

**SÍNTESIS DE CIANOARILMETIL ACETATOS MEDIANTE REACCIONES  
QUÍMICAS CONVENCIONALES VS REACCIONES ENZIMÁTICAS**

**CARLA MARGARITA URIBE RINCÓN**



**LABORATORIO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y BIOMOLECULAR (LQOBio)  
ESCUELA DE QUÍMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
BUCARAMANGA  
2013**

**SÍNTESIS DE CIANOARILMETIL ACETATOS MEDIANTE REACCIONES  
QUIMICAS CONVENCIONALES VS REACCIONES QUIMICAS ENZIMÁTICAS**

**Autor:**

**CARLA MARGARITA URIBE RINCÓN**

**Trabajo de grado presentado para optar el título de Químico**

**Director:**

**VLADIMIR V. KOUZNETSOV, *PhD, DSc.***



**LABORATORIO DE QUIMICA ORGÁNICA Y BIOMOLECULAR (LQOBio)  
ESCUELA DE QUÍMICA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
BUCARAMANGA  
2013**

## **DEDICATORIA**

*Dedicado a la vida, ya que, por este trabajo aprendí a valorarla y apreciar cada momento y personas con las que compartí. A Dios, por darme cada una de esas cosas junto a mi familia y la oportunidad de estudiar.*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a mi Familia, a mi mamá y papá por todo el esfuerzo que pusieron para mi formación, además de la compañía, amor y amistad incondicional. A mis hermanas, Ximena, Diana y Laura, por acompañarme en la vida, especialmente a mi hermana Diana por escucharme, aconsejarme y enseñarme, junto a su esposo que me acogieron muchas veces en su casa cuando necesité su ayuda. A mi Abuela Emma Reyes, que gracias a su experiencia apoyo mi estudio.

Agradezco también al profesor Vladimir Kouznetsov, por aceptarme en su grupo de investigación, por creer en mí, además de tenerme paciencia, por ser un ejemplo de sabiduría y porque espero algún día hacerlo sentir orgulloso de que en lo que me aportó, ayudó a formar una persona que ofrece conocimiento al mundo.

Al profesor Juan Manuel Urbina, porque, por él encontré la pasión a la síntesis orgánica y las ganas de trabajar en un laboratorio de investigación, porque cada una de sus palabras fueron enseñanzas caladas en mi mente.

A todos y cada uno de los integrantes del LQOBio, por acompañarme, escucharme, regañarme, escuchar música, trabajar y aportarle a mi trabajo el valor de continuar.

A la escuela de química y sus profesores, especialmente al profesor Alirio Palma por la Química Orgánica, al profesor Rodrigo Torres por Bioquímica, al profesor Enrique Mejía por fisicoquímica y a la profesora Elena Stashenko por cromatografía de gases y espectrometría de masas; son excelentes profesores y mentores en mi formación.

A Oscar Poncela, porque su amistad es invaluable.

Finalmente, a la Universidad Industrial de Santander, porque pude estudiar y comer con poco dinero.

## CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN	20
1. ESTADO DEL ARTE	22
1.1. Defensa química de las plantas	22
1.2. Cianogénesis	24
1.3. Cianohidrininas	25
1.3.1. Cianohidrininas racémicas	25
1.3.2. Cianohidrininas quirales	27
Mecanismo, estabilidad y actividad de (R)-HNL (PaHNL)	29
1.3.3. Aplicaciones de las cianohidrininas	31
1.3.3.1. Reacciones al grupo hidroxilo	31
1.3.3.2. Reacciones del grupo nitrilo	31
1.4. Herramientas bioquímicas usadas para determinar la actividad enzimática	32
1.4.1. Actividad específica enzimática	32
1.4.2. Cuantificación de proteínas por el método de <i>Bradford</i>	33
1.4.3. Electroforesis	33
1.5. Resolución enantiomérica mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	34
2. OBJETIVOS	37
2.1. OBJETIVO GENERAL	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3. PARTE EXPERIMENTAL	38
3.1. Síntesis de cianohidrininas vía catálisis química y enzimática y posterior acetilación de las cianohidrininas racémicas	39
3.1.1. Síntesis de las cianohidrininas 10a-c, usando métodos convencionales mediante catálisis ácida	39
Preparación “one pot” por formación de cianohidrininas y posterior acetilación en la síntesis de cianoarilmetil acetatos	43
3.1.2. Síntesis enzimática de cianohidrininas	45
3.1.2.1. Preparación y cálculo de la actividad enzimática del crudo de la enzima hidroxinitril liasa (HNL) proveniente de las almendras	45

3.1.2.2.	Síntesis quiral de cianohidrinas 10a-c usando el crudo de la enzima HNL.	47
4.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
4.1.	Preparación de los $\alpha$ -hidroxinitrilos racémicos 10a-c, mediante catálisis ácida	50
4.2.	Preparación “one pot” de cianoarilmetil acetatos formando el intermediario cianohidrínico	55
4.3.	Síntesis enzimática de cianohidrinas	62
4.3.1.	Actividad enzimática del crudo de la enzima HNL proveniente de las almendras	62
4.3.2.	Síntesis de cianohidrinas 10a-c usando el crudo de la enzima hidroxinitril liasa	64
5.	CONCLUSIONES	76
	BIBLIOGRAFÍA	77
	ANEXOS	80

