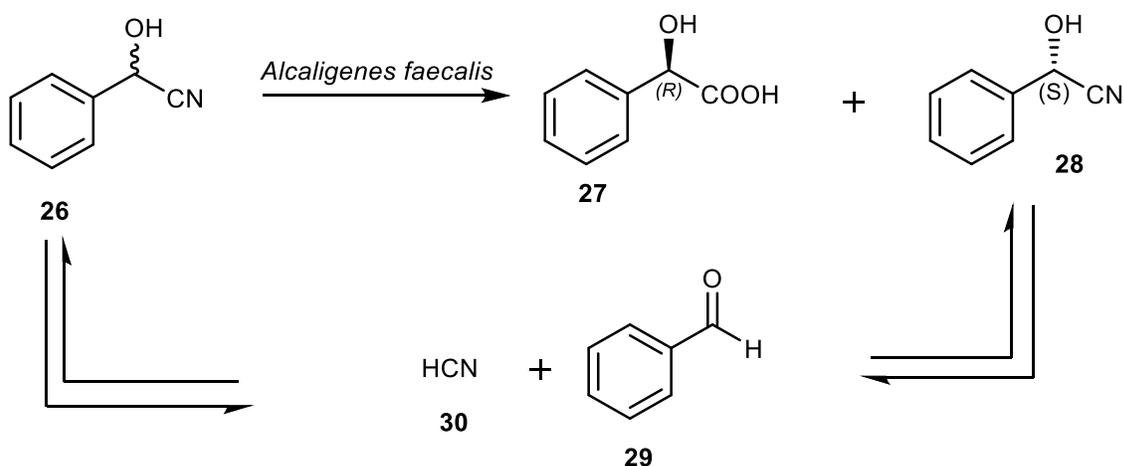


Figura 5: Mandelonitrilo y ácido mandélico.

Las enzimas presentes en *Alcaligenes faecalis* responsables de la hidrólisis de nitrilos consumen solamente el mandelonitrilo (*R*). Al final de la reacción se obtiene únicamente el ácido (*R*)-mandélico en un exceso enantiomérico de 99% y sin presencia del (*S*)-mandelonitrilo. Esto se debe a que al mandelonitrilo se puede racemizar como se muestra en el **Esquema 10**.



Esquema 10: Racemización del mandelonitrilo.

Alcaligenes faecalis ATCC 8750 no es el único microorganismo capaz de producir ácido (-)-(*R*)-mandélico a partir de mandelonitrilo, también *Corynebacterium nitrilophilus* ATCC21419, *Rhodococcus* sp. Cepas AK32, *Corynebacterium* sp. Cepa C5, *Acinetobacter* sp. Cepa AK226¹⁰, ya que estos microorganismos también cuentan con la enzima nitrilasa *R*-enantioselectiva para mandelonitrilo y una enzima amidasa para mandelamida. Otros microorganismos que dan ácidos α -carboxílicos a partir de arilpropionitrilos son *Rhodococcus equi* A4¹¹ y *Rhodococcus butanica* ATCC21197¹², cuyos rendimientos y excesos enantioméricos varían de acuerdo a los sustituyentes.

Así también se informa que *Torulopsis candida* muestra actividad de hidrólisis enantioselectiva. Esta levadura produce hidrólisis de α -hidroxinitrilos dando la forma S(-) del hidroxiácido¹³.

Linardi y colaboradores proponen que la cepa de *Candida famata* que creció en acetonitrilo y acetamida involucra una hidrólisis en dos pasos mediada por nitrilohidratasa y amidasa inducible e intracelular¹³.

Metabolismo de nitrilos

El metabolismo de los nitrilos incluye un amplio espectro de reacciones, entre las que se encuentran las catalizadas por oxigenasa/oxinitrilasa; por otro lado, la hidrólisis del nitrilo puede proceder por dos distintos mecanismos. El primero de ellos es una secuencia de dos reacciones, hidratasa (EC 4.2.1.84)-amidasa (EC 3.5.1.4) (**Figura 6**) o un proceso de una sola reacción catalizada por la nitrilasa (EC 3.5.5.1), que proviene de una cepa de *Alcaligenes faecalis*.

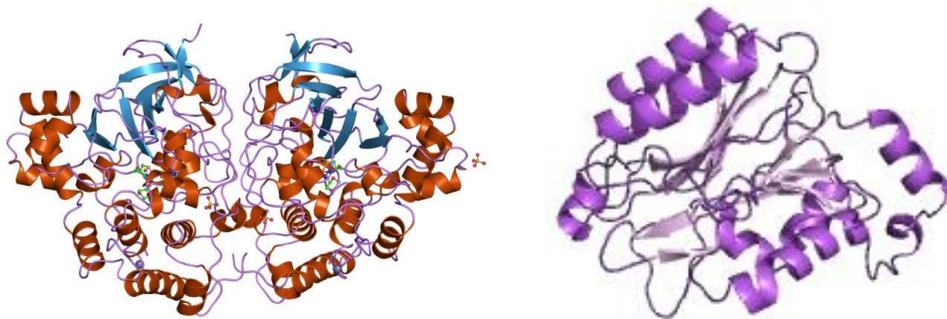


Figura 6: Hidratasa (EC 4.2.1.84) y Amidasa (EC 3.5.1.4)¹⁴

Es conocido que ensayar una gran cantidad de fuentes de enzimas puede ser difícil, ya que se debe probar individualmente cada colonia para medir la actividad enzimática. Un método de selección puede ser empleando medios selectivos que sólo permitan crecer al microorganismo con la enzima que se busca. Usualmente, en el caso de las bacterias que contienen nitrilasas se usa un medio que contenga nitrilo o amida como única fuente de nitrógeno, este nitrilo o amida se convierte en amoníaco por acción de una nitrilasa o

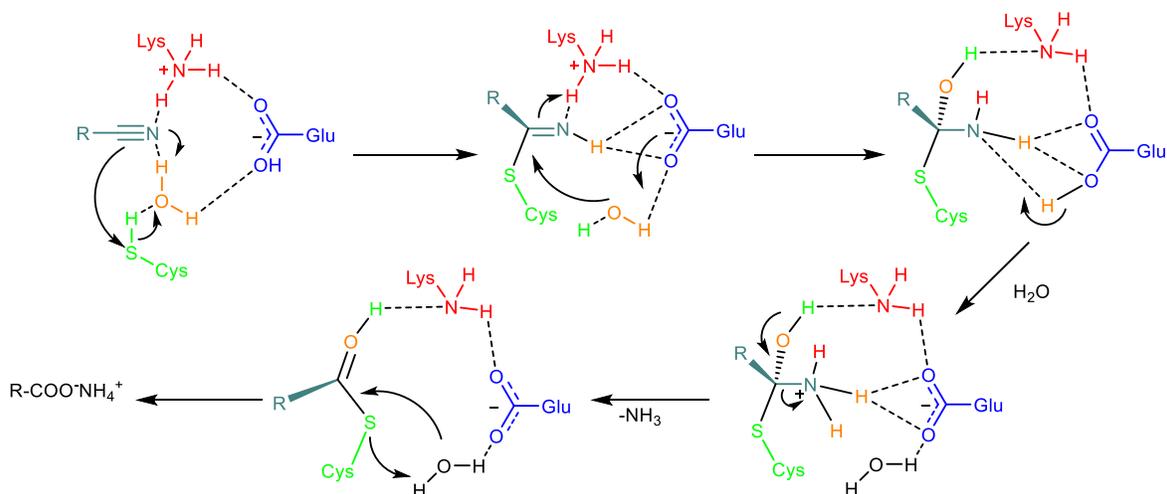
amidasa y se aprovecha como única fuente de nitrógeno. De esta manera, se eliminan los microorganismos que no puedan aprovechar este sustrato, debido a que no contienen la enzima necesaria. En algunas ocasiones el carboxilato resultante puede ser utilizado como fuente de carbono, por lo que el sustrato puede ser ocupado como fuente de carbono y de nitrógeno¹⁵.

Unos criterios de selección importantes son las condiciones a las cuales el microorganismo es capaz de crecer, así como las propiedades deseadas para la enzima. Un ejemplo de esto es *Exophiala mesophila* que es una cepa que puede hidrolizar nitrilos y es tolerante al medio ácido. Este tipo de microorganismos se pueden utilizar para el caso en que la cianohidrina resultante sea inestable a un pH superior a 5¹⁵.

La gran mayoría de microorganismos que convierten nitrilos a ácidos carboxílicos se obtienen utilizando una técnica de selección, que consiste en un medio enriquecido con el compuesto que se tendrá como sustrato. En este medio se sembrarán diferentes cepas y se harán varios subcultivos, al final solamente una cepa prevalecerá en el cultivo¹⁵.

Mecanismo de hidrolisis de nitrilos con nitrilasas

El mecanismo propuesto para la hidrolisis de un nitrilo mediante una nitrilasa¹⁶ no es del todo conocido, ya que no se cuenta con una estructura cristalográfica. Sin embargo, es aceptado que en el sitio activo se encuentran una lisina, una glicina y un ácido glutámico y la reacción se lleva a cabo mediante un intermediario tiomidato (**Esquema 11**). La molécula de agua se ha agregado debido a que se ha identificado en una enzima estructuralmente relacionada la *D*-carbamoilasa. La eliminación de amoníaco del intermediario tetraédrico con la formación de la acil-enzima intermediaria requiere una carga positiva en el átomo del nitrógeno en el reactivo, que se provee por el residuo de ácido glutámico. En contraste, si la carga positiva no está en el reactivo si no en el residuo de lisina, por ejemplo, se esperará que la eliminación de residuo de lisina prevalezca, lo que conducirá a la formación de una amida en vez de un ácido¹⁵.



Esquema 11: Mecanismo de hidrólisis de nitrilos.

Utilidad de los ácidos de Mosher

Los ácidos de Mosher han sido ampliamente utilizados para la determinación de la proporción enantiomérica en compuestos ópticamente activos. Muchos grupos de investigación buscan productos secundarios del metabolismo en plantas, hongos, algas y en otros organismos. Para la elucidación de la estructura o de la proporción enantiomérica de estos metabolitos secundarios, se han desarrollado métodos que involucran a los ácidos de Mosher.

En 2012, Li y colaboradores describieron la obtención de derivados policétidos citotóxicos de la esponja *Plakortis simplex* del mar de China del sur¹⁷. En esta investigación, se aislaron once compuestos, a los cuales se les estudio su actividad citotóxica. Entre los compuestos aislados está el alcohol **31** al cual se le determinó la configuración absoluta mediante el método de los ácidos de Mosher, se hizo reaccionar con el cloruro del ácido y se colocó en presencia del alcohol, de esta manera mediante experimentos de RMN se determinó la configuración absoluta del carbono C-3 del éster¹⁷.

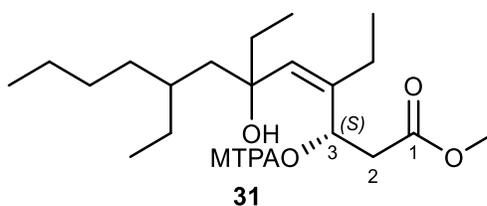
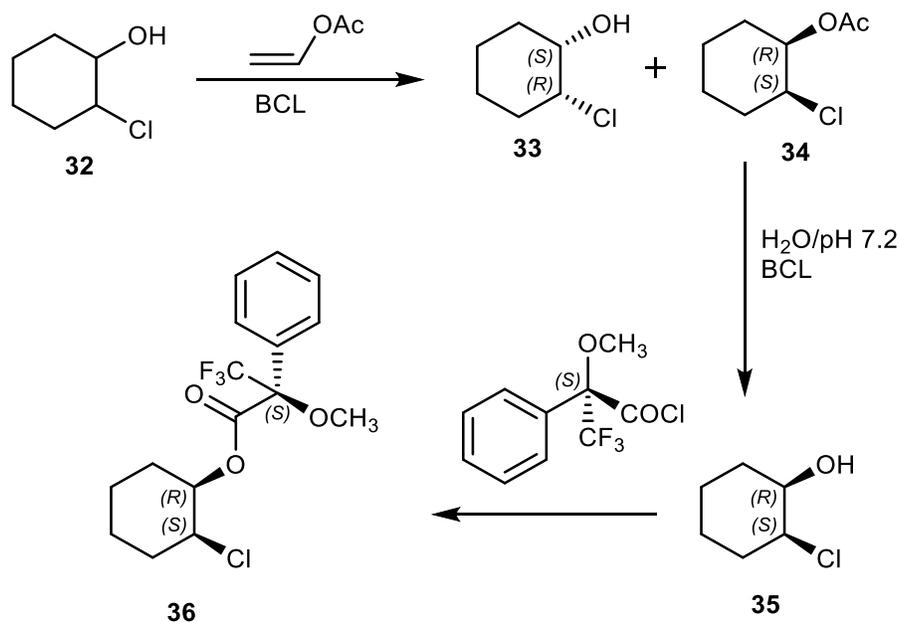


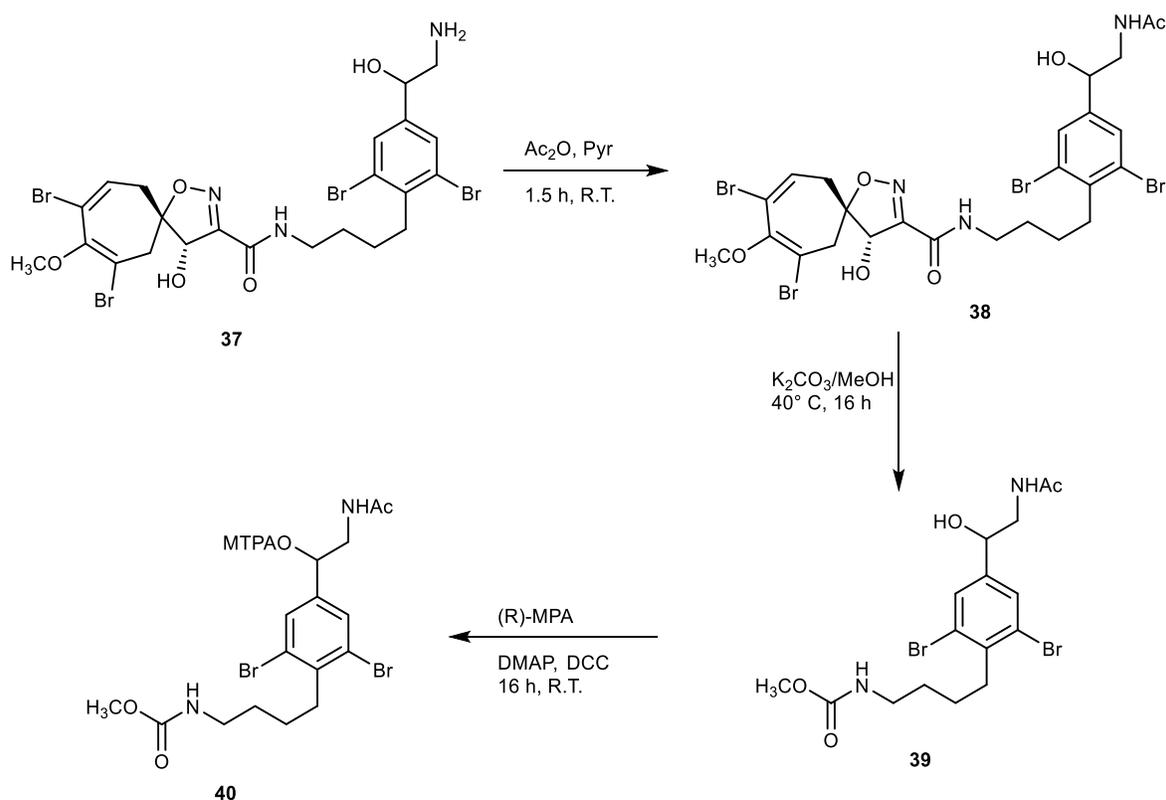
Figura 7: Molecula aislada de *Plakortis simplex* unida a un ácido de Mosher

En 2013, Kolodiazhnyi realizó una resolución de clorhidrinas utilizando bacterias como *Burkholderia cepacia* (BCL). Esta bacteria contiene una lipasa que lleva a cabo la resolución enzimática mediante la formación de un acetato en el alcohol de la clorhidrina. Así, la clorhidrina racémica **32** se sometió a un primer proceso de resolución enzimática, obteniéndose los diastereoisómeros **33** y **34**. A continuación se hidrolizó el enantiómero (R, S)-**34** (**Esquema 12**). Los enantiómeros así separados, se hicieron reaccionar con el ácido de Mosher (S) para obtener el respectivo exceso enantiomérico¹⁸.



Esquema 12: Clorhidrina unida al ácido de Mosher para llevar a cabo la determinación de la configuración absoluta.

Por último, en 2012, Garson y colaboradores obtuvieron derivados de la Psammaplisina aislados de la esponja marina balinesa *Aplysinella strongylata*, en donde uno de éstos, la Psammaplisina B (**37**) se acetiló para dar **38**, seguido de la hidrólisis conduciendo a **39** (**Esquema 13**). Para determinar la presencia de algún otro diastereómero, se utilizó el protocolo de Mosher, para lo cual se unió el ácido (R) de Mosher al derivado **39** y dar **40**, sobre el cual se hicieron las determinaciones¹⁹.



Esquema 13: Determinación de la configuración absoluta por el método de Mosher

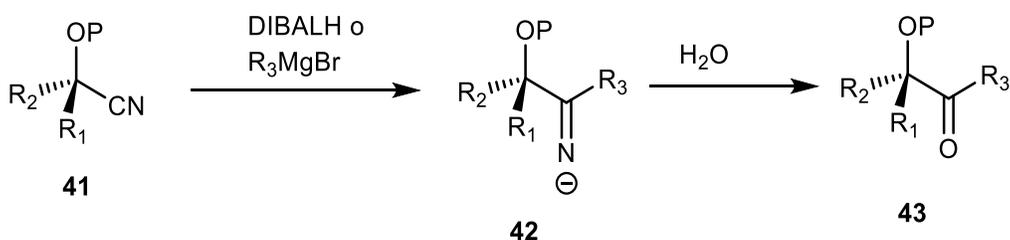
Mediante estos ejemplos se demuestra la utilidad de los ácidos de Mosher dentro de la química orgánica y en la elucidación de la configuración absoluta de productos naturales, así como la determinación del exceso enantiomérico en compuestos químicos que contengan alcoholes o aminas.