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Espectro de IR del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo <b>10b</b> .	54
<b>Figura 2:</b> Fragmentograma del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo ( <b>10b</b> ).	54
<b>Figura 3:</b> Espectro IR del ciano(piridin-2-il)metil acetato ( <b>12c</b> ).	58
<b>Figura 4:</b> Espectro de masas del ciano(piridin-2-il)metil acetato ( <b>12c</b> ).	59
<b>Figura 5:</b> Espectro de $^1\text{H}$ RMN del ciano(piridin-2-il)metil acetato ( <b>12c</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).	60
<b>Figura 6:</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN del ciano(piridin-2-il)metil acetato ( <b>12c</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).	61
<b>Figura 7:</b> Espectro DEPT-135 del compuesto ciano(piridin-2-il)metil acetato ( <b>12c</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).	62
<b>Figura 8:</b> Velocidad de reacción de la desnitrilación del mandelonitrilo a benzaldehído.	63
<b>Figura 9:</b> Gel de electroforesis del crudo enzimático de la hidroxinitril liasa. Carril 1 marcadores de masa molar. Carriles 2 y 3 crudo enzimático.	64
<b>Figura 10:</b> Espectro de masas del 2-hidroxi-2-fenilacetoneitrilo ( <b>10a</b> ).	66
<b>Figura 11:</b> Espectro de IR del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo ( <b>10b</b> ).	67
<b>Figura 12:</b> Fragmentograma del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo ( <b>10b</b> ).	67
<b>Figura 13:</b> Espectro de $^1\text{H}$ -RMN del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil)acetoneitrilo ( <b>10b</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).	68
<b>Figura 14:</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetoneitrilo ( <b>10b</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).	69
<b>Figura 15:</b> Espectro de DEPT-135 del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetoneitrilo ( <b>10b</b> ) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).	70
<b>Figura 16:</b> Interacción carbono-hidrógeno a 2 y 3 enlaces del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil)acetoneitrilo 10b a través del espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC	71
<b>Figura 17:</b> Interacción de los protones con los carbonos a través del espectro HSQC.	72
<b>Figura 18:</b> Interacción entre protones a través del espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY.	73
<b>Figura 19:</b> Anisocronía del protón metilénico, usando DMAP-(S)-ácido mandélico.	74

**Figura 20.** Anisocronía del protón metilénico, usando DMAP-(R)-ácido mandélico.

74

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Compuestos colaterales (metabolitos secundarios) generados a partir de síntesis de metabolitos primarios.	22
<b>Esquema 2.</b> Cianogénesis	24
<b>Esquema 3.</b> Métodos de preparación de cianohidrinas.	25
<b>Esquema 4.</b> Mecanismo de formación de las cianohidrinas.	26
<b>Esquema 5.</b> Mecanismo reversible “Uni-Bi”, de degradación y formación de cianohidrinas.	29
<b>Esquema 6.</b> Aplicación de cianohidrinas.	32
<b>Esquema 7.</b> Esquema general de la síntesis de las cianohidrinas <b>10</b> y los cianoarilmetil acetatos <b>12</b> .	39
<b>Esquema 8.</b> Preparación de acetona cianohidrina <b>9b</b> .	40
<b>Esquema 9:</b> Preparación de las cianohidrinas <b>10a-c</b> .	40
<b>Esquema 10.</b> Equilibrio 2-piridincarboxaldehído / 2-hidroxi-2-pididinil acetonitrilo y posterior formación de la $\alpha$ -piridoína.	42
<b>Esquema 11.</b> Formación de las cianohidrinas y acetilación, reacción one-pot.	43
<b>Esquema 12.</b> Síntesis enzimática de cianohidrinas <b>10a-c</b> .	47
<b>Esquema 13.</b> Estado de transición cíclico de 7 miembros en la adición del ion cianuro al carbonilo del aldehído.	50
<b>Esquema 14.</b> Estado de transición cíclico de 6 miembros en la adición del ión cianuro al carbonilo del aldehído.	51
<b>Esquema 15. (a)</b> Disociación del metabisulfito de sodio. <b>(b)</b> Mecanismo de adición de cianuro mediada por la sal ácida metabisulfito de sodio.	51
<b>Esquema 16.</b> Mecanismo de dimerización del 2-piridincarboxaldehído y obtención de la $\alpha$ -piridoína.	53
<b>Esquema 17.</b> Ruta de fragmentación propuesta para el 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil)acetonitrilo <b>10b</b> .	55

<b>Esquema 18.</b> Formación de las cianohidrinas y acetilación, reacción one-pot.	56
<b>Esquema 19:</b> Ciclo catalítico propuesto para el proceso de catálisis en la formación de cianohidrinas. <sup>31</sup>	56
<b>Esquema 20:</b> Mecanismo de reacción de acetilación catalizado por la piridina.	57
<b>Esquema 21:</b> Posible ruta de fragmentación del ciano(piridin-2-il)metil acetato ( <b>12c</b> ).	59
<b>Esquema 22.</b> Síntesis enantioselectiva usando el crudo de HNL.	65
<b>Esquema 23.</b> Posible ruta de fragmentación del 2-hidroxi-2-fenilacetónitrilo ( <b>10a</b> ).	66

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Hidroxinitril liasas para síntesis orgánica.	28
<b>Tabla 2:</b> Métodos en la preparación de las cianohidrinas.	40
<b>Tabla 3:</b> Ensayo de Bradford del blanco.	46
<b>Tabla 4:</b> Ensayo de Bradford del crudo de HNL.	46
<b>Tabla 5:</b> Rendimiento en la síntesis de cianohidrinas mediante los métodos A, B, C.	52
<b>Tabla 6:</b> Propiedades físicas y espectroscópicas de las cianohidrinas <b>10a-10b</b> .	53
<b>Tabla 7:</b> Propiedades físicas y espectroscópicas (IR) de O-acetilcianohidrinas <b>12a-c</b> .	57
<b>Tabla 8:</b> Datos espectrométricos de los acetatos sustituidos <b>12</b> .	58
<b>Tabla 9:</b> Datos del método de velocidades iniciales de reacción	63
<b>Tabla 10.</b> Puntos de interacción carbono-hidrógeno a 2 y 3 enlaces del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo en el espectro $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC.	71

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO I</b> Espectros relacionados al compuesto <i>10a</i>	81
<b>ANEXO I A</b> Espectro infrarrojo del mandelonitrilo ( <i>10a</i> ).	81
<b>ANEXO I B.</b> Cromatograma del mandelonitrilo ( <i>10a</i> )	81
<b>ANEXO I C</b> Fragmentograma del mandelonitrilo ( <i>10a</i> )	82
<b>ANEXO II</b> Espectros relacionados al compuesto <i>10b</i>	82
<b>ANEXO II A</b> Espectro infrarrojo del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo ( <i>10b</i> )	82
<b>ANEXO II B</b> Cromatograma del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo ( <i>10b</i> )	83
<b>ANEXO II C</b> Fragmentograma del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo ( <i>10b</i> )	83
<b>ANEXO III</b> Espectros relacionados al compuesto <i>12b</i>	84
<b>ANEXO III A</b> Espectro infrarrojo del Ciano(2-nitrofenil)metil acetato ( <i>12b</i> ).	84
<b>ANEXO III B</b> Cromatograma del Ciano(2-nitrofenil)metil acetato ( <i>12b</i> )	84
<b>ANEXO III C</b> Fragmentograma del Ciano(2-nitrofenil)metil acetato ( <i>12b</i> )	85
<b>ANEXO III D</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN del Ciano(2-nitrofenil)metil acetato ( <i>12b</i> )	85
<b>ANEXO III E</b> Espectro de <sup>13</sup> C-RMN del Ciano(2-nitrofenil)metil acetato ( <i>12b</i> )	86
<b>ANEXO III F</b> Espectro de DEPT-135 del Ciano(2-nitrofenil)metil acetato ( <i>12b</i> )	86
<b>ANEXO IV</b> Espectros relacionados al compuesto <i>12c</i>	88
<b>ANEXO IV A</b> Espectro infrarrojo del Ciano(piridin-2-il)metil acetato ( <i>12c</i> ).	87
<b>ANEXO IV B</b> Cromatograma del Ciano(piridin-2-il)metil acetato ( <i>12c</i> )	87
<b>ANEXO IV C</b> Fragmentograma del Ciano(piridin-2-il)metil acetato ( <i>12c</i> )	88
<b>ANEXO IV D</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN del Ciano(piridin-2-il)metil acetato ( <i>12c</i> )	88
<b>ANEXO IV E</b> Espectro de <sup>13</sup> C-RMN del Ciano(piridin-2-il)metil acetato ( <i>12c</i> ).	89
<b>ANEXO IV F</b> Espectro de DEPT-135 del Ciano(piridin-2-il)metil acetato ( <i>12c</i> ).	89
<b>ANEXO V</b> Espectros relacionados al compuesto <i>10a</i>	90
<b>ANEXO V A</b> Cromatograma del mandelonitrilo ( <i>10a</i> )	90
<b>ANEXO V B</b> Fragmentograma del mandelonitrilo ( <i>10a</i> )	90

<b>ANEXO VI</b> Espectros relacionados al compuesto <i>10b</i>	91
<b>ANEXO VI A</b> Espectro infrarrojo del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo ( <i>10b</i> )	91
<b>ANEXO VI B</b> Cromatograma del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo ( <i>10b</i> )	91
<b>ANEXO VI C</b> Fragmentograma del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo ( <i>10b</i> )	92
<b>ANEXO VI D</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo ( <i>10b</i> )	92
<b>ANEXO VI E</b> Espectro de <sup>13</sup> C-RMN del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo ( <i>10b</i> )	93
<b>ANEXO VI F</b> Espectro de DEPT-135 del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo ( <i>10b</i> )	93
<b>ANEXO VI G</b> Espectro de COSY del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo ( <i>10b</i> )	94
<b>ANEXO VI H</b> Espectro de HSQC del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo ( <i>10b</i> )	94
<b>ANEXO VI I</b> Espectro de HMBC del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo ( <i>10b</i> )	95
<b>ANEXO VII</b> Espectros relacionados al compuesto <i>10d</i>	96
<b>ANEXO VII A</b> Cromatograma de la $\alpha$ -piridoína ( <i>10d</i> )	96
<b>ANEXO VII B</b> Fragmentograma de la $\alpha$ -piridoína ( <i>10d</i> )	96

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>mg</b>	Miligramo
<b>G</b>	Gramos
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>µg</b>	Microgramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>µL</b>	Microlitro
<b>mmol</b>	Milimoles
<b>mV</b>	Milivoltios
<b>KBar</b>	Kilobar
<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>H</b>	Horas
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis que resulta mortal para la mitad de una población en estudio
<b>ND</b>	No determinada
<b>Atm</b>	Atmósfera
<b>t.a.</b>	Temperatura ambiente
<b>MW</b>	Microondas
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>R<sub>f</sub></b>	Factor de retención
<b>IR</b>	Espectroscopia infrarroja
<b>V</b>	Vibración
<b>cm<sup>-1</sup></b>	Número de onda
<b>T.</b>	Tensión
<b>F.</b>	Flexión
<b>as.</b>	Asimétrica
<b>sy.</b>	Simétrica
<b>CG-MS</b>	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
<b>IE</b>	Impacto de electrones
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>m/z</b>	Relación carga-masa
<b>eV</b>	Electronvoltios
<b>M<sup>+</sup></b>	Ión Molecular
<b>p.f.</b>	Punto de fusión
<b><sup>1</sup>H-RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear de protón
<b><sup>13</sup>C-RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
<b>Δ</b>	Desplazamiento químico
<b>s</b>	Singlete
<b>d</b>	Doblete
<b>dd</b>	Doblete doblete
<b>t</b>	Triplete
<b>M</b>	Multiplete
<b>dt</b>	Doblete triplete
<b>DEPT-135</b>	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