Síntesis de cianohidrinas con cianuro de trimetilsililo

Durante el desarrollo de este trabajo la materia prima indispensable fue la cianohidrina, la cual se utilizó en el desarrollo de la técnica de hidrólisis enzimática. Por lo cual, fue necesario obtener esta materia prima en suficiente cantidad para llevar a cabo dicha técnica.

A lo largo de los años, se han descrito varias síntesis donde se utiliza cianuro de trimetilsililo (TMSCN) para obtener cianohidrinas; se tienen métodos para obtener estas cianohidrinas tanto racémicas como quirales utilizando diferentes catalizadores. Las cianohidrinas contienen dos grupos funcionales: un nitrilo y un alcohol, estos dos grupos funcionales pueden ser transformados rápidamente en otros grupos funcionales, como es el caso el presente trabajo donde se convertirán a un ácido carboxílico y a un éter, respectivamente.

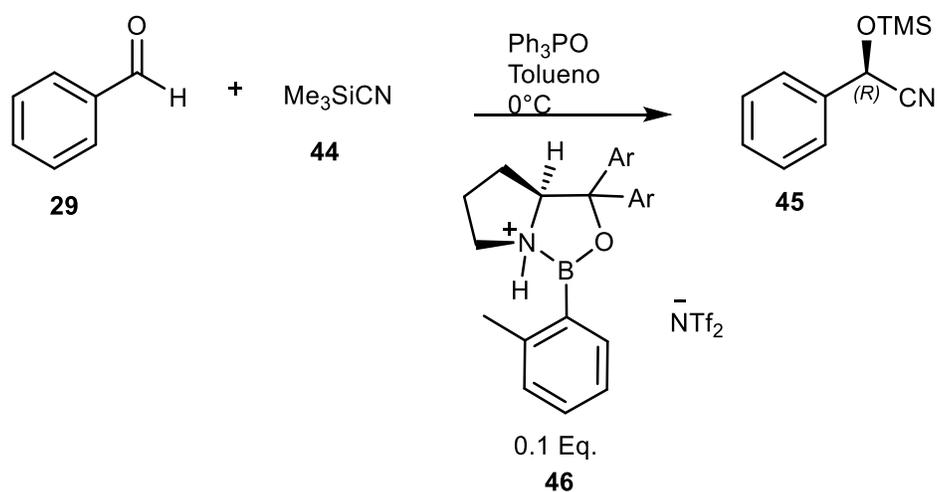
También la reducción de cianohidrinas proporciona α -amino alcoholes que están relacionados con moléculas como la adrenalina. La reducción se puede llevar a cabo sin racemización de la cianohidrina con DIBALH. Con el uso de nucleófilos como reactivos de Grignard se pueden obtener tanto aldehídos como cetonas (**Esquema 14**)²⁰.



Esquema 14: Adición de reactivos de Grignard y reducción con DIBALH

La síntesis se inició con la adición de TMSCN a trifluoroacetofenona para la obtención de una cianohidrina. En ese aspecto, se han descrito varios trabajos en donde se aborda la síntesis de una cianohidrina con la adición del cianuro de trimetilsililo (TMSCN) sobre la cetona, y para catalizarla se han utilizado diferentes ácidos de Lewis y catalizadores metálicos.

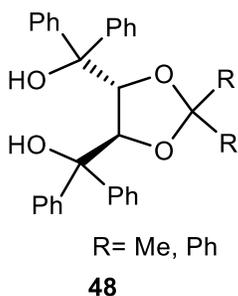
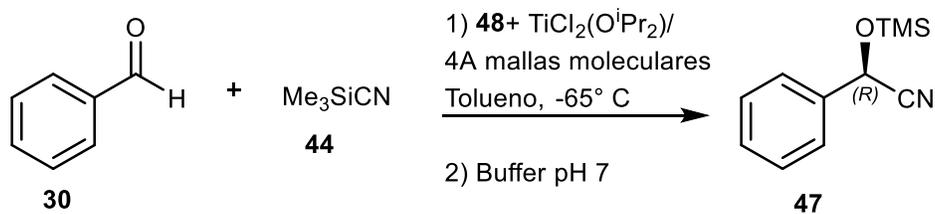
Entre los catalizadores que son de utilidad para la adición de TMSCN son los catalizadores quirales de boro. Estos como el mostrado en el **Esquema 15**, se utilizan para la adición asimétrica de TMSCN a un aldehído o cetona. En el caso del benzaldehído **29** la adición con el catalizador **46** proporciona la cianohidrina sililada en 94% de rendimiento y con exceso enantiomérico de 95%²¹.



Esquema 15: Adición asimétrica de TMSCN catalizada por boro

Otros sistemas catalíticos descritos en la literatura y que son los más ampliamente usados están basados en titanio. La mayoría de estos compuestos son preparados *in situ* mediante el tratamiento de tetraisopropóxido de titanio con el ligante. Esto provoca que el isopropanol liberado por la formación del complejo reaccione con el TMSCN para formar cianuro de hidrogeno *in situ*.

El primer ejemplo de reactivos para la cianosililación asimétrica fue descrito por Narasaka y colaboradores en 1988. Este grupo de investigación utilizó un diol quiral para la formación del complejo y llevar a cabo la reacción mostrada en el **Esquema 16**²².



Esquema 16: Síntesis de cianohidrinas utilizando catalizadores de titanio quirales.

Otro ejemplo más reciente es el complejo formado con tartrato de diisopropilo (DIPT) y tetraisopropóxido de titanio (**Figura 8**). La reacción se lleva a cabo en diclorometano a 0°C , esta metodología se probó con varios sustratos y se obtuvieron rendimientos entre 79 y 88% y excesos enantioméricos entre 60 y 91%²³.

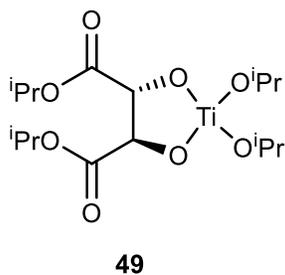


Figura 8: Complejo de DIPT con titanio

Se han empleados otros sistemas catalíticos, como los de vanadio y los heterobimetálicos de vanadio-titanio, sin embargo, se han estudiado menos que los de titanio (**Figura 9**)²⁴.

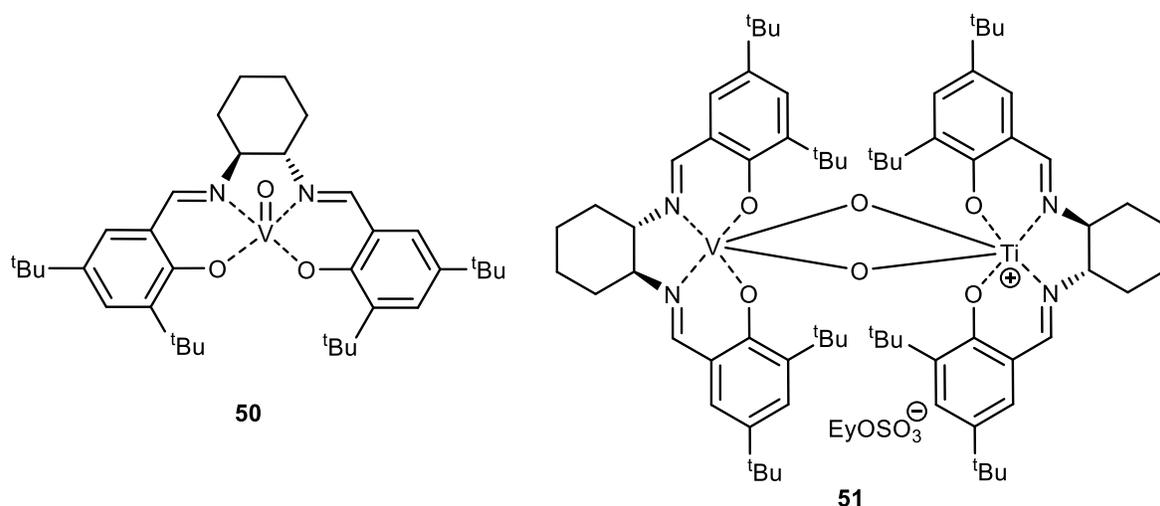


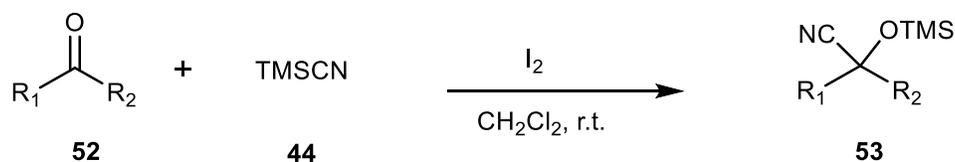
Figura 9: Catalizadores de vanadio y heterobimetalicos de vanadio titanio.

Estos son sólo algunos ejemplos de la gran cantidad de catalizadores que se han desarrollado para este tipo de reacciones de adición. Además de los ya mencionados existen catalizadores de aluminio, magnesio, estaño, itrio, entre otros. Estos últimos no han tenido el desarrollo tan amplio como los catalizadores de titanio y vanadio.

La gran importancia de las cianohidrinas radica en que sirven como bloques de construcción para muchas moléculas, debido a los dos grupos funcionales que poseen y que son fácilmente convertidos en otros grupos funcionales.

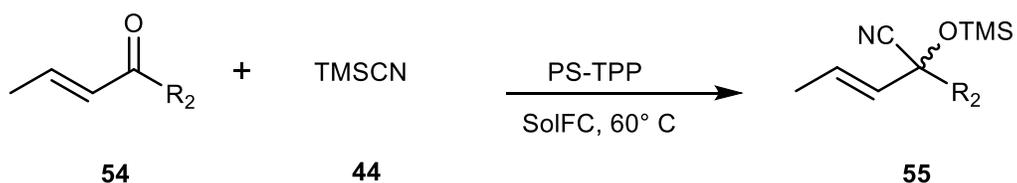
En contraposición, en muchas ocasiones los catalizadores metálicos llegan a ser muy costosos y generan residuos difíciles de disponer. Es por esto que se han creado metodologías libres de catalizadores metálicos que a continuación se exponen algunas de éstas.

En 2002, Yadav y colaboradores informaron la síntesis de cianohidrinas sililadas utilizando yodo como catalizador en una proporción de 5 mol%, utilizando como disolvente diclorometano a temperatura ambiente, realizando la adición del TMS-CN a 0°C (**Esquema 17**)²⁵, proporcionando el producto deseado como mezcla racémica en 80% de rendimiento.



Esquema 17 : Adición de TMS utilizando metodología de Yadav.

En 2013, Strappaveccia y colaboradores describieron otra metodología libre de catalizadores metálicos, utilizando trifenilfosfina soportada en poliestireno (PS-TPP) en una proporción de 5 mol%. Adicionalmente, esta metodología es libre de disolvente a una temperatura de 60 °C, generando el producto racémico deseado, con la ventaja de ser más amigable con el ambiente (**Esquema 18**)²⁶.



Esquema 18: Estrategia de síntesis descrita por Strappaveccia.

Muchas otras metodologías han sido informadas aparte de las ya mencionadas, durante el desarrollo de este trabajo de investigación se buscó la síntesis con el mejor rendimiento para tener materia prima en cantidad suficiente para llevar a cabo la hidrólisis.

Justificación

Debido a que el ácido α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético es un compuesto muy útil para la separación de mezclas racémicas y para la determinación de la pureza óptica, así como tener un precio elevado, por tanto es deseable tener una nueva ruta de síntesis barata y estereoespecífica.

Se conocen varias rutas sintéticas para obtener este compuesto, sin embargo no se obtiene ópticamente puro, lo cual limita sus posibilidades de uso. La compra de este compuesto en su forma ópticamente pura supone un gasto muy elevado. Además la separación de los enantiómeros es muy difícil y costoso. Con el método a desarrollar durante este trabajo de investigación tendríamos una ruta sintética más, para obtener uno solo de los enantiómeros, lo que haría a este compuesto mucho más barato de obtener y así podría extenderse su uso.

Para lograr la síntesis de los ácidos de Mosher a un precio menor, en este proyecto se propuso el uso de microorganismos que poseen enzimas específicas que ayudarán a la síntesis de este compuesto en buenos rendimientos y con una alta pureza óptica. Se ha comprobado que enzimas como las nitrilasas pueden hidrolizar nitrilos y que dan como producto sólo uno de los enantiómeros. Esto es una gran ventaja ya que los rendimientos informados son muy altos en la hidrólisis.

Aunque la materia prima a usar es una cianohidrina racémica, la enzima sólo utiliza como sustrato el enantiomero (R). Como modelo se empleó el ácido (R)-mandélico para optimizar el procedimiento y posteriormente se aplicó a la cianohidrina racémica obtenida que se usó como intermediario para la síntesis del producto final: el ácido de Mosher (ácido α -metoxi- α -trifluorometilfenilacético).

No se han informado nuevas síntesis para este compuesto en años recientes, no obstante el producto comercial tiene un costo muy alto y dependiendo de la forma en la que se compre, ya sea el cloruro del ácido o como ácido libre. El costo de un gramo de este producto es entre 3000 y 12000 pesos/gramo dependiendo su pureza. Además, si considera

que se utiliza de manera estequiométrica, ya nos da una idea del alto costo que tiene su uso.

Hipótesis

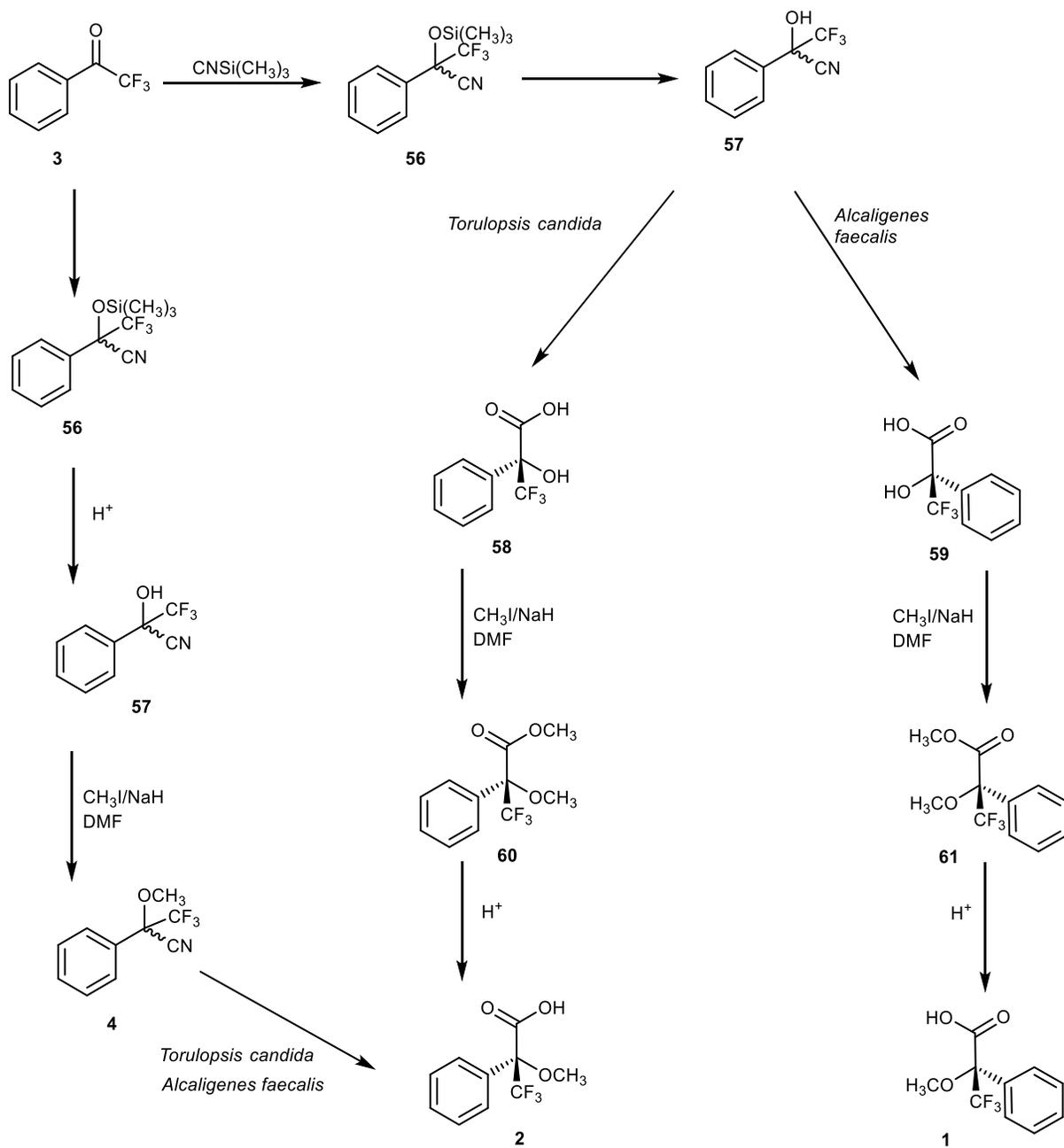
Se logrará la síntesis del ácido de Mosher ópticamente puro mediante la hidrólisis de una cianohidrina utilizando nitrilasas que serán obtenidas de los microorganismos *Alcaligenes faecalis* y *Torulopsis candida* (*Candida famata*) para obtener la estereoquímica deseada e introducir los grupos funcionales restantes mediante química orgánica, sin perder la estereoquímica deseada para la molécula.

Objetivos

Estudiar rutas enzimáticas de síntesis que permitan obtener los ácidos (+)-(S)- α -trifluorometilmetoxifenil acético y (-)-(R)- α -trifluorometilmetoxifenil acético por hidrólisis enzimática utilizando *Alcaligenes faecalis* y *Torulopsis candida*.

Estudiar y optimizar el proceso de síntesis y mejorar la técnica de hidrólisis asistida por microorganismos para obtener los mejores rendimientos posibles, con el fin de obtener el producto final en suficiente cantidad, y con las propiedades de pureza óptica satisfactorias que sean competitivas con los métodos ya conocidos.