<b>COSY</b>	Correlated Spectroscopy H-H
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Coherence
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>Hz</b>	Hertz
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamiento
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>Ar</b>	Arilo
<b>Ph</b>	Fenilo
<b>Et<sub>3</sub>N</b>	Trietilamina
<b>DIPE</b>	Di-isopropiléter
<b>HNL</b>	Hidroxinitril Liasa
<b>CAL B</b>	Lipasa <i>Candida Antarctica B</i>
<b>AcOEt</b>	Acetato de Etilo
<b>Hxn</b>	Hexanos
<b>HCN</b>	Ácido cianhídrico

## **TÍTULO: SÍNTESIS DE CIANOARILMETIL ACETATOS MEDIANTE REACCIONES QUÍMICAS CONVENCIONALES vs REACCIONES QUÍMICAS ENZIMÁTICAS<sup>†</sup>**

**AUTOR: CARLA MARGARITA URIBE RINCÓN<sup>‡</sup>**

**PALABRAS CLAVE:** Cianohidrina, “one-pot”, cianohidrinas O-acetiladas, transhidrocianación, hidroxinitril liasa (HNL).

### **CONTENIDO**

Las cianohidrinas son compuestos empleados en la defensa química de la naturaleza, y se encuentran en cerca de 3000 plantas, insectos, hongos y bacterias. Estas se caracterizan por poseer gran versatilidad estructural provista de los grupos funcionales hidroxilo y cianuro, los cuales son transformables en innumerables sistemas multifuncionales. Las cianohidrinas ocupan un importante lugar en la interface entre la química y la biología, ya que hacen parte en bloques de construcción quiral y por ser los sustratos naturales de las enzimas hidroxinitril liasas. Su síntesis viene dada por la adición nucleofílica de cianuro a un componente carbonílico, catalizada por un medio ácido o básico, donde, en ausencia de control quiral se generan cianohidrinas racémicas. En el caso de la síntesis asimétrica de cianohidrinas, se encuentran reacciones catalizadas por bases de Schiff, péptidos o usando biocatalizadores como las enzimas hidroxinitril liasas.

En síntesis orgánica, este tipo de estructuras se hacen atractivas en diseño de síntesis multifuncional, por lo cual, el presente trabajo plantea la síntesis química y enzimática de cianohidrinas, usando medios ácidos y básicos, además de la táctica “one-pot” en síntesis de cianohidrinas O-acetiladas racémicas, y usando la enzima hidroxinitril liasa, mediante transhidrocianación de acetona cianohidrina al sustrato de partida (aldehído) en síntesis de cianohidrinas quirales.

---

<sup>†</sup>Trabajo de Grado

<sup>‡</sup>Facultad de Ciencias, Escuela de química, *Vladimir V. Kouznetsov, Ph. D., D. Sc.*

**TITLE: CYANOARILMETHYL ACETATES SYNTHESIS BY CONVENTIONAL CHEMISTRY REACTIONS vs. ENZYMATIC CHEMISTRY REACTIONS<sup>†</sup>**

**AUTHOR: CARLA MARGARITA URIBE RINCÓN<sup>‡</sup>**

**KEYWORDS:** Cyanohydrin, O-acetylated racemic cyanohydrins, transhydrocyanation, hydroxynitrile lyase HNL.

**CONTENT:**

Cyanohydrins are compounds used in chemical defense of nature, and they can be found in about 3000 plants, insects, fungi and bacteria. These are characterized by a wide structural versatility provided with cyanide and hydroxyl functional groups, these ones are convertible into innumerable multifunctional systems. Cyanohydrins occupy an important place in the interface between chemistry and biology, because they take a part in chiral building blocks in organic synthesis and are substrates for hydroxynitrile lyases (HNLs). Their synthesis comes from the cyanide nucleophilic addition to carbonyl compound, with the catalyzing been done by acid or basic media, where without chiral control racemic cyanohydrins are produced. In case of the asymmetric cyanohydrins synthesis, reactions can be found which implies the use of Schiff bases, peptides or using biocatalyst like hidroxynitrile lyases enzymes

In organic synthesis, such structures are attractive on multifunctional synthesis design. Therefore, this Thesis discusses the chemical and enzymatic synthesis of cyanohydrins, using acidic and basic media, in addition to the “one-pot” methodology applied on the synthesis of O-acetylated racemic cyanohydrins, and also using hydroxynitrile lyase (HNL) enzyme in transhydrocyanation acetone cyanohydrin to the starting substrate (aldehyde) in the synthesis of chiral cyanohydrins.

---

<sup>†</sup>Work of Grade

<sup>‡</sup>Faculty of Sciences, School of Chemistry. *Vladimir V. Kouznetsov, pH. D., DSc.*

## INTRODUCCIÓN

La ciencia siendo una de las actividades más completas que la humanidad posee, no solo por llenar y cumplir los sueños y curiosidades humanas, sino porque se ha convertido en una de las necesidades vitales para conservar la vida en la Tierra, cumple con la búsqueda de solucionar las diferentes patologías que aquejan a los seres vivos, llevando a analizar las plantas, que desde las civilizaciones antiguas han sido la fuente de supervivencia, reflejada en las moléculas de excreción llamadas metabolitos secundarios.

La química orgánica, siendo la ciencia base en la elucidación de estructuras y mecanismos de formación molecular, ha permitido profundizar en estos importantes metabolitos secundarios, revelando actividades tanto farmacológicas como biológicas ante los diferentes receptores moleculares en los mamíferos.