Metodología



Esquema 19 Ruta sintética para obtener los ácidos de Mosher.

Estrategia sintética

- 1) A partir de la trifluoroacetofenona **3** se obtendrá la cianohidrina racémica protegida **56**, a través de una reacción de adición nucleofílica empleando cianuro de trimetilsililo.
- 2) Este compuesto **56** se someterá a desprotección bajo condiciones débilmente ácidas para obtener la cianohidrina **57**.
- 3) Una vez obtenido el compuesto **57**, se ensayará la hidrólisis enzimática de *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750 como se cita a continuación.
- 4) A partir de un cultivo puro, se sembrará por 20 horas a 32 °C en un medio que contendrá: acetato de amonio, extracto de levadura D-3, peptona, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O, NaCl y nitrilo como acetonitrilo o butironitrilo (pH = 7.2) para estandarizar las condiciones de reacción.
- 5) Las células serán colectadas por centrifugación, lavadas con agua estéril y suspendidas en 2240 mL de buffer de fosfato de potasio 0.1M (pH = 8.0).
- 6) A 100 mL de la suspensión celular anterior se adicionan 0.520% (p/v) del compuesto **57**.
- 7) Se incubarán por 4 horas con agitación constante a 32 °C ± 1 °C.
- 8) Durante el proceso se controlará pH, se determinará la morfología colonial y microscópica.
- 9) Una vez concluido este tiempo las células serán removidas por centrifugación.
- 10) El sobrenadante será lavado con éter, a la fase acuosa se le ajustará el pH a 1.5 con HCl, y el producto se extraerá con éter y será secado a presión reducida.

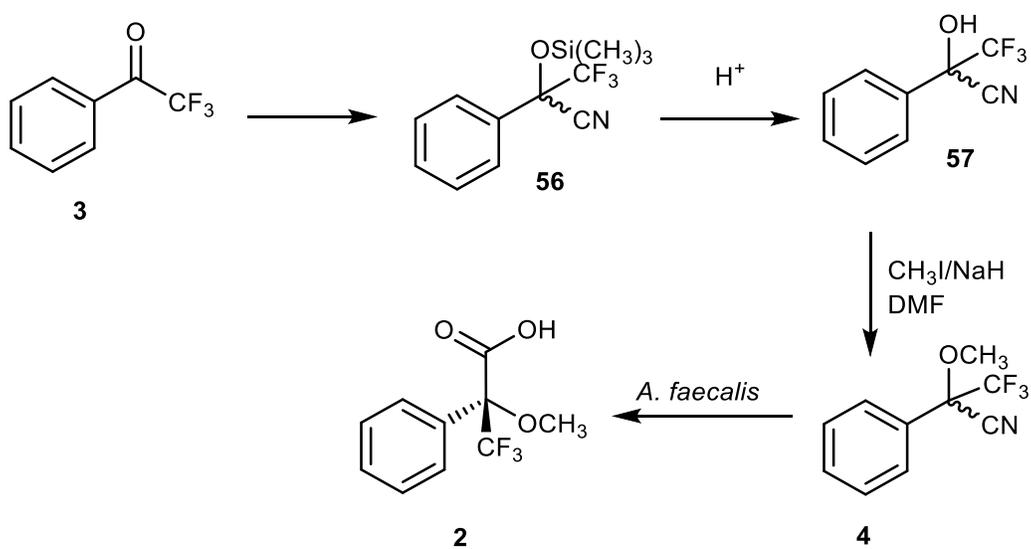
11) Finalmente se obtendrá el éster **58** y **59** mediante la adición de CH_3I al producto **60** y **61** en presencia de NaH en DMF anhidra.

12) Mediante una hidrólisis ácida se obtendrán los compuestos **1** y **2**.

Ruta sintética alternativa.

1. A partir de la cianohidrina racémica se realizará la metilación del hidroxilo.

2. Se continuará con los pasos 3 al 12.



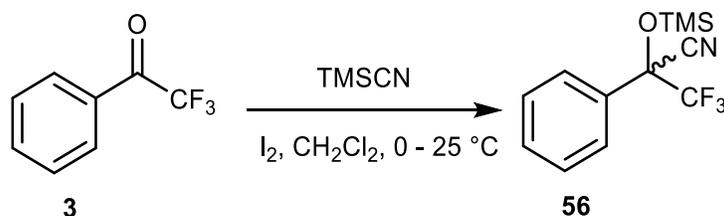
Esquema 20: Ruta alternativa para obtención de los ácidos e Mosher.

Metodología microbiológica.

1. El microorganismo fue adquirido de la colección ATCC con lo que se aseguró su pureza y que cuenta con las enzimas deseadas para este proyecto.
2. Se acondicionó al microorganismo sembrándolo en tubos de TSA y verificando su pureza sembrando en placas, estos se incubaron a $35^{\circ} \pm 1^{\circ}$ durante 24 h.
3. Posteriormente, se sembró el microorganismo en un medio que estimuló la producción de la enzima, el cual contiene acetato de amonio, extracto de levadura, peptona de carne, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl y un nitrilo lineal de cadena corta como es el butironitrilo (3g/1000 mL) que estimulara la producción de la enzima.
4. Se dejaron crecer las bacterias en el medio anterior durante 24 h y se centrifugaron, éstas se resuspendieron en un buffer de fosfatos y se agregó el sustrato al medio de reacción, se incubó a $35^{\circ}C$ durante 4 h y se removieron las células mediante centrifugación.

Resultados y discusión

Para llevar a cabo la síntesis de la cianohidrina racémica, primero se utilizó la metodología descrita por Yadav²⁷, empleando yodo molecular como catalizador, como disolvente se utilizó diclorometano, se agregó el cianuro de trimetilsililo a 0 °C y se dejó en agitación durante 4 h.



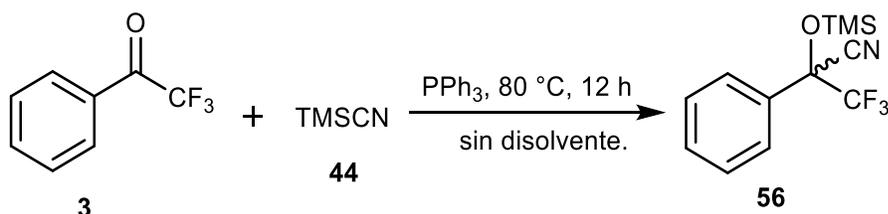
Esquema 21: Síntesis de Yadav

Sin embargo esta metodología no fue efectiva para llevar a cabo esta transformación para lo que se procedió a hacer modificación de la misma, como lo muestra la Tabla 1:

Tabla 1: Ensayos para la adición de TMS-CN con yodo.

Temperatura	Tiempo (h)	Rendimiento
0°	4	No hubo reacción.
	24	
Temperatura ambiente	4	No hubo reacción.
	24	
40° C	4	No hubo reacción.
	34	

Al no obtener resultados positivos se utilizó la metodología descrita por Strappaveccia²⁶. Aunque se logró la obtención de la cinohidrina racémica no se logró determinar el rendimiento debido a la descomposición del producto y la imposibilidad de separar las impurezas del producto mayoritario, durante el proceso de purificación.



Esquema 22: Síntesis de **57** empleando el método de Strappaveccia

Por lo tanto, se utilizó el crudo de reacción para llevar a cabo la desprotección de la cianohidrina. Para ello se probaron varios métodos (**Tabla 2**): la desprotección con fluoruro de tetrabutilamonio, en THF a temperatura ambiente, pero no procedió; también fueron ensayadas las condiciones descritas en trabajos previos, utilizando AlCl₃ y CuSO₄²⁸, estas desprotecciones tampoco produjeron resultados positivos, otro método fue hacer la desprotección con una cantidad catalítica de ácido clorhídrico, en metanol a temperatura ambiente y a 70 °C, pero tampoco se tuvo los resultados esperados. Por último, se probó una desprotección con ácido cítrico (0.3 eq. mol) en metanol, la cual sí se llevó a cabo obteniendo el producto desprotegido. Este producto se ser aisló y se determinó el rendimiento global para ambas reacciones de 68% para la adición de TMSCN y desprotección.

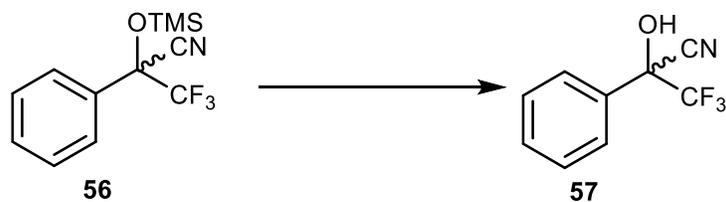
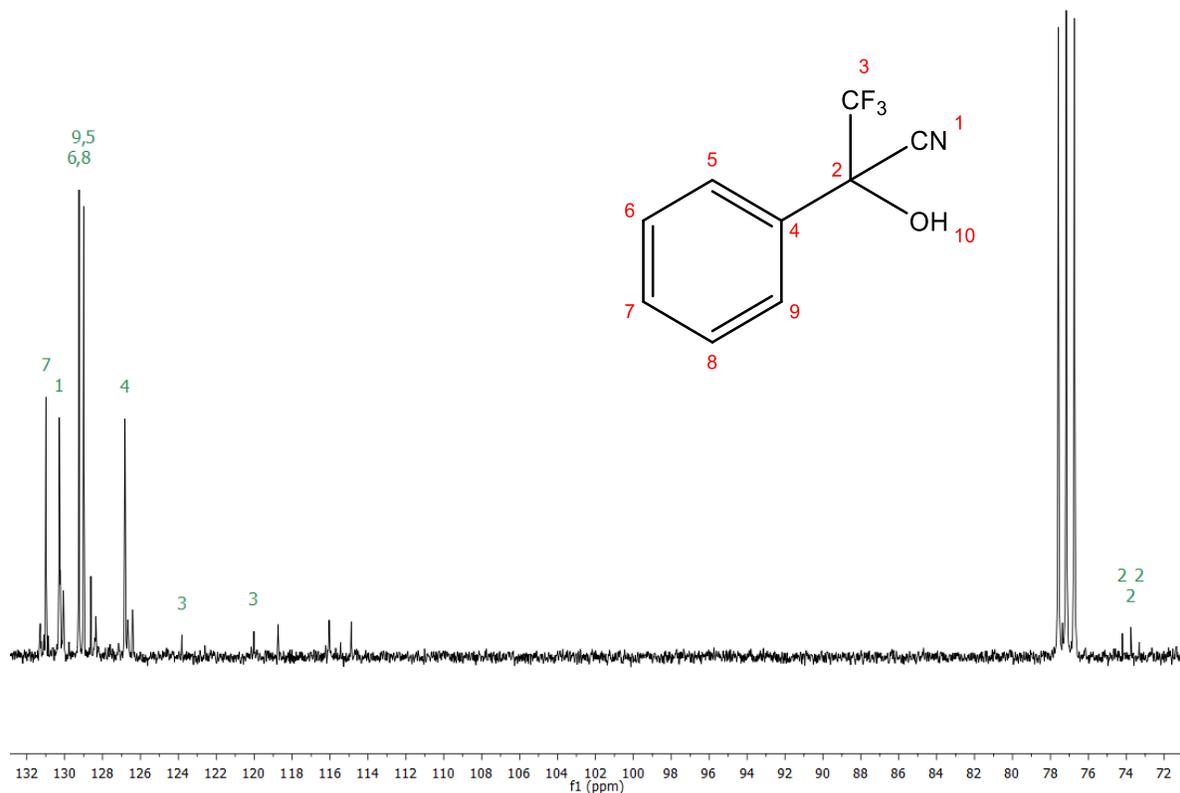


Tabla 2: Ensayos de desprotección de la cianohidrina **56**.

Condiciones de reacción.	Rendimiento
THF, TBAF, t.a.	No procedió
MeOH, HCl cat., t.a	No procedió
MeOH, HCl cat., 70°	No procedió
MeOH, Ác. Cítrico, 70°	68% por ambas reacciones.

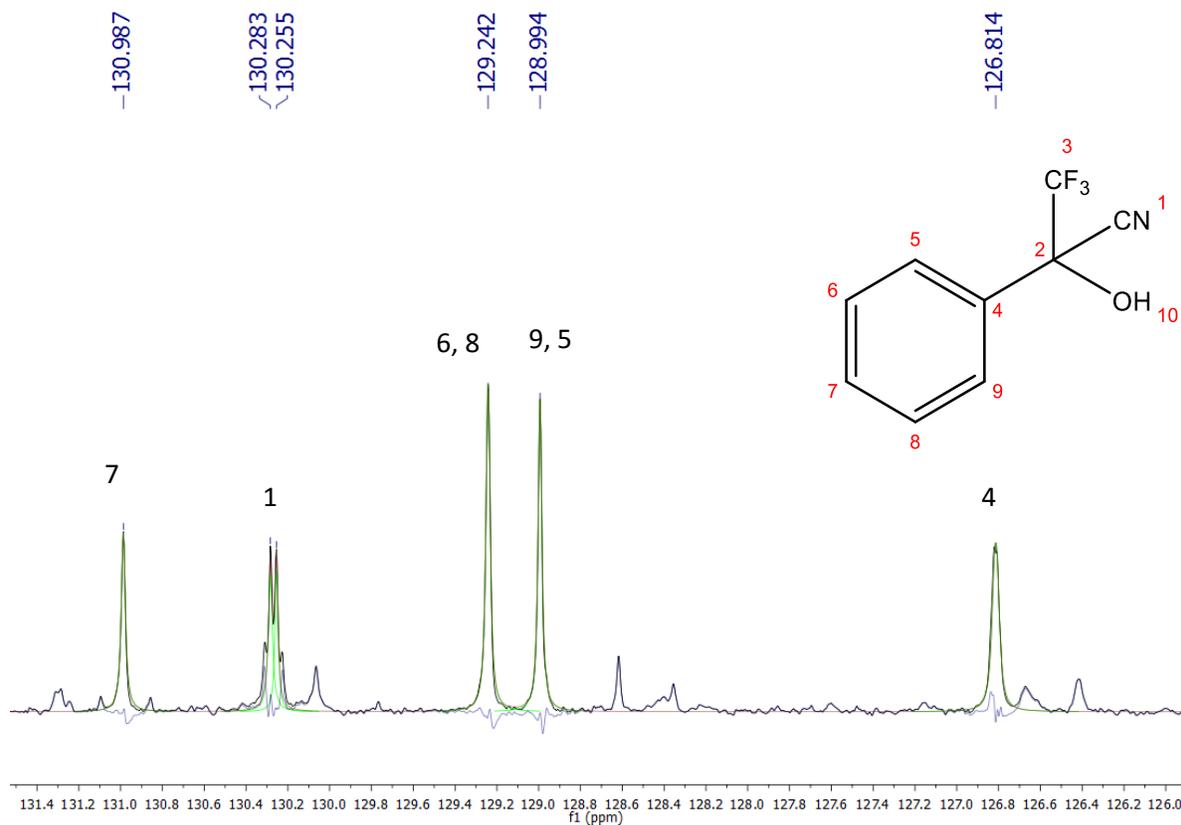
Para llevar a cabo la identificación del compuesto obtenido fue importante la obtención del espectro de carbono RMN-¹³C, ya que el de hidrógeno (RMN-¹H) no proporcionaba información suficiente sobre la estructura del producto. Por lo tanto, se determinaron las señales de los carbonos que estaban acoplados al flúor del trifluorometilo y, con base en las constantes de acoplamiento obtenidas, analizar si se llevó a cabo la reacción.

En la siguiente imagen se puede observar el espectro de RMN-¹³C completo y se analizaron todas las señales para saber a qué carbono pertenece cada una de ellas con base en la constante de acoplamiento con el flúor.



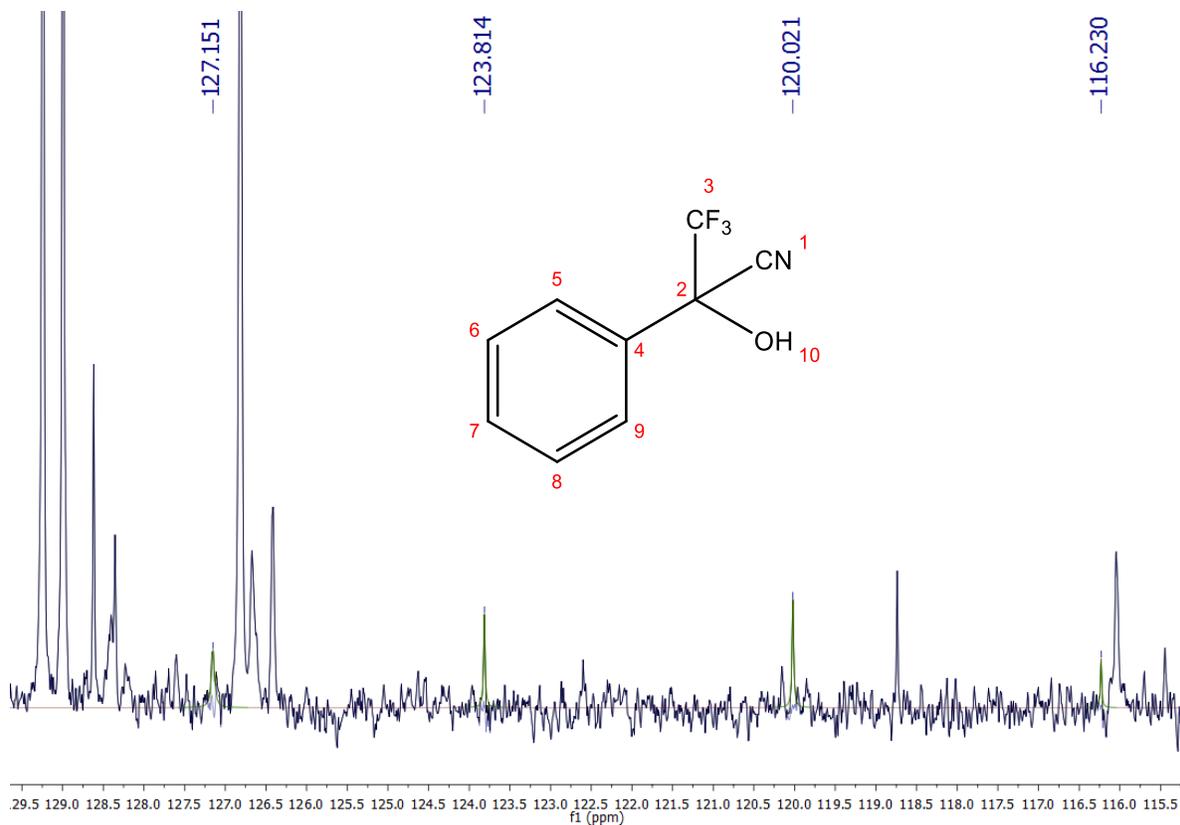
Espectro 1: RMN-¹³C (75 MHz, CDCl₃) de la cianohidrina racémica **57**.

En la región de 126 a 131 ppm se presentan cinco señales que corresponden a los carbonos del anillo aromático y del nitrilo. La señal en 126.8 ppm corresponde al carbono ipso C-4, las señales de 128.9 ppm y 129.2 ppm corresponden a los carbonos 5, 9 y 6, 8, respectivamente. La señal que se encuentra acoplada como un cuarteto, con los tres átomos de flúor, en 130.2 ppm corresponde al carbono del nitrilo el cual tiene una constante de acoplamiento pequeña ($J = 2$), por último, la señal de 130.9 ppm corresponde al carbono C-7.



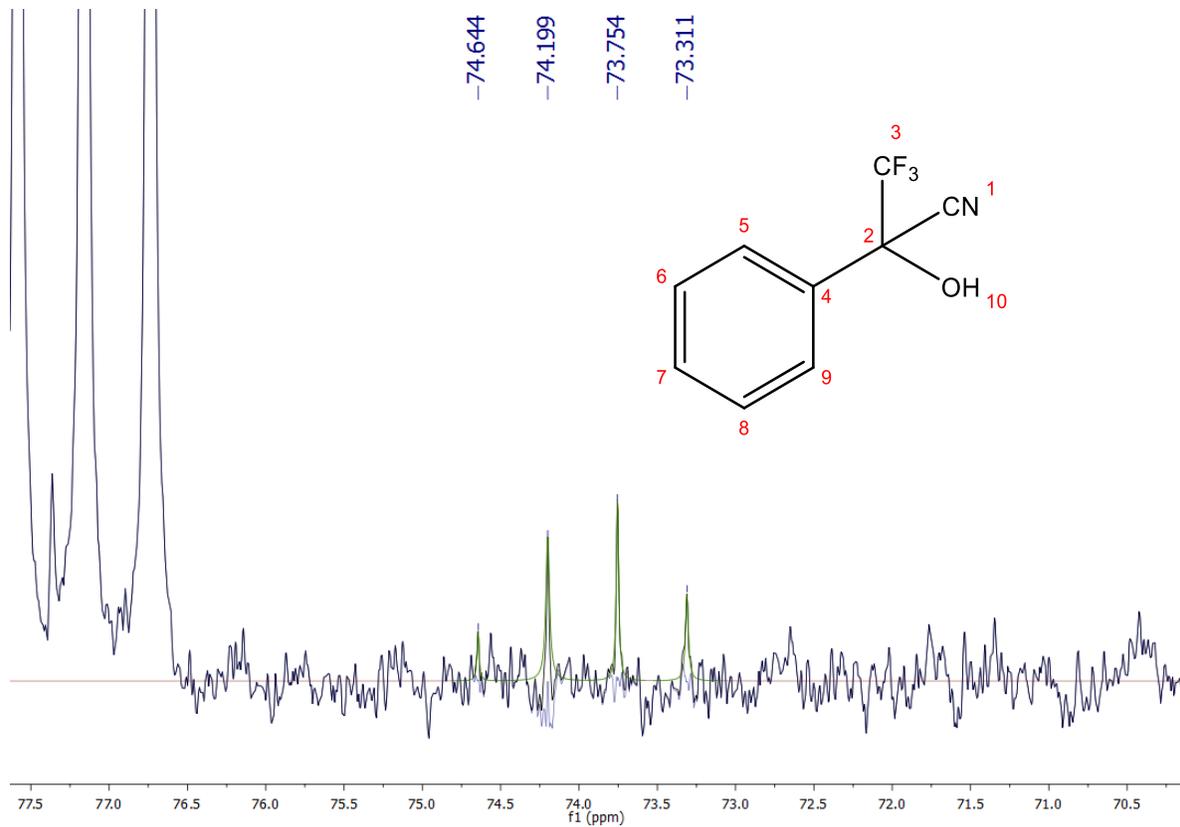
Espectro 2: Ampliación del espectro de RMN- ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de la región de los carbonos aromáticos de la cianohidrina y el nitrilo.

A continuación se debe buscar la señal del carbono correspondiente al trifluorometilo. Esta debe ser un cuarteto con un acoplamiento grande con el flúor. Es así que se encontraron las cuatro señales en 127.1 ppm, 123.8 ppm, 120.0 ppm y 116.2 ppm que tienen una constante de acoplamiento de 288 Hz, lo cual es indicativo de que es el carbono del trifluorometilo y se acopla con los tres átomos de flúor a los que se encuentra directamente unido.



Espectro 3: Ampliación de la región 115-130 en donde se encuentran las señales de carbono acopladas a flúor para el carbono C-3.

La última señal que se debe localizar es la señal del carbono cuaternario la cual indica que se llevó a cabo la adición del cianuro a la trifluoroacetofenona. Este carbono, por el acoplamiento con el flúor, presentará un cuarteto con una constante de acoplamiento de 74 Hz. Estas señales se encuentran en 73.3, 73.7, 74.2 y 74.6 ppm, y que corresponden al carbono C-2 de la molécula y con la constante de acoplamiento confirma que se trata del carbono cuaternario.



Espectro 4: Ampliación de la región donde se observa el carbono cuaternario de la cianohidrina acoplado a flúor para el carbono C-2.

Utilizando el método microbiológico anteriormente descrito se procedió a llevar las pruebas con la cianohidrina racémica sintetizada mediante la metodología, para lo cual se tomó como referencia el artículo de Yamamoto¹⁰. Esta metodología se ensayó a varias temperaturas y pH que se ilustran en la Tabla 3, los experimentos se realizaron por triplicado y la cepa se resemebraba constantemente para evitar la contaminación en los medios.

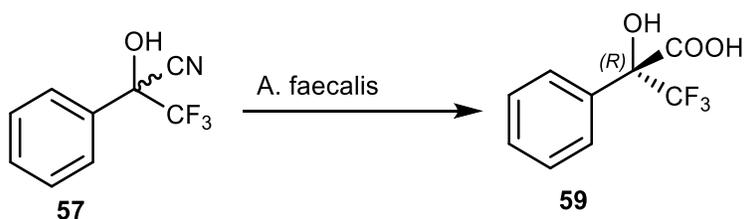


Tabla 3: Ensayos de la hidrólisis de la cianohidrina **57** con *A. faecalis*.

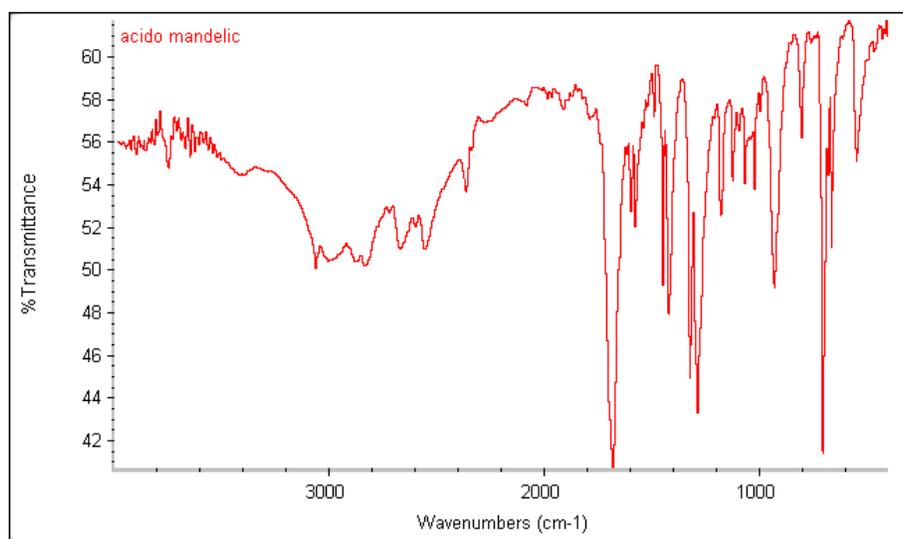
Temperatura	Tiempo de incubación (h)	pH	Rendimiento
37°	4	8	No procedió
		7	
		6	
32°	4	8	No procedió
		7	
		6	
37°	24	8	No procedió
		7	
		6	
32°	24	8	No procedió

Debido a la falta de resultados positivos, se procedió a verificar el método original empleando mandelonitrilo usando exactamente las condiciones que indica el artículo de Yamamoto¹⁰. Bajo estas condiciones se obtuvieron cristales blancos a los que se les realizó Infrarojo, el cual coincidió por completo con el informado en la literatura.

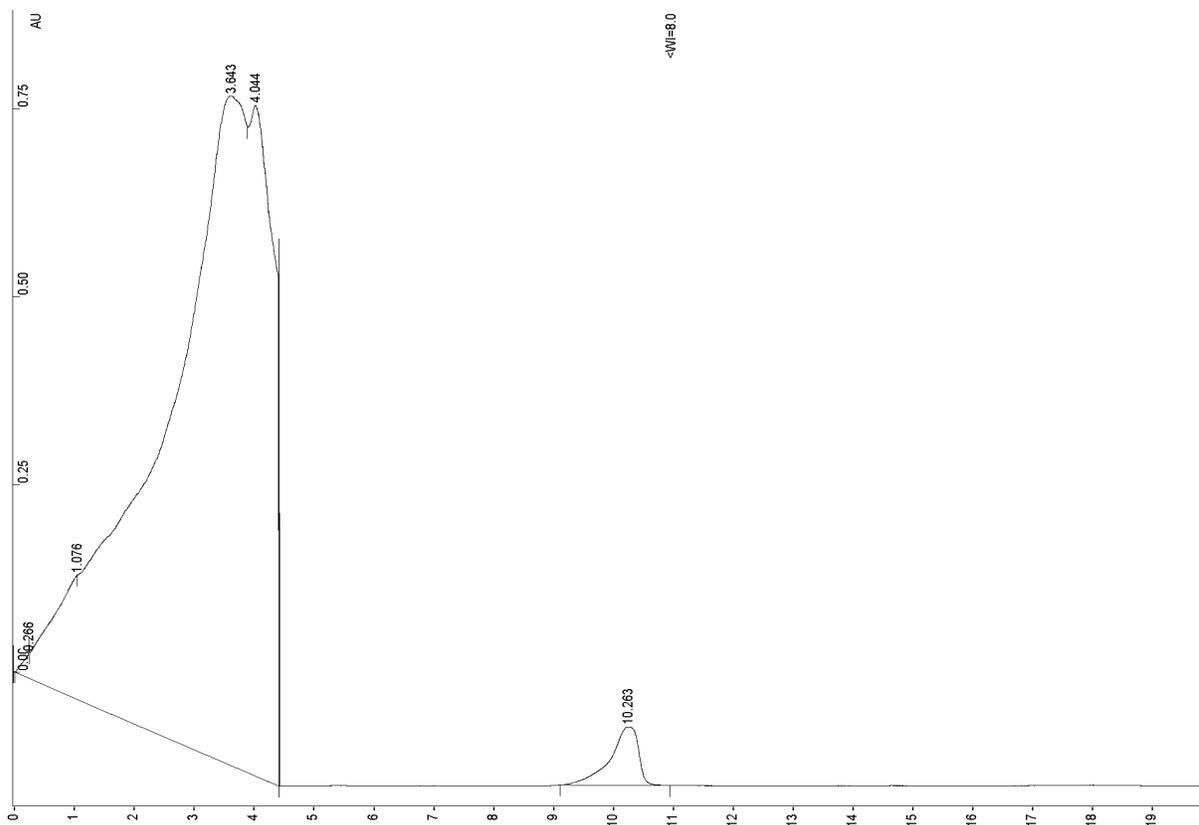
Tabla 4: Ensayos de la hidrólisis del mandelonitrilo con *A. faecalis*.

Temperatura	Tiempo de incubación (h)	pH	Rendimiento
32°	4	8	25%
	24		No se determinó
37°	24	8	64%

La reacción se analizó por HPLC en una columna C18 y se determinó, con base en la integración del área bajo la curva.



Espectro 5: Espectro del mandelonitrilo obtenido de la muestra hidrolizada con *A. faecalis*.



Cromatograma 1: Cromatograma del crudo de reacción de la hidrólisis del mandelonitrilo.

Variaciones de la metodología

Cantidad de medio de crecimiento y buffer para la reacción.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los primeros experimentos se realizaron a 37 °C, en donde se afinó la técnica para llevar a cabo la reacción, durante las pruebas realizadas se probaron diferentes cantidades de medio para el cultivo de las células y diferentes cantidades del buffer de reacción (**Tabla 5**).

Tabla 5: Volúmenes probados para el cultivo de *A. faecalis* y volúmenes probados de buffer para la hidrólisis.

<i>Cantidad de medio</i>	250 mL	100 mL	
<i>Cantidad de buffer</i>	100 mL	50 mL	10 mL

De estos experimentos se observó que el mejor crecimiento se obtuvo usando 100 mL de medio. De este medio se centrifugaban las células para agregarlas al buffer. Así

mismo, cuando se utilizaban 10 mL de buffer de fosfatos a pH 8 las células no lograban suspenderse completamente, caso que se repetía utilizando 50 mL de buffer, con 100 mL se suspendían las células adecuadamente para llevar a cabo la reacción.

Codisolvente

Debido a la falta de reactividad durante los primeros experimentos se pensó que podría deberse a la poca solubilidad del sustrato, por lo cual se procedió a llevar a cabo la solubilidad con un codisolvente; por lo que se probaron dos codisolventes, el acetonitrilo y al butironitrilo. Sin embargo, se optó por el butironitrilo porque es el compuesto que se utiliza en el medio para inducir la presencia de nitrilasas. Se utilizó la mínima cantidad para disolver el compuesto. Sin embargo, no hubo reacción.

Efecto del pH

Al no ver reactividad, se probaron otros pH. Debido a que la materia prima tiende a descomponerse se intentó llevar a cabo a pH de 6 y 7. Se eligieron estos pH para tener una referencia de un pH neutro y un pH ligeramente ácido, las pruebas con estos pH no dieron resultados diferentes a los obtenidos a pH 8.

Temperatura

En la metodología original se había planteado llevar a cabo la reacción a 32 °C sin embargo, esta bacteria tiene un buen intervalo de resistencia y crecimiento a diferentes temperaturas como al utilizarla a 37 °C. Por lo tanto, se utilizó esta última temperatura.

Llevando a cabo las variaciones anteriores, se optó por realizar la reacción original a 32 °C. Sin embargo, el cambio de temperatura tampoco produjo resultado positivo, aun así se optó por repetir los experimentos variando las condiciones de pH como se ilustra en la **tabla 3**; no obstante, en todos se recuperó la materia prima.

Reactividad.

Las enzimas son muy sensibles a factores electrónicos o estéricos y por lo tanto influyen en la reactividad del sustrato, dado que el sustrato que se utilizó es mucho más voluminoso por la presencia del trifluorometilo, en comparación con el mandelonitrilo que sólo posee un hidrógeno. Además, en el mecanismo propuesto de reacción se observa la formación de dos puentes de hidrógeno con el nitrógeno del nitrilo que son esenciales para llevar a cabo la reacción, sin embargo la densidad electrónica en el nitrógeno está disminuida por la presencia de un grupo trifluorometilo.

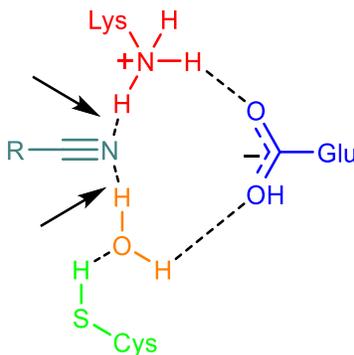
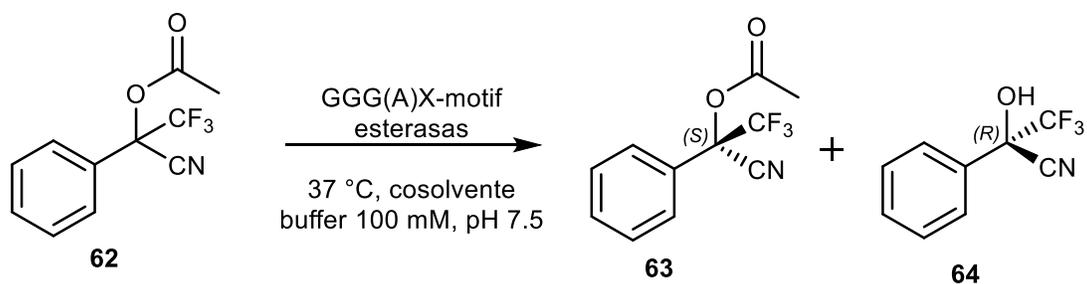


Figura 10: Formación de puentes de hidrogeno en sitio catalítico de la enzima.

Otros experimentos mostraron que la resolución de una cianohidrina racémica se puede llevar a cabo mediante otro tipo de enzimas como esterasas que en el sitio activo tienen tres glicinas o dos glicinas y una alanina (**GGG(A)X**), son obtenidas de algunos microorganismos o esterasas recombinantes²⁹. Estas esterasas son capaces de catalizar la reacción de hidrólisis del éster ya que tienen en el sitio activo tres glicinas o dos glicinas y una alanina; este sitio activo está relacionado a la habilidad de hidrolizar ésteres de alcoholes terciarios.