Los estudios químicos de estos metabolitos secundarios han identificado una propiedad intrínseca de la naturaleza, llamada enantioselectividad, la cual es importante en la síntesis de los bloques de construcción de moléculas biológicamente activas. La enantioselectividad se logra en las plantas por las moléculas de gran tamaño llamadas enzimas, las cuales albergan en su sitio activo la “magia” de la enantioselectividad obteniendo moléculas ópticamente activas.

Procurando mantener los patrones moleculares de las plantas, la síntesis orgánica, ha fijado el objetivo de obtener moléculas con alta actividad biológica y farmacológica, determinando que la mayoría de estas moléculas son ópticamente activas. Con la ayuda de las mismas plantas se ha logrado sintetizar este tipo compuestos, que como en el caso del uso de las almendras, fruto que alberga la enzima encargada del mecanismo de defensa llamado cianogénesis, permite sintetizar el precursor de su mecanismo de acción natural, llamado cianohidrina.

La cianación enantioselectiva de aldehídos y/o cetonas para dar cianohidrinas es una transformación muy versátil. Sin embargo, históricamente, no se ha encontrado aplicación generalizada de la cianación asimétrica en síntesis orgánica, ya que a menudo se pasa por alto en diseño de síntesis, además de que muchos químicos sintéticos son reacios al uso de procedimientos enzimáticos ya que se requieren aparatos de laboratorio no estándar, aparte de reactivos y protocolos por fuera del alcance de la formación de la mayoría de los químicos. También hay una falta de voluntad para considerar protocolos que no son genéricamente aplicables, en particular cuando se construyen rutas de síntesis con intermediarios complejos.

El presente trabajo estudia la reacción de adición del cianuro a un aldehído (cianación) en la que se obtienen compuestos en mezcla racémica, comparándola con la adición enantioselectiva usando la enzima hidroxinitril liasa (HNL), proveyendo un cercano protocolo en el uso de la enzima para posteriores transformaciones de aldehídos a cianohidrinas.

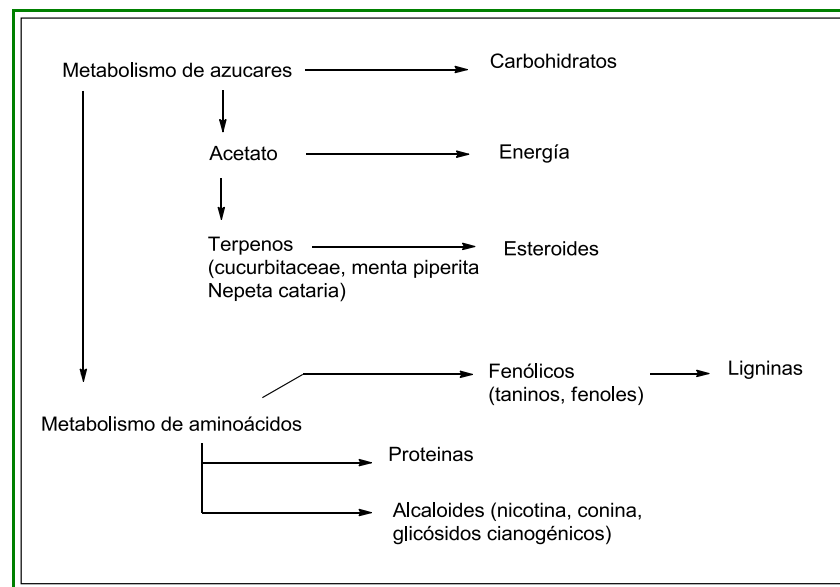
Algunos de los resultados preliminares de esta investigación se expusieron en el **XI CONGRESO COLOMBIANO DE FITOQUÍMICA**, presentando el trabajo titulado “**Síntesis de cianohidrinas a partir de aldehídos nitrogenados en diversos medios ácidos**” (modalidad póster) llevado a cabo del 5 al 7 de Octubre del 2011 en Medellín- Colombia.

La realización de esta investigación fue posible gracias a la financiación del **Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, contrato RC-0572-2012.**

# 1. ESTADO DEL ARTE

## 1.1. Defensa química de las plantas

A partir de las civilizaciones antiguas se tienen diferentes nociones de la gran “biblioteca química” que son los componentes químicos de las plantas, en las cuales se han observado tanto sus propiedades medicinales, como propiedades tóxicas. Se ha determinado que las plantas manejan órdenes de síntesis para cada una de las moléculas necesarias en su supervivencia, diferenciados por involucrarse en el crecimiento, desarrollo, reproducción (metabolitos primarios) y en la defensa de la planta (metabolitos secundarios). Los metabolitos primarios ejecutan funciones fisiológicas en el organismo, que mediante su biosíntesis, generan productos colaterales que son los metabolitos secundarios. Éstos se conocen también como compuestos aleloquímicos, en los que se incluyen las feromonas, venenos y fitocidas, los cuales químicamente corresponden a compuestos nitrogenados (alcaloides, glicosidos cianogénicos y glucosinolatos), terpenos y fenoles; teniendo un rol importante en el comportamiento, crecimiento o supervivencia de los herbívoros (**Esquema 1**).<sup>1</sup>



**Esquema 1.** Compuestos colaterales (metabolitos secundarios) generados a partir de síntesis de metabolitos primarios.

Los químicos orgánicos en el siglo XIX fueron los primeros en reconocer y estudiar la diversidad de los metabolitos secundarios de las plantas y analizarlos en términos de estructura y función. La apreciación moderna de los metabolitos secundarios desde las