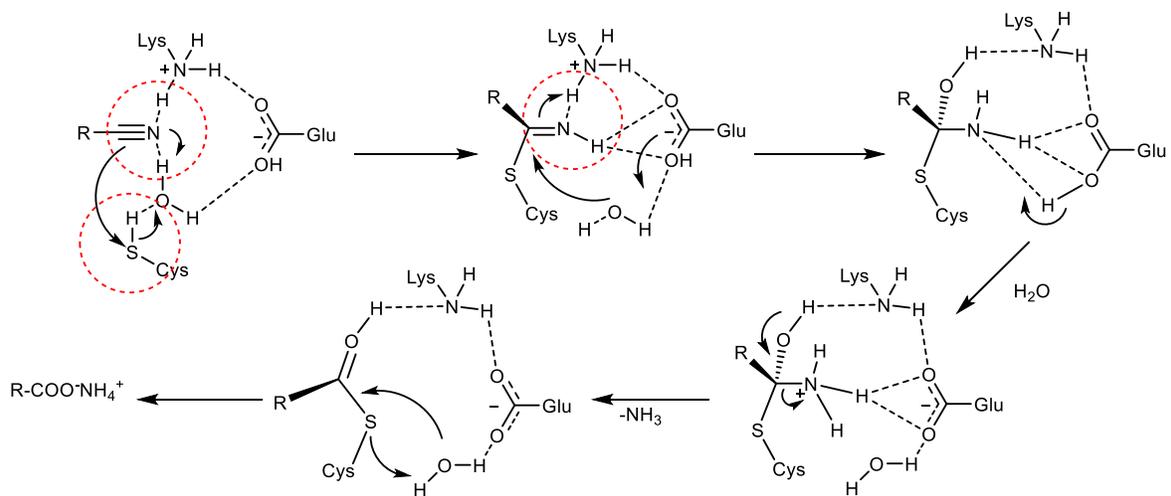
Esquema 23: Resolución de un precursor del ácido de Mosher utilizando esterasas.

Esta secuencia de aminoácidos es esencial para la hidrólisis de sustratos terciarios como los probados en estos experimentos, otras esterasas no pueden hidrolizar este tipo de sustratos terciarios.

Sin embargo estas esterasas **GGG(A)X** son aisladas de microorganismos completamente diferentes como por ejemplo *Pyrobaculum calidifontis* o *Pseudomonas putida* o son aisladas de metagenoma. Otras enzimas recombinantes son utilizadas como por ejemplo esterasa de hígado de puerco. Estas enzimas llevan a cabo una reacción totalmente diferente a aquella llevada a cabo por la bacteria probada y son capaces de utilizar sustratos terciarios y tener buena enantioselectividad. Con estas enzimas si es posible resolver un racemato de la clase que se estudió durante el desarrollo de este trabajo²⁹.

Cálculos teóricos.

Se realizaron cálculos del potencial electrostático. Al observar los potenciales electrostáticos se observa que en el átomo de nitrógeno del nitrilo (**Figura 11**) hay una disminución de la densidad electrónica a causa de la presencia del grupo trifluorometilo, el cual atrae la densidad electrónica por la presencia de los tres átomos de fluor. Esta disminución de la densidad electrónica puede interferir con la formación de los puentes de hidrógenos necesarios para la hidrólisis del nitrilo (**Esquema 24**). Las enzimas, como se ha mencionado anteriormente tienen gran sensibilidad a impedimentos estéricos, el aumento de volumen por el grupo trifluorometilo también puede interferir en la unión de la molécula a la enzima. Es posible observar que el fenilo tiene un ángulo muy diferente en el sustrato trifluorometilado (**A**) y en el mandelonitrilo (**B**) (**Figura 11**).



Esquema 24: Mecanismo de hidrólisis con una nitrilasa.

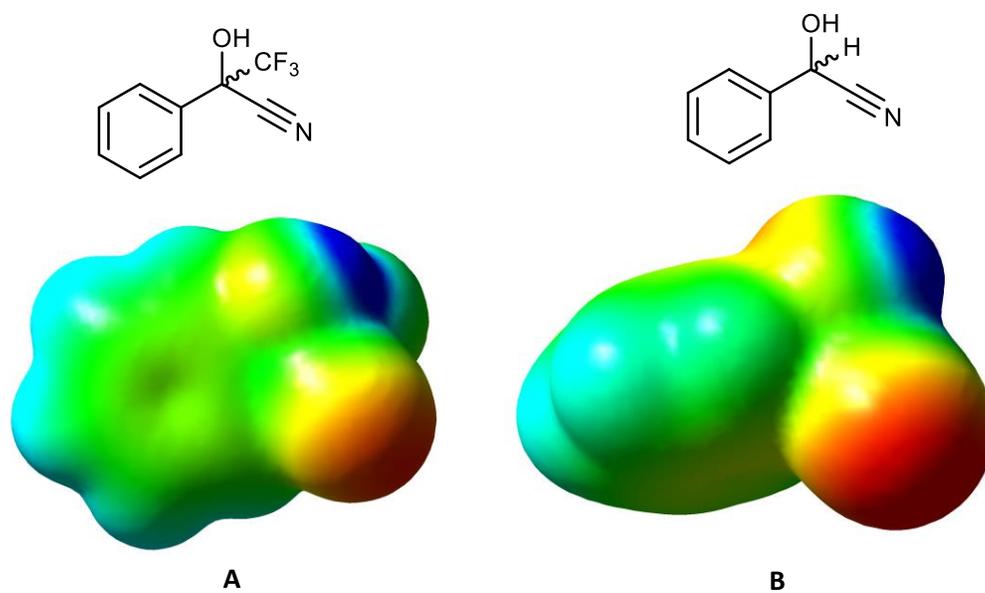


Figura 11: Potencial electrostático en la molécula modelo mandelonitrilo **B**, y en molécula problema **A**, realizada con una isosuperficie de 10^{-3} en Gaussian 02 Rev. D.01.

Distancias de enlace e índices de Wiberg

En cuanto a las distancias de enlace y los índices de Wiberg, no se observa algún cambio significativo. La energía de deslocalización $E(2)$ del par de electrones libre del átomo de nitrógeno es ligeramente más grande en el compuesto **66** (11.5 Kcal/mol), ocasionando que dicho par electrónico esté quizá menos disponible para formar algún puente de hidrógeno dentro del sitio activo de la enzima. Estos últimos datos se esquematizan en la **Figura 13**. Sólo se muestran las distancias de enlace e índices de Wiberg para los enlaces que creemos juegan algún papel dentro del mecanismo de hidrólisis.

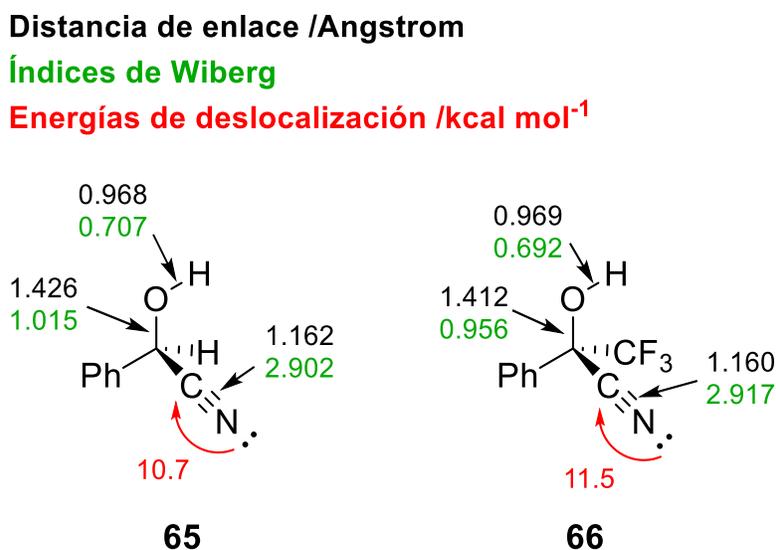


Figura 12: Distancias de enlace dadas en Angstroms (números en negro). Índices de Wiberg (números en verde). Las energías de deslocalización (números en rojo) se presentan en kcal/mol, las flechas curvas indican la deslocalización del par de electrones del átomo de nitrógeno hacia el orbital de anti-enlace adyacente C-C.

Dentro de la estructura optimizada para el compuesto **66**, se observa una distancia de 2.39 Å entre el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo y uno de los átomos de flúor, indicando la posible formación de un puente de hidrógeno entre estos átomos (**Figura 13**), disminuyendo la posibilidad de este átomo de hidrógeno para formar algún puente dentro del sitio activo de la enzima. Esta observación también se soporta con el índice de Fukui encontrado anteriormente.

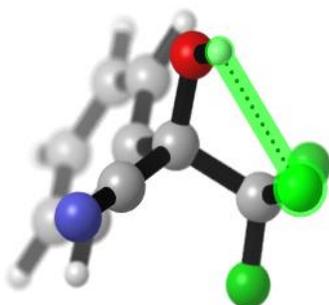


Figura 13: Posible formación de puente de hidrógeno para el compuesto trifluorometilado.

Para tener una idea acerca de la distribución de densidad de carga eléctrica, se calcularon los potenciales electrostáticos mapeados sobre la isosuperficie de densidad electrónica para ambos compuestos (**Figura 14**).

Se observa que para el compuesto trifluorometilado **B** disminuye la densidad de carga sobre el átomo de nitrógeno, soportando la baja posibilidad de que el par de electrones sobre dicho átomo forme alguna interacción dentro del sitio activo de la enzima.

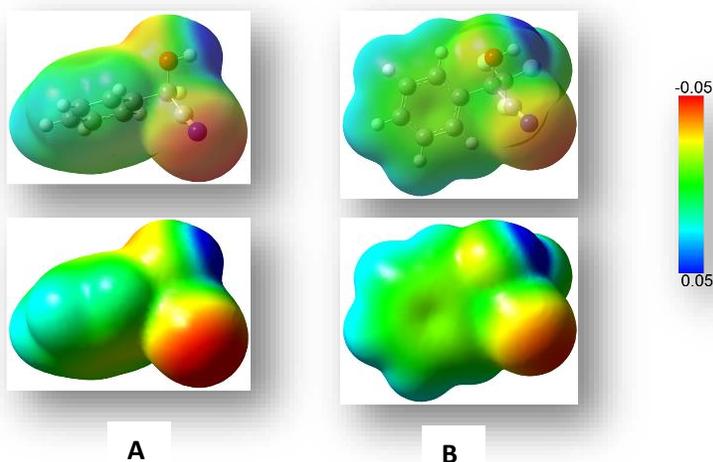


Figura 14: Potenciales electrostáticos mapeados sobre la isosuperficie de densidad electrónica para los compuestos **A** (mandelonitrilo) y **B** (sustrato trifluorometilado).

Conclusiones.

- Se logró la síntesis de una cianohidrina racémica, mediante la adición de cianuro de trimetilsililo en rendimiento de 68%.
- Se llevó a cabo el estudio sobre una molécula modelo utilizando mandelonitrilo para descartar fallas al llevar a cabo la metodología.
- La síntesis del hidroxiaácido del ácido de Mosher no pudo llevarse a cabo.
- Con ayuda de los cálculos teóricos y basándonos en el mecanismo de reacción propuesto se llega a la conclusión que la formación de los productos **1** y **2** no estaba favorecida, la electronegatividad del trifluorometilo en **57** puede llegar a impedir la formación de los puentes de hidrógeno necesarios para llevar a cabo la hidrólisis enzimática.
- Los cálculos teóricos muestran una disminución de la densidad electrónica del átomo de nitrógeno del nitrilo en **57**, esta deficiencia en la densidad electrónica es causada por la presencia del trifluorometilo y puede impedir la unión a la enzima a través de los puentes de hidrogeno.
- También se encontró con los cálculos teóricos, que es posible la formación de un puente de hidrogeno con un átomo de flúor; esto dificulta disminuiría la posibilidad de formar puentes de hidrógeno con la enzima y de esta manera hidrolizar el nitrilo.
- El carácter electrofílico del átomo de carbono del nitrilo se ve disminuido en **57**; al observar el mecanismo de reacción es notorio que este carbono necesita tener cierto carácter electrofílico para poder llevar a cabo la reacción enzimática.
- La hidrólisis con *A. faecalis* de **57**, no pudo llevarse a cabo debido a que los impedimentos estéricos y electrónicos dificultarían la unión a la enzima, es por esto que al final de la reacción se recuperaba la materia prima.
- Aun con las modificaciones a la metodología, como la modificación del pH, la temperatura de incubación, no fue posible llevar a cabo la hidrólisis de la cianohidrina **57** con *A. faecalis*, fue posible reproducir el experimento original con mandelonitrilo, sin embargo, la hidrólisis con la cianohidrina sintetizada no fue posible.

- Existen pocos ejemplos en la literatura de hidrólisis de sustratos cuaternarios con enzimas aisladas de bacterias o utilizando la bacteria completa. Estas transformaciones pueden tener un buen exceso enantimérico pero con rendimientos usualmente bajos²⁹.
- Las enzimas aisladas de metagenoma o recombinantes también han sido utilizadas para la hidrólisis de nitrilos, sin embargo, debido a la complejidad que implica utilizar este tipo de enzimas, además de que es necesario modificar enzimas, no sería práctico utilizarlas.

Sugerencias y perspectivas.

- Llevando a cabo una revisión bibliográfica se encontró que reacciones similares han sido llevadas a cabo mediante otras enzimas como esterasas **GGG(A)X**²⁹, algunas de las cuales son esterasas recombinantes ya que las enzimas naturales en ocasiones no son capaces de llevar a cabo esta transformación debido al gran impedimento estérico.
- Realizar un estudio con cepas que tengan actividad hidrolítica de grupos nitrilo pero que puedan llevar a cabo la reacción en un carbono cuaternario.

Parte experimental

Los espectros infrarrojos (**IR**) se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 2000 serie FT-IR a través de la técnica de pastilla de KBr. Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H) se obtuvieron en un equipo Bruker (300 MHz), los desplazamientos químicos están dados en partes por millón (ppm) y se empleó tetrametilsilano como referencia externa. Los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono-13 (RMN-¹³C) se obtuvieron en los mismos equipos, trabajando a frecuencias de 75.4 MHz, empleando cloroformo deuterado (CDCl₃) como disolvente.

La cromatografía en capa fina (CCF) se realizó sobre láminas de aluminio revestidas de gel de sílice E. Merck 60F-254, las cuales fueron reveladas con lámpara de luz ultravioleta de onda corta o con yodo sublimado. La purificación por cromatografía en columna se llevó a cabo utilizando silica-gel Natland 230-400 mallas.

La descripción de los espectros es de la manera siguiente: IR (fase): ν en cm^{-1} . RMN-¹H (frecuencia, disolvente): desplazamiento químico (multiplicidad, constante de acoplamiento en Hz, número de hidrógenos, asignación); RMN-¹³C (frecuencia, disolvente): desplazamiento químico (asignación).

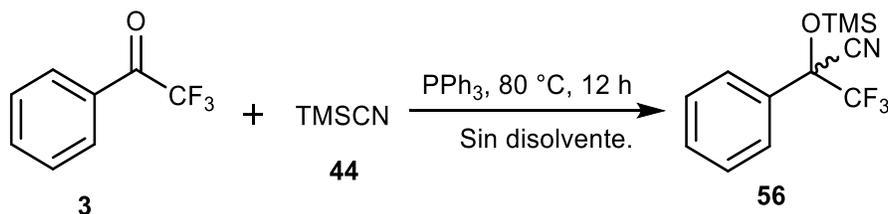
Símbolos empleados: s (señal simple); d (señal doble); t (señal triple); c (señal cuádruple); a (ancha); sa (señal simple ancha); t.a. (temperatura ambiente); h (horas).

Todos los cálculos se realizaron con el programa Gaussian 09 Rev. D01. Las optimizaciones de geometría fueron llevadas a cabo con el funcional de densidad B3LYP y el conjunto base 6-31+G(d,p).

Los disolventes y reactivos químicos fueron adquiridos de ALDRICH y fueron usados sin posterior purificación. La cepa fue adquirida de ATCC y fueron recibidas liofilizadas, se reconstituyeron según instrucciones del proveedor.

Los reactivos inorgánicos para preparar las soluciones buffer fueron adquiridas de ALDRICH, todas las soluciones buffer y medios de cultivo fueron preparados con agua destilada.

Obtención de la cianohidrina protegida.

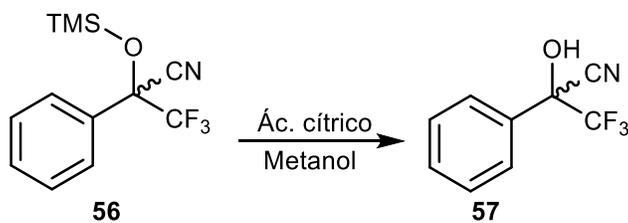


En un tubo de presión se agregaron 870 mg (5 mmoles; 1 eq.) de la 2,2,2-trifluoroacetofenona (**3**) y a continuación se agregaron 595 mg (6 mmoles; 1.2 eq.) de cianuro de trimetilsililo, a continuación se agregó trifenilfosfina 65 mg (0.25 mmoles; 0.05 eq.) y se calentó a 80 °C durante 12 horas utilizando un baño de cloruro de sodio. Al terminar la reacción se disolvió en diclorometano y se colocó en un matraz redondo con silica gel, se evaporó el disolvente y se procedió a purificar por cromatografía en columna.

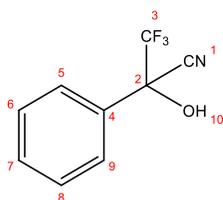
La purificación en columna no fue útil con los sistemas de disolventes utilizados ya que no es posible separar la trifenilfosfina de la mezcla de reacción, la espectroscopia se obtuvo del crudo de reacción.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.48 (m, 5H), 0.25 (s, 9H) ppm.

Desprotección de la cianohidrina



En un tubo de presión se colocaron 1 equivalente de la cianohidrina protegida **56** y un equivalente de ácido cítrico se disolvió en metanol y se calentó con ayuda de un baño de sal a 80 °C durante 12 horas. Al terminar la reacción se colocó el crudo en un matraz redondo se agregó silica gel y se evaporó a sequedad en el rotavapor, se purificó por cromatografía en columna y se obtuvo un líquido ligeramente amarillo que corresponde al producto deseado.



RMN ^1H (CDCl_3): δ 7.5 (m, 5H).