<sup>1</sup> BIOLOGY Department of McDaniel College-Plant Defense Systems & Medicinal Botany  
<http://www2.mcdaniel.edu/Biology/bot99/herbnew/aprodbe.htm> <3/04/2013>

perspectivas ecológicas y evolutivas, tuvo su expansión con el artículo en la revista *Science* en 1959 por Fraenkel, titulado “Raison d’Etre of Secondary Plant Substances”,<sup>2</sup> en el que se exponían las sustancias químicas producidas colateralmente de los metabolitos primarios, que servían como productos de desecho para estos organismos carentes de sistemas excretores. Un año después de la publicación por Fraenkel, extensos artículos de revisión, tanto en la fisiología de la planta como la entomología, determinaron afinidades filogenéticas, de manera que los detalles de distribución de las estructuras químicas entre taxones no se explicara sin tener en cuenta relaciones de evolución.<sup>3</sup>

Hace 450 millones de años en el periodo Ordoviciano, las primeras plantas terrestres evolucionaron de las acuáticas, suprimiendo el yodo de su metabolismo, que es esencial para las células animales. Una importante acción antiparasitaria es causada por el bloqueo de transporte de yodo en las células animales, inhibiendo el simportador yodo-sodio.<sup>4</sup> Muchos de los compuestos aleloquímicos como los glucósidos cianogénicos, actúan liberando cianuro, bloqueando el citocromo oxidasa y el simportador yodo-sodio, siendo venenoso para una gran parte de parásitos y herbívoros.

Los compuestos cianogénicos se han encontrado en cerca 3000 plantas (helechos, gimnospermas, angiospermas monocotiledóneas y dicotiledóneas), bacterias, hongos, centípodos y milópodos, los cuales tienen en común a las cianohidrininas, compuestos habitualmente inestables. Éstas, generalmente, son estabilizadas por la glicosilación, formando a los glicósidos cianogénicos o, rara vez, por esterificación de la función hidroxilo formando a los cianolípidos. Al destrozarse el tejido de las plantas o insectos, los glicósidos se hidrolizan a la resultante cianohidrina, la cual se descompone bajo la influencia del pH o a la actividad de una enzima oxinitrilasa, a un componente carbonilo y ácido cianhídrico (HCN).<sup>5</sup>

En las células, los glicósidos cianogénicos se encuentran inactivos en la vacuola; ellos pasan a ser tóxicos cuando el tejido es afectado y la membrana celular se rompe, permitiendo a los glicósidos cianogénicos entrar en contacto con las enzimas en el citoplasma, liberando el cianuro de hidrógeno y bloqueando la respiración celular, funcionando como mecanismo de defensa. Este proceso se denomina *cianogénesis*.<sup>6</sup>

---

<sup>2</sup> FRAENKEL, G. The raison d’Etre of secondary plant substances. *Science*, **1959**, *129*, 1466-1470.

<sup>3</sup> THEIS, N.; LERDAU, M. The evolution of function in plant secondary metabolites. *J. Plant. Sci.*, **2003**, *164*, 93-102.

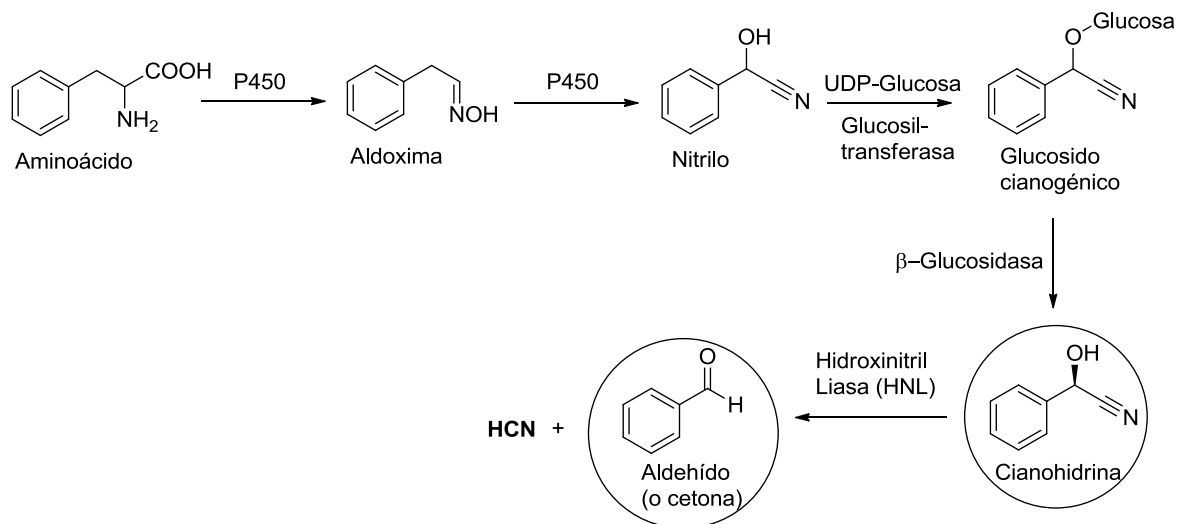
<sup>4</sup> VENTURI, S. Evolutionary significance of Iodine. *Curr. Chem. Biol.*, **2011**, *5*, 155-162.

<sup>5</sup> NAHRSTEDT, A. Cyanogenic compounds as protecting agents for organisms. *Pl. Syst. Evol.*, **1985**, *150*, 35-47.

<sup>6</sup> VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicol.*, **2000**, *38*, 11-36.