RMN ^{13}C (CDCl_3): δ 126.8 (C4), 128.9 (C5, C9), 129.2 (C6, C8), 130.2 (C1), 130.9 (C7), 127.1, 123.8, 120.0, 116.2 (C3), 73.3, 73.7, 74.1, 74.6 (C2) ppm.

Método microbiológico

Se adquirió la cepa liofilizada *Alcaligenes faecalis subs. faecalis* ATCC 8750, esta cepa se propago inicialmente en un caldo nutritivo y fue sembrada posteriormente en un medio de TSA (agar soya tripticaseina). La cepa fue conservada en tubos de TSA y resembrada antes de cada experimento para asegurar la homogeneidad entre ensayos.

Se preparó el medio para activar la enzima necesaria el cual contenía por litro, 10 g de acetato de amonio, 5 g de peptona de carne, 5 g de extracto de levadura, 1 g de cloruro de sodio, 3 g de buritonitrilo, 5 g de K_2HPO_4 , 200 mg de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 30 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. El medio se esterilizó a $121^\circ C$ durante 15 min en autoclave y en este se sembró el microorganismo y se incubó durante 48 horas.

Las células de 250 mL de medio se recolectaron por centrifugación y se colocaron en un matraz erlenmeyer de 250 mL que contenía un buffer de fosfatos potasio 0.1 M y dotado con agitación magnética, el medio se llevó a $35^\circ C$ utilizando un baño de agua y se agregó el sustrato **57** disuelto en para llevar a cabo la reacción enzimática la reacción se agito durante 4 horas y se removieron las células por centrifugación, se obtuvo el sobrenadante y se ajustó el pH a 8.5 se realizó una primera extracción con acetato de etilo 2x25 y se volvió a ajustar el pH a 2 para realizar una segunda extracción con acetato de etilo 2x25 y se evaporó a sequedad para obtener el producto deseado.

Cálculos Teóricos.

Todos los cálculos se realizaron con el programa Gaussian 09 Rev. D01. Las optimizaciones de geometría fueron llevadas a cabo con el funcional de densidad B3LYP/ 6-31+G(d,p). Al final de cada optimización se realizó el análisis de frecuencias con el mismo nivel de teoría para verificar que las geometrías calculadas correspondieran a mínimos energéticos. Estas optimizaciones se realizaron mediante el uso de teoría de funcionales de la densidad (DFT) en fase gas.

Asimismo, se calcularon las energías de deslocalización, índices de enlace de Wiberg y el análisis de población bajo el formalismo de Orbitales Naturales de Enlace (NBO) con la ayuda del programa NBO 3.1, el cual se encuentra dentro de Gaussian 09. Para estos cálculos de estructura electrónica, se tomaron las geometrías optimizadas en fase gas y se utilizó el mismo nivel de teoría (B3LYP/6-31+G(d,p)) junto con el modelo de disolvente continuo CPCM empleando agua para modelar el disolvente.

Referencias

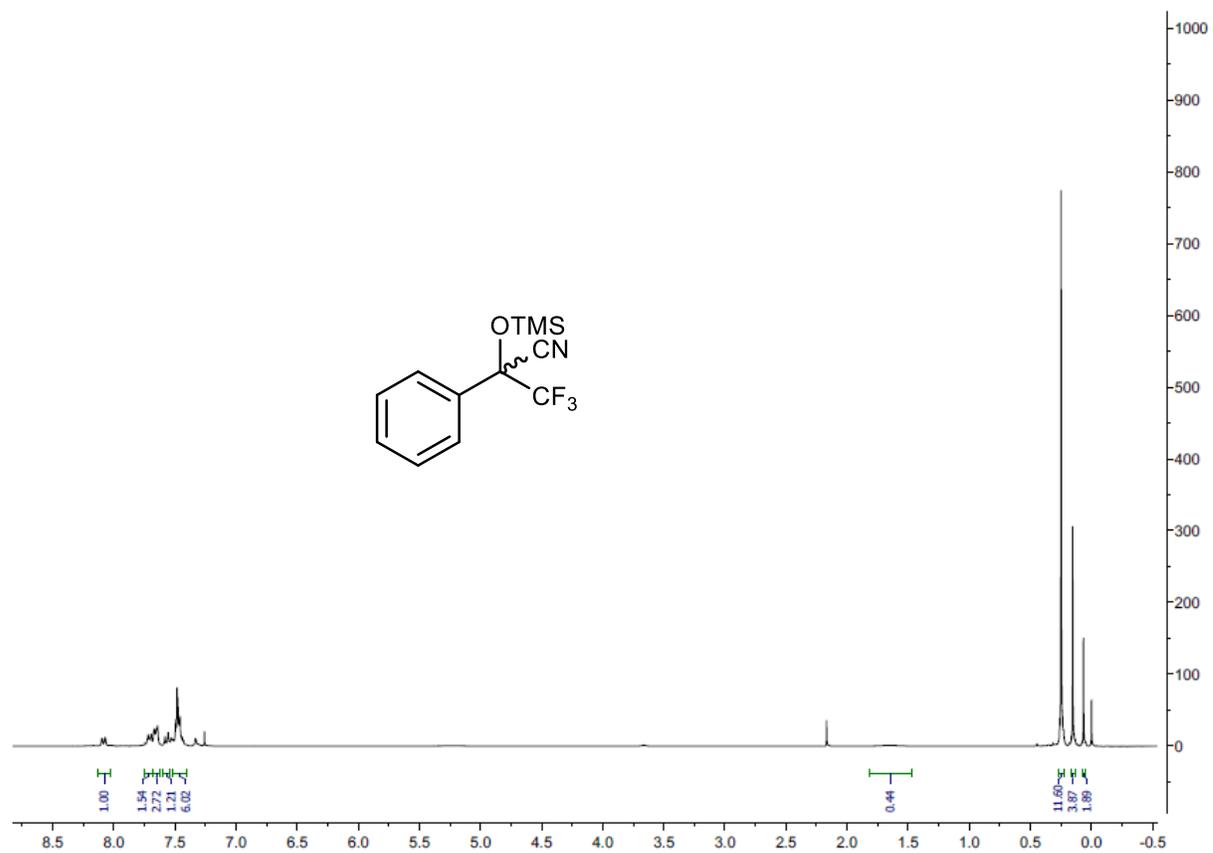
1. Dale, J. A.; Dull, D. L.; Mosher, H. S., . α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic acid, a versatile reagent for the determination of enantiomeric composition of alcohols and amines. *The Journal of Organic Chemistry* **1969**, *34* (9), 2543-2549.
2. Chong, J. M.; Loewith, R., A Convenient Preparation of (\pm)- α -Methoxy- α -trifluoromethylphenylacetic Acid (Mosher's Acid). *Synthetic Communications* **1993**, *23* (15), 2145-2150.
3. Buszek, K. R.; Sato, N., An improved synthesis of α -methoxy- α -(trifluoromethyl)-phenylacetic acid (Mosher's acid). *Organic Preparations and Procedures International* **2000**, *32* (5), 488-490.
4. Hundscheid, F. J. A.; Tandon, V. K.; Rouwette, P. H. F. M.; van Leusen, A. M., Synthesis of chiral sulfonylmethyl isocyanides, and comparison of their propensities in asymmetric induction reactions with acetophenones. *Tetrahedron* **1987**, *43* (21), 5073-5088.
5. Bravo, P.; Frigerio, M.; Resnati, G., Synthesis of (S)-b,b,b-trifluorolactic acid and (S)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl) phenylacetic acid from (R)-methyl p-tolyl sulfoxide. *J. Org. Chem* **1990**, *55* (13), 4216-4218.
6. Bennani, Y. L.; Vanhessche, K. P. M.; Sharpless, K. B., A short route to a moshe'rs acid precursor via catalytic asymmetric dihydroxylation (AD). *Tetrahedron: Asymmetry* **1994**, *5* (8), 1473-1476.
7. Pareja, C.; Martín-Zamora, E.; Fernández, R.; Lassaletta, J. M., Stereoselective Synthesis of Trifluoromethylated Compounds: Nucleophilic Addition of Formaldehyde N,N-Dialkylhydrazones to Trifluoromethyl Ketones. *J. Org. Chem* **1999**, *64* (24), 8846-8854.
8. Moreno-Dorado, F. J.; Guerra, F. M.; Ortega, M. a. J.; Zubía, E.; Massanet, G. M., Enantioselective synthesis of arylmethoxyacetic acid derivatives. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, *14* (4), 503-510.
9. Asano, Y. T., M.; Tani, Y.; Yamada, H., Aliphatic Nitrile Hidratase from *Arthrobacter* sp. J-1. Purification and Characterization., . *Agric. Biol. Chem.* **1982**, *46* (5), 1165-1174.

10. Yamamoto, K.; Oishi, K.; Fujimatsu, I.; Komatsu, K., Production of R-(-)-mandelic acid from mandelonitrile by *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750. *Applied and environmental microbiology* **1991**, *57* (10), 3028-3032.
11. Martínková, L.; Stolz, A.; Knackmuss, H. J., Enantioselectivity of the nitrile hydratase from *Rhodococcus equi* A4 towards substituted (R, S)-2-arylpropionitriles. *Biotechnology letters* **1996**, *18* (9), 1073-1076.
12. Kakeya, H.; Sakai, N.; Sugai, T.; Ohta, H., Microbial hydrolysis as a potent method for the preparation of optically active nitriles, amides and carboxylic acids. *Tetrahedron letters* **1991**, *32* (10), 1343-1346.
13. Linardi, V. R.; Dias, J. C. T.; Rosa, C. A., Utilization of acetonitrile and other aliphatic nitriles by a *Candida famata* strain. *FEMS microbiology letters* **1996**, *144* (1), 67-71.
14. (a) Nagashima, S.; Nakasako, M.; Dohmae, N.; Tsujimura, M.; Takio, K.; Odaka, M.; Yohda, M.; Kamiya, N.; Endo, I., Novel non-heme iron center of nitrile hydratase with a claw setting of oxygen atoms. *Nature structural & molecular biology* **1998**, *5* (5), 347-351; (b) Carlos, N.; Farnaud, S.; Renée, T.; Clemente, A.; Brown, P. R., Support for a three-dimensional structure predicting a Cys-Glu-Lys catalytic triad for *Pseudomonas aeruginosa* amidase comes from site-directed mutagenesis and mutations altering substrate specificity. *Biochemical Journal* **2002**, *365* (3), 731-738.
15. Martínková, L.; Vejvoda, V.; Křen, V., Selection and screening for enzymes of nitrile metabolism. *Journal of Biotechnology* **2008**, *133* (3), 318-326.
16. Fernandes, B.; Mateo, C.; Kiziak, C.; Chmura, A.; Wacker, J.; van Rantwijk, F.; Stolz, A.; Sheldon, R. A., Nitrile hydratase activity of a recombinant nitrilase. *Advanced Synthesis & Catalysis* **2006**, *348* (18), 2597-2603.
17. Zhang, J.; Tang, X.; Li, J.; Li, P.; de Voogd, N. J.; Ni, X.; Jin, X.; Yao, X.; Li, P.; Li, G., Cytotoxic Polyketide Derivatives from the South China Sea Sponge *Plakortis simplex*. *Journal of Natural Products* **2013**, *76* (4), 600-606.
18. Kolodiazhna, O. O.; Kolodiazhna, A. O.; Kolodiazhnyi, O. I., Enzymatic preparation of (1*S*, 2*R*)- and (1*R*, 2*S*)-stereoisomers of 2-halocycloalkanols. *Tetrahedron: Asymmetry* **2013**, *24* (1), 37-42.

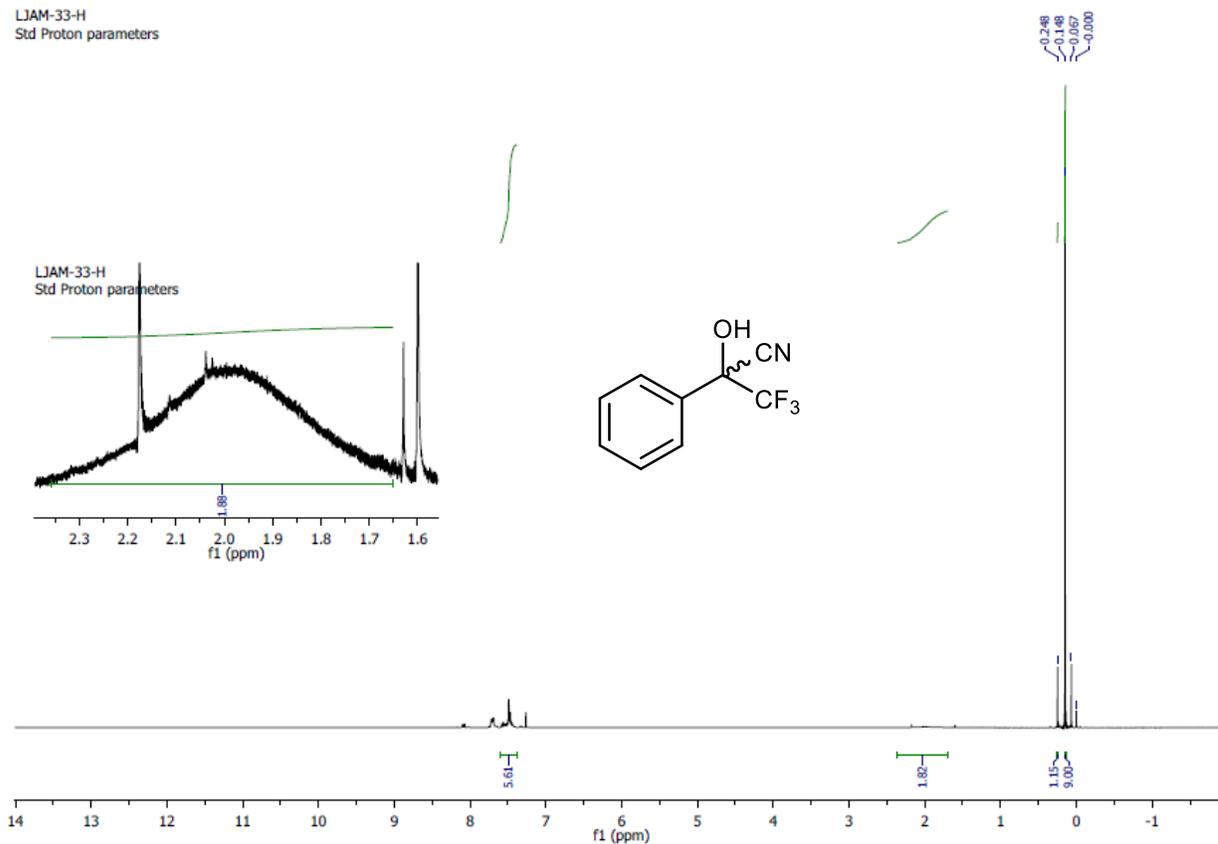
19. Mudianta, I. W.; Skinner-Adams, T.; Andrews, K. T.; Davis, R. A.; Hadi, T. A.; Hayes, P. Y.; Garson, M. J., Psammaphysin Derivatives from the Balinese Marine Sponge *Aplysinella strongylata*. *Journal of Natural Products* **2012**, *75* (12), 2132-2143.
20. Brown, R. F.; Donohue, A. C.; Jackson, W. R.; McCarthy, T. D., Synthetic applications of optically active cyanohydrins. Enantioselective syntheses of the hydroxyamides tembamide and aegeline, the cardiac drug denopamine, and some analogues of the bronchodilator salbutamol. *Tetrahedron* **1994**, *50* (48), 13739-13752.
21. Ryu, D. H.; Corey, E. J., Highly Enantioselective Cyanosilylation of Aldehydes Catalyzed by a Chiral Oxazaborolidinium Ion. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (26), 8106-8107.
22. Minamikawa, H.; Hayakawa, S.; Yamada, T.; Iwasawa, N.; Narasaka, K., Asymmetric hydrocyanation of aldehydes using chiral titanium reagents. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **1988**, *61* (12), 4379-4383.
23. Hayashi, M.; Matsuda, T.; Oguni, N., Enantioselective trimethylsilylcyanation of some aldehydes promoted by modified sharpless catalyst. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, (19), 1364-1365.
24. (a) North, M.; Usanov, D. L.; Young, C., Lewis acid catalyzed asymmetric cyanohydrin synthesis. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (12), 5146-5226; (b) Belokon, Y. N.; Carta, P.; Gutnov, A. V.; Maleev, V.; Moskalenko, M. A.; Yashkina, L. V.; Ikonnikov, N. S.; Voskoboev, N. V.; Khrustalev, V. N.; North, M., Catalytic asymmetric synthesis of O-acetylcyanohydrins from potassium cyanide, acetic anhydride, and aldehydes, promoted by chiral salen complexes of titanium (IV) and vanadium (V). *Helvetica chimica acta* **2002**, *85* (10), 3301-3312; (c) Belokon, Y. N.; Clegg, W.; Harrington, R. W.; Young, C.; North, M., Asymmetric cyanohydrin synthesis using heterobimetallic catalysts obtained from titanium and vanadium complexes of chiral and achiral salen ligands. *Tetrahedron* **2007**, *63* (24), 5287-5299.
25. Yadav, J. S.; Reddy, B. V. S.; Reddy, M. S.; Prasad, A. R., Iodine as novel reagent for the 1,2-addition of trimethylsilyl cyanide to ketones including α,β -unsaturated ketones. *Tetrahedron letters* **2002**, *43* (52), 9703-9706.