## 1.2. Cianogénesis

Químicamente, el proceso de cianogénesis inicia con reacciones de N-hidroxilación, descarboxilación y deshidratación de aminoácidos hidrofóbicos, como L-tirosina, L-fenilalanina, L-valina, L-isoleucina y L-leucina. Las reacciones son mediadas por el sistema enzimático P450\* para formar una aldoxima. Mediante la deshidratación e hidroxilación del carbono  $\alpha$  de la aldoxima, catalizada por acción de un segundo P450, se forma un  $\alpha$ -hidroxinitrilo. Generalmente el  $\alpha$ -hidroxinitrilo formado es inestable, y al ser fuente de nitrógeno para biomoléculas, hace necesaria la glucosilación como protector del compuesto, catalizada por una UDP-glucosa glucosiltransferasa, resultando en el glucósido cianogénico. Una vez el tejido es alterado o dañado, el glucósido cianogénico es hidrolizado por una  $\beta$ -glucosidasa, liberando la cianohidrina, que ya sea por el pH o por acción de la enzima hidroxinitril liasa, elimina el cianuro de hidrógeno como mecanismo de defensa. (Esquema 2).<sup>7</sup>



Esquema 2. Cianogénesis

Los productos cianohidrínicos ocupan un importante lugar en la interfase entre la química y la biología ya que tiene potencial sintético como bloque de construcción quiral o por comportarse como auxiliar quiral en la búsqueda y/o producción de fármacos, agroquímicos y otros compuestos ópticamente activos, mediante reacciones químicas o quimio-enzimáticas.

<sup>7</sup> DADASHIPOUR, M.; ASANO, Y. Hydroxynitril lyases: Insights into biochemistry, discovery, and engineering. *ACS Catal.*, **2011**, *1*, 1121-1149.

\* P450: Enzima monoxigenasa que cataliza la reacción en la que dos átomos de oxígeno son reducidos a un grupo hidroxilo y una molécula de agua por oxidación concomitante de NADPH.

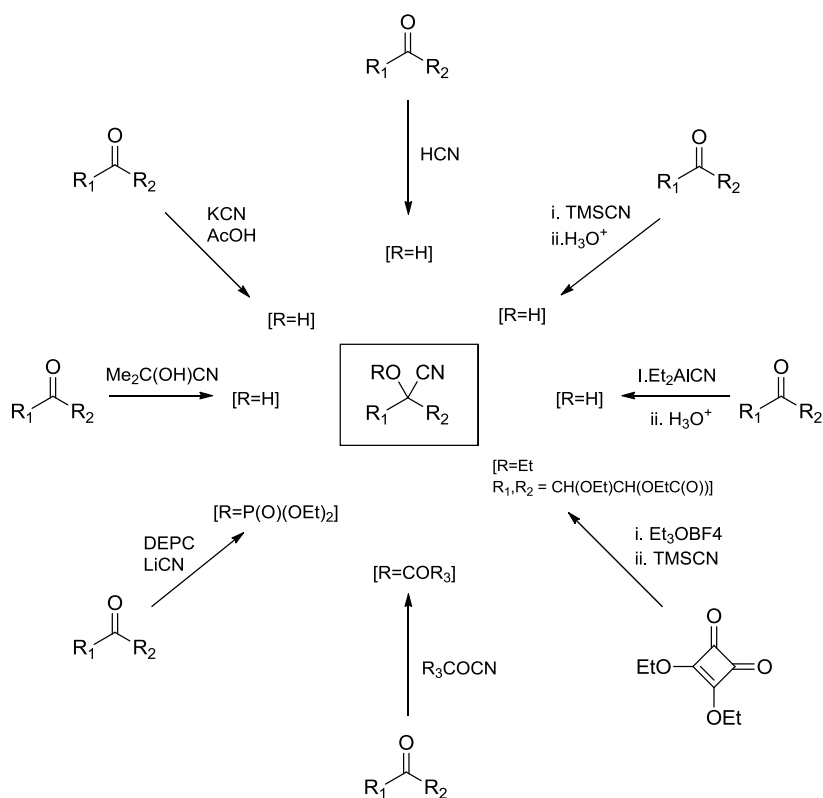
### 1.3. Cianohidrinas

Según el *Compendio de Terminología Química* (IUPAC's Gold Book), las cianohidrinas son alcoholes sustituidos por un grupo ciano atado al mismo átomo de carbono, formalmente derivado de aldehídos o cetonas por la adición de cianuro de hidrógeno.<sup>8</sup>

La presencia de estos dos grupos sobre un mismo carbono, provee tanto productos racémicos como productos enantioméricamente puros, dependiendo de las reacciones que se lleven a cabo para su formación.

#### 1.3.1. Cianohidrinas racémicas

Su síntesis, como se ha indicado anteriormente, viene dada por la adición nucleofílica del ion cianuro a un compuesto carbonilo, ya sea un aldehído o una cetona. Teniendo en cuenta que esta adición se da, ya sea por la fuerza nucleofílica del ion cianuro determinada por el medio, y de la electrodeficiencia del carbonilo, su síntesis se puede llevar a cabo mediante múltiples procedimientos, entre los que se encuentran:

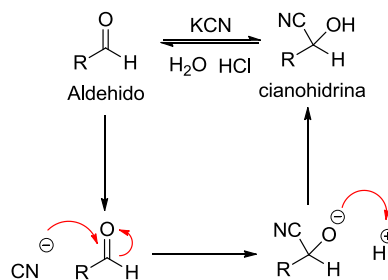


Esquema 3. Métodos de preparación de cianohidrinas.

<sup>8</sup> IUPAC Compendium of chemical terminology Gold Book. Version 2.3.2 (2012-8-19). P. 364.