26. Strappaveccia, G.; Lanari, D.; Gelman, D.; Pizzo, F.; Rosati, O.; Curini, M.; Vaccaro, L., Efficient synthesis of cyanohydrin trimethylsilyl ethers via 1, 2-chemoselective cyanosilylation of carbonyls. *Green Chemistry* **2013**, *15* (1), 199-204.
27. Yadav, J.; Reddy, B.; Reddy, M. S.; Prasad, A., Iodine as novel reagent for the 1, 2-addition of trimethylsilyl cyanide to ketones including α , β -unsaturated ketones. *Tetrahedron letters* **2002**, *43* (52), 9703-9706.
28. (a) González-Calderón, D.; Benítez-Puebla, L. J.; González-González, C. A.; Assad-Hernández, S.; Fuentes-Benítez, A.; Cuevas-Yáñez, E.; Corona-Becerril, D.; González-Romero, C., Selective deprotection of TBDMS alkyl ethers in the presence of TIPS or TBDPS phenyl ethers by catalytic $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in methanol. *Tetrahedron letters* **2013**, *54* (37), 5130-5132; (b) González-Calderón, D.; Benitez-Puebla, L. J.; Gonzalez-Gonzalez, C. A.; Garcia-Eleno, M. A.; Fuentes-Benitez, A.; Cuevas-Yañez, E.; Corona-Becerril, D.; González-Romero, C., Aluminium Chloride Hexahydrate ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): An Efficient, Facile, Mild, And Highly Chemoselective Catalytic Deprotection of Tert-Butyldimethylsilyl (TBS) Ethers. *Synthetic Communications* **2014**, *44* (9), 1258-1265.
29. Nguyen, G. S.; Kourist, R.; Paravidino, M.; Hummel, A.; Rehdorf, J.; Orru, R. V.; Hanefeld, U.; Bornscheuer, U. T., An Enzymatic Toolbox for the Kinetic Resolution of 2-(Pyridin-x-yl) but-3-yn-2-ols and Tertiary Cyanohydrins. *European Journal of Organic Chemistry* **2010**, *2010* (14), 2753-2758.

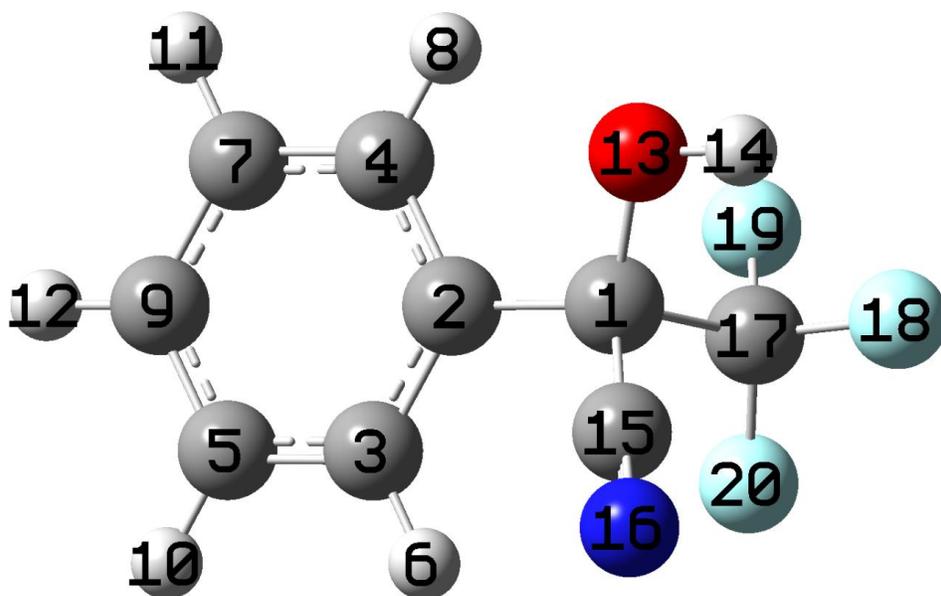
Anexos



LJAM-33-H
Std Proton parameters



Cálculos teóricos



Donor N	BO (i)		Acceptor NBO (j)	E(2) kcal/mol	E(j)-E(i) a.u.	F(i,j) a.u.
=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
=====	=====	=====	=====	=====	=====	=====
within unit 1						
1. BD (1)	C 1 - C 2	/ 80.	RY*(1) C 3	1.17	1.94	0.043
1. BD (1)	C 1 - C 2	/ 94.	RY*(1) C 4	1.6	1.91	0.05
1. BD (1)	C 1 - C 2	/171.	RY*(2) O 13	0.54	1.68	0.027
1. BD (1)	C 1 - C 2	/190.	RY*(3) C 15	0.57	1.65	0.028
1. BD (1)	C 1 - C 2	/274.	BD*(1) C 1 - C 15	1.27	1.04	0.032
1. BD (1)	C 1 - C 2	/276.	BD*(1) C 2 - C 3	1.43	1.23	0.038
1. BD (1)	C 1 - C 2	/278.	BD*(1) C 2 - C 4	1.37	1.23	0.037
1. BD (1)	C 1 - C 2	/279.	BD*(1) C 3 - C 5	1.86	1.24	0.043
1. BD (1)	C 1 - C 2	/281.	BD*(1) C 4 - C 7	1.76	1.24	0.042
1. BD (1)	C 1 - C 2	/290.	BD*(1) O 13 - H 14	1.98	1.11	0.042
1. BD (1)	C 1 - C 2	/291.	BD*(1) C 15 - N 16	4.5	1.54	0.075
1. BD (1)	C 1 - C 2	/292.	BD*(2) C 15 - N 16	2.64	0.74	0.04
1. BD (1)	C 1 - C 2	/294.	BD*(1) C 17 - F 18	2.24	0.85	0.039
2. BD (1)	C 1 - O 13	/ 67.	RY*(2) C 2	0.61	1.95	0.031
2. BD (1)	C 1 - O 13	/191.	RY*(4) C 15	0.68	1.81	0.032
2. BD (1)	C 1 - O 13	/276.	BD*(1) C 2 - C 3	1.7	1.44	0.044
2. BD (1)	C 1 - O 13	/291.	BD*(1) C 15 - N 16	2.28	1.76	0.057
2. BD (1)	C 1 - O 13	/293.	BD*(3) C 15 - N 16	1.93	0.96	0.038
2. BD (1)	C 1 - O 13	/296.	BD*(1) C 17 - F 20	1.59	1.08	0.038
3. BD (1)	C 1 - C 15	/ 68.	RY*(3) C 2	0.65	1.54	0.028
3. BD (1)	C 1 - C 15	/202.	RY*(1) N 16	3.47	2.3	0.08
3. BD (1)	C 1 - C 15	/272.	BD*(1) C 1 - C 2	1.09	1.1	0.031
3. BD (1)	C 1 - C 15	/278.	BD*(1) C 2 - C 4	2.17	1.3	0.047
3. BD (1)	C 1 - C 15	/291.	BD*(1) C 15 - N 16	3.7	1.62	0.069
3. BD (1)	C 1 - C 15	/295.	BD*(1) C 17 - F 19	2.45	0.95	0.044
4. BD (1)	C 1 - C 17	/ 68.	RY*(3) C 2	1.01	1.49	0.035
4. BD (1)	C 1 - C 17	/170.	RY*(1) O 13	1	1.49	0.035
4. BD (1)	C 1 - C 17	/189.	RY*(2) C 15	1.31	1.51	0.04
4. BD (1)	C 1 - C 17	/230.	RY*(1) F 18	0.67	1.4	0.028
4. BD (1)	C 1 - C 17	/244.	RY*(1) F 19	0.74	1.42	0.029
4. BD (1)	C 1 - C 17	/258.	RY*(1) F 20	0.71	1.49	0.029
4. BD (1)	C 1 - C 17	/272.	BD*(1) C 1 - C 2	0.85	1.04	0.027
4. BD (1)	C 1 - C 17	/277.	BD*(2) C 2 - C 3	1.69	0.71	0.034
4. BD (1)	C 1 - C 17	/291.	BD*(1) C 15 - N 16	3.66	1.56	0.068
4. BD (1)	C 1 - C 17	/292.	BD*(2) C 15 - N 16	2.18	0.76	0.037
4. BD (1)	C 1 - C 17	/293.	BD*(3) C 15 - N 16	0.84	0.77	0.023

5. BD (1)	C 2 - C 3	/ 52.	RY*(1) C 1	1.28	1.63	0.041
5. BD (1)	C 2 - C 3	/ 94.	RY*(1) C 4	0.61	1.96	0.031
5. BD (1)	C 2 - C 3	/108.	RY*(1) C 5	0.9	1.99	0.038
5. BD (1)	C 2 - C 3	/109.	RY*(2) C 5	1.47	1.42	0.041
5. BD (1)	C 2 - C 3	/272.	BD*(1) C 1 - C 2	1.2	1.06	0.032
5. BD (1)	C 2 - C 3	/273.	BD*(1) C 1 - O 13	1.34	0.96	0.032
5. BD (1)	C 2 - C 3	/278.	BD*(1) C 2 - C 4	3.92	1.27	0.063
5. BD (1)	C 2 - C 3	/279.	BD*(1) C 3 - C 5	2.38	1.28	0.049
5. BD (1)	C 2 - C 3	/280.	BD*(1) C 3 - H 6	1.04	1.19	0.031
5. BD (1)	C 2 - C 3	/283.	BD*(1) C 4 - H 8	2.1	1.2	0.045
5. BD (1)	C 2 - C 3	/286.	BD*(1) C 5 - H 10	2	1.19	0.044
6. BD (2)	C 2 - C 3	/ 96.	RY*(3) C 4	1.9	0.94	0.041
6. BD (2)	C 2 - C 3	/110.	RY*(3) C 5	1.36	0.61	0.028
6. BD (2)	C 2 - C 3	/273.	BD*(1) C 1 - O 13	1.17	0.52	0.024
6. BD (2)	C 2 - C 3	/274.	BD*(1) C 1 - C 15	0.88	0.64	0.023
6. BD (2)	C 2 - C 3	/275.	BD*(1) C 1 - C 17	4.08	0.51	0.043
6. BD (2)	C 2 - C 3	/282.	BD*(2) C 4 - C 7	20.02	0.29	0.068
6. BD (2)	C 2 - C 3	/285.	BD*(2) C 5 - C 9	17.9	0.29	0.065
6. BD (2)	C 2 - C 3	/292.	BD*(2) C 15 - N 16	0.67	0.34	0.015
6. BD (2)	C 2 - C 3	/294.	BD*(1) C 17 - F 18	0.85	0.44	0.018
7. BD (1)	C 2 - C 4	/ 52.	RY*(1) C 1	0.66	1.63	0.029
7. BD (1)	C 2 - C 4	/ 81.	RY*(2) C 3	0.63	1.5	0.028
7. BD (1)	C 2 - C 4	/126.	RY*(1) C 7	0.8	2	0.036
7. BD (1)	C 2 - C 4	/127.	RY*(2) C 7	1.53	1.41	0.042
7. BD (1)	C 2 - C 4	/272.	BD*(1) C 1 - C 2	1.38	1.06	0.034
7. BD (1)	C 2 - C 4	/274.	BD*(1) C 1 - C 15	0.97	1.08	0.029
7. BD (1)	C 2 - C 4	/276.	BD*(1) C 2 - C 3	3.85	1.27	0.062
7. BD (1)	C 2 - C 4	/280.	BD*(1) C 3 - H 6	2.25	1.18	0.046
7. BD (1)	C 2 - C 4	/281.	BD*(1) C 4 - C 7	2.18	1.28	0.047
7. BD (1)	C 2 - C 4	/283.	BD*(1) C 4 - H 8	1.05	1.19	0.032
7. BD (1)	C 2 - C 4	/288.	BD*(1) C 7 - H 11	2.03	1.19	0.044
8. BD (1)	C 3 - C 5	/ 67.	RY*(2) C 2	2.25	1.77	0.057
8. BD (1)	C 3 - C 5	/144.	RY*(1) C 9	0.67	2	0.033
8. BD (1)	C 3 - C 5	/145.	RY*(2) C 9	1.4	1.41	0.04
8. BD (1)	C 3 - C 5	/272.	BD*(1) C 1 - C 2	3.88	1.05	0.057
8. BD (1)	C 3 - C 5	/276.	BD*(1) C 2 - C 3	2.92	1.26	0.054
8. BD (1)	C 3 - C 5	/280.	BD*(1) C 3 - H 6	1.22	1.17	0.034
8. BD (1)	C 3 - C 5	/284.	BD*(1) C 5 - C 9	2.08	1.27	0.046
8. BD (1)	C 3 - C 5	/286.	BD*(1) C 5 - H 10	0.94	1.18	0.03
8. BD (1)	C 3 - C 5	/289.	BD*(1) C 9 - H 12	2.25	1.18	0.046
9. BD (1)	C 3 - H 6	/ 66.	RY*(1) C 2	1.36	1.69	0.043

9. BD (1)	C 3 - H 6	/108.	RY*(1) C 5	1.13	1.81	0.041
9. BD (1)	C 3 - H 6	/276.	BD*(1) C 2 - C 3	0.94	1.09	0.028
9. BD (1)	C 3 - H 6	/278.	BD*(1) C 2 - C 4	4.72	1.09	0.064
9. BD (1)	C 3 - H 6	/279.	BD*(1) C 3 - C 5	0.98	1.1	0.029
9. BD (1)	C 3 - H 6	/284.	BD*(1) C 5 - C 9	3.56	1.1	0.056
10. BD (1)	C 4 - C 7	/ 66.	RY*(1) C 2	1.95	1.86	0.054
10. BD (1)	C 4 - C 7	/144.	RY*(1) C 9	0.68	2	0.033
10. BD (1)	C 4 - C 7	/145.	RY*(2) C 9	1.38	1.4	0.039
10. BD (1)	C 4 - C 7	/272.	BD*(1) C 1 - C 2	3.92	1.05	0.058
10. BD (1)	C 4 - C 7	/278.	BD*(1) C 2 - C 4	2.83	1.26	0.053
10. BD (1)	C 4 - C 7	/283.	BD*(1) C 4 - H 8	1.21	1.18	0.034
10. BD (1)	C 4 - C 7	/287.	BD*(1) C 7 - C 9	2.09	1.27	0.046
10. BD (1)	C 4 - C 7	/288.	BD*(1) C 7 - H 11	0.94	1.18	0.03
10. BD (1)	C 4 - C 7	/289.	BD*(1) C 9 - H 12	2.26	1.18	0.046
11. BD (2)	C 4 - C 7	/146.	RY*(3) C 9	1.16	0.61	0.026
11. BD (2)	C 4 - C 7	/277.	BD*(2) C 2 - C 3	20.71	0.27	0.067
11. BD (2)	C 4 - C 7	/285.	BD*(2) C 5 - C 9	20.34	0.28	0.068
12. BD (1)	C 4 - H 8	/ 66.	RY*(1) C 2	1.11	1.68	0.039
12. BD (1)	C 4 - H 8	/ 67.	RY*(2) C 2	0.72	1.59	0.03
12. BD (1)	C 4 - H 8	/126.	RY*(1) C 7	1.03	1.81	0.039
12. BD (1)	C 4 - H 8	/276.	BD*(1) C 2 - C 3	4.74	1.08	0.064
12. BD (1)	C 4 - H 8	/278.	BD*(1) C 2 - C 4	1.07	1.08	0.03
12. BD (1)	C 4 - H 8	/281.	BD*(1) C 4 - C 7	0.99	1.1	0.029
12. BD (1)	C 4 - H 8	/287.	BD*(1) C 7 - C 9	3.6	1.09	0.056
13. BD (1)	C 5 - C 9	/ 80.	RY*(1) C 3	0.8	1.97	0.036
13. BD (1)	C 5 - C 9	/ 81.	RY*(2) C 3	1.21	1.49	0.038
13. BD (1)	C 5 - C 9	/126.	RY*(1) C 7	0.71	1.98	0.034
13. BD (1)	C 5 - C 9	/127.	RY*(2) C 7	1.39	1.4	0.04
13. BD (1)	C 5 - C 9	/279.	BD*(1) C 3 - C 5	2.15	1.27	0.047
13. BD (1)	C 5 - C 9	/280.	BD*(1) C 3 - H 6	2.4	1.17	0.047
13. BD (1)	C 5 - C 9	/286.	BD*(1) C 5 - H 10	1.03	1.18	0.031
13. BD (1)	C 5 - C 9	/287.	BD*(1) C 7 - C 9	2.02	1.27	0.045
13. BD (1)	C 5 - C 9	/288.	BD*(1) C 7 - H 11	2.35	1.18	0.047
13. BD (1)	C 5 - C 9	/289.	BD*(1) C 9 - H 12	0.96	1.18	0.03
14. BD (2)	C 5 - C 9	/ 83.	RY*(4) C 3	1.16	1.64	0.043
14. BD (2)	C 5 - C 9	/128.	RY*(3) C 7	0.95	0.62	0.024
14. BD (2)	C 5 - C 9	/277.	BD*(2) C 2 - C 3	22.44	0.27	0.07
14. BD (2)	C 5 - C 9	/282.	BD*(2) C 4 - C 7	19.43	0.28	0.066
15. BD (1)	C 5 - H 10	/ 80.	RY*(1) C 3	0.98	1.79	0.037
15. BD (1)	C 5 - H 10	/144.	RY*(1) C 9	1.04	1.82	0.039
15. BD (1)	C 5 - H 10	/276.	BD*(1) C 2 - C 3	3.92	1.08	0.058

15. BD (1)	C 5 - H 10	/279.	BD*(1) C 3 - C 5	0.81	1.09	0.027
15. BD (1)	C 5 - H 10	/284.	BD*(1) C 5 - C 9	0.81	1.09	0.027
15. BD (1)	C 5 - H 10	/287.	BD*(1) C 7 - C 9	3.62	1.09	0.056
16. BD (1)	C 7 - C 9	/95.	RY*(2) C 4	1.91	1.5	0.048
16. BD (1)	C 7 - C 9	/108.	RY*(1) C 5	0.63	1.98	0.031
16. BD (1)	C 7 - C 9	/109.	RY*(2) C 5	1.49	1.4	0.041
16. BD (1)	C 7 - C 9	/281.	BD*(1) C 4 - C 7	2.12	1.27	0.046
16. BD (1)	C 7 - C 9	/283.	BD*(1) C 4 - H 8	2.34	1.18	0.047
16. BD (1)	C 7 - C 9	/284.	BD*(1) C 5 - C 9	2.02	1.27	0.045
16. BD (1)	C 7 - C 9	/286.	BD*(1) C 5 - H 10	2.36	1.18	0.047
16. BD (1)	C 7 - C 9	/288.	BD*(1) C 7 - H 11	1.02	1.18	0.031
16. BD (1)	C 7 - C 9	/289.	BD*(1) C 9 - H 12	0.96	1.18	0.03
17. BD (1)	C 7 - H 11	/94.	RY*(1) C 4	0.85	1.76	0.035
17. BD (1)	C 7 - H 11	/144.	RY*(1) C 9	1.04	1.82	0.039
17. BD (1)	C 7 - H 11	/278.	BD*(1) C 2 - C 4	3.88	1.08	0.058
17. BD (1)	C 7 - H 11	/281.	BD*(1) C 4 - C 7	0.8	1.09	0.026
17. BD (1)	C 7 - H 11	/284.	BD*(1) C 5 - C 9	3.64	1.09	0.056
17. BD (1)	C 7 - H 11	/287.	BD*(1) C 7 - C 9	0.79	1.09	0.026
18. BD (1)	C 9 - H 12	/108.	RY*(1) C 5	1.02	1.8	0.038
18. BD (1)	C 9 - H 12	/126.	RY*(1) C 7	1.03	1.81	0.039
18. BD (1)	C 9 - H 12	/279.	BD*(1) C 3 - C 5	3.74	1.09	0.057
18. BD (1)	C 9 - H 12	/281.	BD*(1) C 4 - C 7	3.75	1.09	0.057
18. BD (1)	C 9 - H 12	/284.	BD*(1) C 5 - C 9	0.78	1.09	0.026
18. BD (1)	C 9 - H 12	/287.	BD*(1) C 7 - C 9	0.78	1.09	0.026
19. BD (1)	O 13 - H 14	/52.	RY*(1) C 1	1.67	1.68	0.047
19. BD (1)	O 13 - H 14	/272.	BD*(1) C 1 - C 2	3.1	1.11	0.053
20. BD (1)	C 15 - N 16	/53.	RY*(2) C 1	0.63	2.39	0.035
20. BD (1)	C 15 - N 16	/54.	RY*(3) C 1	2.48	2.29	0.067
20. BD (1)	C 15 - N 16	/188.	RY*(1) C 15	1.64	1.72	0.048
20. BD (1)	C 15 - N 16	/274.	BD*(1) C 1 - C 15	4.26	1.45	0.071
21. BD (2)	C 15 - N 16	/272.	BD*(1) C 1 - C 2	1.95	0.72	0.034
21. BD (2)	C 15 - N 16	/275.	BD*(1) C 1 - C 17	1.82	0.61	0.03
22. BD (3)	C 15 - N 16	/273.	BD*(1) C 1 - O 13	4.56	0.62	0.048
22. BD (3)	C 15 - N 16	/275.	BD*(1) C 1 - C 17	0.94	0.61	0.022
23. BD (1)	C 17 - F 18	/218.	RY*(3) C 17	0.52	1.92	0.028
23. BD (1)	C 17 - F 18	/272.	BD*(1) C 1 - C 2	1.04	1.41	0.034
23. BD (1)	C 17 - F 18	/295.	BD*(1) C 17 - F 19	0.88	1.25	0.03
23. BD (1)	C 17 - F 18	/296.	BD*(1) C 17 - F 20	0.92	1.25	0.031
24. BD (1)	C 17 - F 19	/217.	RY*(2) C 17	1.05	1.96	0.041
24. BD (1)	C 17 - F 19	/274.	BD*(1) C 1 - C 15	0.98	1.45	0.034
24. BD (1)	C 17 - F 19	/294.	BD*(1) C 17 - F 18	0.94	1.26	0.031

24. BD (1)	C 17 - F 19	/296.	BD*(1) C 17 - F 20	0.88	1.27	0.031
25. BD (1)	C 17 - F 20	/216.	RY*(1) C 17	1.21	1.94	0.043
25. BD (1)	C 17 - F 20	/273.	BD*(1) C 1 - O 13	1.15	1.33	0.035
25. BD (1)	C 17 - F 20	/294.	BD*(1) C 17 - F 18	0.92	1.25	0.031
25. BD (1)	C 17 - F 20	/295.	BD*(1) C 17 - F 19	0.83	1.28	0.03
26. CR (1)	C 1	/ 66.	RY*(1) C 2	0.63	11.36	0.075
26. CR (1)	C 1	/188.	RY*(1) C 15	1.19	10.84	0.102
26. CR (1)	C 1	/218.	RY*(3) C 17	1.13	11.07	0.1
26. CR (1)	C 1	/224.	RY*(9) C 17	0.6	11.65	0.074
26. CR (1)	C 1	/272.	BD*(1) C 1 - C 2	0.59	10.56	0.071
26. CR (1)	C 1	/273.	BD*(1) C 1 - O 13	0.76	10.46	0.08
26. CR (1)	C 1	/276.	BD*(1) C 2 - C 3	0.52	10.76	0.067
26. CR (1)	C 1	/291.	BD*(1) C 15 - N 16	3.52	11.08	0.177
27. CR (1)	C 2	/ 55.	RY*(4) C 1	0.78	10.93	0.082
27. CR (1)	C 2	/ 81.	RY*(2) C 3	1.41	10.87	0.11
27. CR (1)	C 2	/ 95.	RY*(2) C 4	1.76	10.87	0.123
27. CR (1)	C 2	/279.	BD*(1) C 3 - C 5	0.55	10.64	0.068
27. CR (1)	C 2	/280.	BD*(1) C 3 - H 6	0.6	10.54	0.071
27. CR (1)	C 2	/281.	BD*(1) C 4 - C 7	0.53	10.64	0.068
27. CR (1)	C 2	/283.	BD*(1) C 4 - H 8	0.57	10.56	0.069
28. CR (1)	C 3	/ 66.	RY*(1) C 2	1.99	11.22	0.133
28. CR (1)	C 3	/109.	RY*(2) C 5	1.82	10.76	0.125
28. CR (1)	C 3	/272.	BD*(1) C 1 - C 2	0.79	10.41	0.082
28. CR (1)	C 3	/278.	BD*(1) C 2 - C 4	0.89	10.61	0.087
28. CR (1)	C 3	/284.	BD*(1) C 5 - C 9	0.65	10.63	0.074
28. CR (1)	C 3	/286.	BD*(1) C 5 - H 10	0.55	10.54	0.068
29. CR (1)	C 4	/ 67.	RY*(2) C 2	1.99	11.12	0.133
29. CR (1)	C 4	/127.	RY*(2) C 7	1.73	10.76	0.122
29. CR (1)	C 4	/272.	BD*(1) C 1 - C 2	0.82	10.4	0.083
29. CR (1)	C 4	/276.	BD*(1) C 2 - C 3	0.9	10.61	0.088
29. CR (1)	C 4	/287.	BD*(1) C 7 - C 9	0.66	10.62	0.075
29. CR (1)	C 4	/288.	BD*(1) C 7 - H 11	0.55	10.53	0.068
30. CR (1)	C 5	/ 81.	RY*(2) C 3	1.35	10.85	0.108
30. CR (1)	C 5	/145.	RY*(2) C 9	1.64	10.76	0.118
30. CR (1)	C 5	/276.	BD*(1) C 2 - C 3	0.72	10.61	0.079
30. CR (1)	C 5	/280.	BD*(1) C 3 - H 6	0.63	10.53	0.073
30. CR (1)	C 5	/287.	BD*(1) C 7 - C 9	0.63	10.62	0.073
30. CR (1)	C 5	/289.	BD*(1) C 9 - H 12	0.59	10.54	0.07
31. CR (1)	C 7	/ 94.	RY*(1) C 4	0.7	11.3	0.079
31. CR (1)	C 7	/ 95.	RY*(2) C 4	0.95	10.86	0.091
31. CR (1)	C 7	/ 98.	RY*(5) C 4	0.57	11.17	0.071

31. CR (1)	C 7	/145.	RY*(2) C 9	1.66	10.76	0.119
31. CR (1)	C 7	/278.	BD*(1) C 2 - C 4	0.7	10.61	0.077
31. CR (1)	C 7	/283.	BD*(1) C 4 - H 8	0.63	10.54	0.073
31. CR (1)	C 7	/284.	BD*(1) C 5 - C 9	0.63	10.62	0.073
31. CR (1)	C 7	/289.	BD*(1) C 9 - H 12	0.59	10.54	0.071
32. CR (1)	C 9	/109.	RY*(2) C 5	1.48	10.76	0.113
32. CR (1)	C 9	/127.	RY*(2) C 7	1.55	10.76	0.115
32. CR (1)	C 9	/279.	BD*(1) C 3 - C 5	0.65	10.62	0.075
32. CR (1)	C 9	/281.	BD*(1) C 4 - C 7	0.66	10.63	0.075
32. CR (1)	C 9	/286.	BD*(1) C 5 - H 10	0.61	10.53	0.071
32. CR (1)	C 9	/288.	BD*(1) C 7 - H 11	0.6	10.53	0.071
33. CR (1)	O 13	/ 52.	RY*(1) C 1	1.83	19.93	0.171
33. CR (1)	O 13	/ 55.	RY*(4) C 1	0.73	19.87	0.107
34. CR (1)	C 15	/ 52.	RY*(1) C 1	0.56	11.05	0.07
34. CR (1)	C 15	/ 54.	RY*(3) C 1	0.99	11.34	0.095
34. CR (1)	C 15	/203.	RY*(2) N 16	0.73	10.71	0.079
34. CR (1)	C 15	/204.	RY*(3) N 16	0.56	11.04	0.07
34. CR (1)	C 15	/291.	BD*(1) C 15 - N 16	0.54	11	0.069
35. CR (1)	N 16	/188.	RY*(1) C 15	7.02	14.75	0.289
35. CR (1)	N 16	/274.	BD*(1) C 1 - C 15	3.88	14.48	0.215
36. CR (1)	C 17	/275.	BD*(1) C 1 - C 17	1.51	10.62	0.116
36. CR (1)	C 17	/294.	BD*(1) C 17 - F 18	0.72	10.56	0.08
36. CR (1)	C 17	/295.	BD*(1) C 17 - F 19	0.67	10.58	0.077
36. CR (1)	C 17	/296.	BD*(1) C 17 - F 20	0.7	10.57	0.079
37. CR (1)	F 18	/216.	RY*(1) C 17	0.78	25.35	0.126
37. CR (1)	F 18	/217.	RY*(2) C 17	1.39	25.36	0.168
37. CR (1)	F 18	/218.	RY*(3) C 17	1.52	25.34	0.176
38. CR (1)	F 19	/217.	RY*(2) C 17	3.02	25.36	0.248
38. CR (1)	F 19	/218.	RY*(3) C 17	0.89	25.34	0.135
39. CR (1)	F 20	/216.	RY*(1) C 17	3.61	25.35	0.271
40. LP (1)	O 13	/ 52.	RY*(1) C 1	2.88	1.55	0.06
40. LP (1)	O 13	/ 54.	RY*(3) C 1	0.83	1.84	0.035
40. LP (1)	O 13	/186.	RY*(3) H 14	0.64	3.03	0.04
40. LP (1)	O 13	/272.	BD*(1) C 1 - C 2	1.01	0.98	0.028
40. LP (1)	O 13	/274.	BD*(1) C 1 - C 15	1.06	1	0.029
40. LP (1)	O 13	/275.	BD*(1) C 1 - C 17	1.54	0.87	0.033
41. LP (2)	O 13	/ 53.	RY*(2) C 1	1.33	1.65	0.043
41. LP (2)	O 13	/184.	RY*(1) H 14	1.04	2.11	0.043
41. LP (2)	O 13	/185.	RY*(2) H 14	0.91	1.83	0.037
41. LP (2)	O 13	/274.	BD*(1) C 1 - C 15	7.87	0.72	0.067
41. LP (2)	O 13	/275.	BD*(1) C 1 - C 17	6.4	0.59	0.055

41. LP (2)	O 13	/293.	BD*(3) C 15 - N 16	1.72	0.42	0.024
41. LP (2)	O 13	/296.	BD*(1) C 17 - F 20	1.18	0.54	0.023
42. LP (1)	N 16	/188.	RY*(1) C 15	17	1.19	0.127
42. LP (1)	N 16	/195.	RY*(8) C 15	0.64	3.15	0.04
42. LP (1)	N 16	/274.	BD*(1) C 1 - C 15	11.54	0.92	0.093
43. LP (1)	F 18	/216.	RY*(1) C 17	2.04	1.99	0.057
43. LP (1)	F 18	/217.	RY*(2) C 17	3.78	2	0.078
43. LP (1)	F 18	/218.	RY*(3) C 17	4.89	1.98	0.088
43. LP (1)	F 18	/219.	RY*(4) C 17	0.87	2.6	0.042
43. LP (1)	F 18	/275.	BD*(1) C 1 - C 17	0.52	1.36	0.024
44. LP (2)	F 18	/222.	RY*(7) C 17	0.51	2.62	0.033
44. LP (2)	F 18	/272.	BD*(1) C 1 - C 2	0.74	0.81	0.022
44. LP (2)	F 18	/275.	BD*(1) C 1 - C 17	6.36	0.7	0.061
44. LP (2)	F 18	/295.	BD*(1) C 17 - F 19	5.72	0.66	0.056
44. LP (2)	F 18	/296.	BD*(1) C 17 - F 20	2.84	0.66	0.039
45. LP (3)	F 18	/216.	RY*(1) C 17	0.61	1.33	0.026
45. LP (3)	F 18	/221.	RY*(6) C 17	1.24	2.43	0.05
45. LP (3)	F 18	/295.	BD*(1) C 17 - F 19	8.89	0.66	0.069
45. LP (3)	F 18	/296.	BD*(1) C 17 - F 20	11.98	0.65	0.08
46. LP (1)	F 19	/217.	RY*(2) C 17	8.44	1.99	0.116
46. LP (1)	F 19	/218.	RY*(3) C 17	2.89	1.97	0.067
46. LP (1)	F 19	/219.	RY*(4) C 17	0.96	2.59	0.045
46. LP (1)	F 19	/275.	BD*(1) C 1 - C 17	0.54	1.35	0.025
47. LP (2)	F 19	/218.	RY*(3) C 17	0.73	1.32	0.028
47. LP (2)	F 19	/222.	RY*(7) C 17	0.73	2.62	0.04
47. LP (2)	F 19	/274.	BD*(1) C 1 - C 15	0.8	0.83	0.023
47. LP (2)	F 19	/275.	BD*(1) C 1 - C 17	7.37	0.7	0.065
47. LP (2)	F 19	/294.	BD*(1) C 17 - F 18	5.37	0.64	0.053
47. LP (2)	F 19	/296.	BD*(1) C 17 - F 20	4.12	0.65	0.047
48. LP (3)	F 19	/216.	RY*(1) C 17	0.89	1.33	0.031
48. LP (3)	F 19	/220.	RY*(5) C 17	1.23	2.47	0.05
48. LP (3)	F 19	/294.	BD*(1) C 17 - F 18	10.89	0.64	0.075
48. LP (3)	F 19	/296.	BD*(1) C 17 - F 20	11.95	0.65	0.079
49. LP (1)	F 20	/216.	RY*(1) C 17	10.31	1.98	0.128
49. LP (1)	F 20	/218.	RY*(3) C 17	1.04	1.97	0.041
49. LP (1)	F 20	/219.	RY*(4) C 17	0.86	2.59	0.042
49. LP (1)	F 20	/275.	BD*(1) C 1 - C 17	0.5	1.35	0.024
50. LP (2)	F 20	/218.	RY*(3) C 17	0.66	1.32	0.027
50. LP (2)	F 20	/223.	RY*(8) C 17	0.78	2.61	0.041
50. LP (2)	F 20	/273.	BD*(1) C 1 - O 13	0.92	0.71	0.023
50. LP (2)	F 20	/275.	BD*(1) C 1 - C 17	7.49	0.7	0.066

50. LP (2)	F 20	/294.	BD*(1) C 17 - F 18	3.74	0.64	0.044
50. LP (2)	F 20	/295.	BD*(1) C 17 - F 19	5.55	0.66	0.055
51. LP (3)	F 20	/217.	RY*(2) C 17	1.01	1.34	0.033
51. LP (3)	F 20	/220.	RY*(5) C 17	0.67	2.47	0.037
51. LP (3)	F 20	/221.	RY*(6) C 17	0.66	2.43	0.036
51. LP (3)	F 20	/294.	BD*(1) C 17 - F 18	12.39	0.64	0.08
51. LP (3)	F 20	/295.	BD*(1) C 17 - F 19	10.15	0.66	0.074
275. BD*(1)	C 1 - C 17	/219.	RY*(4) C 17	1.22	1.23	0.15
277. BD*(2)	C 2 - C 3	/ 68.	RY*(3) C 2	0.58	0.78	0.044
277. BD*(2)	C 2 - C 3	/ 82.	RY*(3) C 3	1.93	0.72	0.077
277. BD*(2)	C 2 - C 3	/ 96.	RY*(3) C 4	0.56	0.66	0.04
277. BD*(2)	C 2 - C 3	/110.	RY*(3) C 5	0.51	0.33	0.027
277. BD*(2)	C 2 - C 3	/274.	BD*(1) C 1 - C 15	0.81	0.35	0.033
277. BD*(2)	C 2 - C 3	/275.	BD*(1) C 1 - C 17	3.09	0.22	0.048
277. BD*(2)	C 2 - C 3	/294.	BD*(1) C 17 - F 18	0.56	0.16	0.017
282. BD*(2)	C 4 - C 7	/ 97.	RY*(4) C 4	1.05	1.5	0.09
282. BD*(2)	C 4 - C 7	/128.	RY*(3) C 7	2.67	0.35	0.069
282. BD*(2)	C 4 - C 7	/133.	RY*(8) C 7	0.68	0.66	0.048
285. BD*(2)	C 5 - C 9	/110.	RY*(3) C 5	2.33	0.32	0.061
285. BD*(2)	C 5 - C 9	/117.	RY*(10) C 5	0.5	0.66	0.041
285. BD*(2)	C 5 - C 9	/146.	RY*(3) C 9	2.88	0.33	0.069
294. BD*(1)	C 17 - F 18	/220.	RY*(5) C 17	0.86	1.83	0.154
294. BD*(1)	C 17 - F 18	/272.	BD*(1) C 1 - C 2	0.79	0.17	0.039
294. BD*(1)	C 17 - F 18	/273.	BD*(1) C 1 - O 13	1.03	0.07	0.03
294. BD*(1)	C 17 - F 18	/295.	BD*(1) C 17 - F 19	0.6	0.02	0.01
294. BD*(1)	C 17 - F 18	/296.	BD*(1) C 17 - F 20	0.55	0.01	0.008