La adición de una solución acuosa de sal de cianuro a una solución del sustrato (carbonilo) en ácido acético, es un procedimiento simple y relativamente seguro. Industrialmente, la adición de cianuro se hace directa del cianuro de hidrógeno al carbonilo, siendo este procedimiento altamente riesgoso. Otro método común es la reacción con reactivos de trialquil silil cianuro con catalizadores de yoduro de zinc y ácidos y bases de Lewis, dando derivados de cianohidrinas O-sililadas, hidrolizadas fácilmente en ácido. Un cuarto método, es la transhidrocianación de acetona cianohidrina al compuesto carbonilo, esta reacción es asistida en medio básico, el cual cataliza tanto la descomposición de la acetona como la formación del producto cianohidrínico. Algunos métodos usados no tan frecuentemente, son: el uso de cianuro de dietil aluminio en la adición a cetonas y aldehídos poco reactivos; el dietil cianofosfonato y el cianuro de litio para generar cianohidrinas dietil fosfatos; los cianuros de acilo en mezcla de carbonato de potasio en acetonitrilo da ésteres de cianohidrinas; y un caso especial es el uso de tetrafluoroborato de trietiloxonio y trimetilsilil cianuro para dar cianohidrinas-O-etiladas (siendo un caso especial, donde el intermediario carbocatiónico es inusualmente estable)<sup>9</sup> (**Esquema 3**).

El mecanismo de formación de cianohidrinas se da mediante una reacción en equilibrio catalizada por una base (**Esquema 4**).<sup>10</sup> Generalmente, la síntesis con los aldehídos dirige el equilibrio hacia el lado de los productos, pero la reacción con las cetonas es contraria, lo cual se debe principalmente a la congestión estérica en el producto final.



**Esquema 4.** Mecanismo de formación de las cianohidrinas.

El producto cianohidrínico formado en ausencia de directores quirales es una mezcla racémica. La peculiaridad de que exista un equilibrio intrínseco en la reacción y que además el producto sea racémico, hace de esta reacción un foco para la resolución cinética dinámica.

<sup>9</sup> GREGORY, R. Cyanohydrins in nature and the laboratory: Biology, Preparations, and Synthetic applications. *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 3649-3682.

<sup>10</sup> CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. Organic chemistry. New York. Oxford University Press. **2001**. P. 137-138.

La resolución cinética dinámica es la separación total o parcial de dos enantiómeros de una mezcla racémica, por medio de una reacción de transformación. Este proceso se basa en las diferentes velocidades de reacción para cada uno de los enantiómeros, siendo eficaz cuando solo uno de ellos es transformado.<sup>11</sup> Mediante el equilibrio entre los racematos, y transformando a uno de los enantiómeros, se puede generar la transformación completa del enantiómero, proporcionando rendimientos enantioméricos (exceso enantiomérico, *ee*) por encima del 50%, porcentaje básico que generalmente se obtiene de la transformación de enantiómeros.

Sin embargo, la degradación y síntesis de cianohidrinas quirales se da todos los días en algunas plantas e insectos, bajo la guía de la enzima hidroxinitril liasa (HNL).

### 1.3.2. Cianohidrinas quirales

La síntesis enantioselectiva de las cianohidrinas se puede dar por tres reacciones principales, mediadas por catálisis química, enzimática y de péptidos.<sup>9,12</sup> En esta sección sólo se indicará la síntesis enantioselectiva de cianohidrinas mediada por un biocatalizador; en este caso, éste es la enzima hidroxinitril liasa, proveniente de las plantas, puntualmente del árbol caducifolio de la familia de las rosáceas *Prunus amygdalus*.

Como se señaló en el proceso de cianogénesis, la enzima hidroxinitril liasa se encarga de liberar el cianuro de hidrógeno (HCN) de la molécula de cianohidrina, como mecanismo de defensa. Diferentes estudios sobre esta enzima,<sup>13,14,15</sup> señalan que la degradación de la cianohidrina es reversible, haciendo posible la síntesis enantioselectiva de los  $\alpha$ -hidroxinitrilos.

Hace 95 años Rosenthaler<sup>16</sup> (1908) adoptó el primer procedimiento de condensación asimétrica del cianuro de hidrógeno con aldehídos y cetonas catalizada por una HNL.

Las hidroxinitril liasas u oxinitrilasas (HNLs E.C.4.2.2.10, E.C.4.2.1.11, E.C.4.2.1.37 y E.C.4.2.1.39) son un grupo diverso de enzimas, que catalizan la formación de un enlace carbono-carbono. Generalmente se agrupan en dos grandes conjuntos, basados en la

---

<sup>11</sup> PELLISSIER, H. Dynamic kinetic resolution. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 8291-8327.

<sup>12</sup> MICHEL, J.; HOLMES, I. Chemically catalyzed asymmetric cyanohydrins syntheses. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 2752-2778.

<sup>13</sup> HERNÁNDEZ, L.; LUNA, H.; RUÍZ-TERÁN, F.; VÁZQUEZ, A. Screening for hydroxynitrile lyase activity in crude preparations of some edible plants. *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, **2004**, *30*, 105-108.

<sup>14</sup> DREVENY, I.; ANDRYUSHKOVA, A.; GLIEDER, A.; GRUBER, K.; KRATKY, C. Substrate binding in the fad-dependent hydroxynitrile lyase from almond provides insight into the mechanism of cyanohydrin formation and explains the absence of dehydrogenation activity. *Biochem.*, **2009**, *48*, 3370-3377.

<sup>15</sup> DREVENY, I.; GRUBER, K.; GLIEDER, A.; THOMPSON, A.; KRATKY, C. The hydroxynitrile lyase from almond: A lyase that looks like an oxidoreductase. *Structure*, **2001**, *9*, 803-815.

<sup>16</sup> ROSENTHALER, L. Durch enzyme bewirkte asymmetrische synthesen. *Biochem. Z.*, **1908**, *14*, 238-253.

presencia o ausencia del cofactor flavín adenín dinucleótido (FAD). Este cofactor no se encuentra involucrado en la reacción con los sustratos, pero sí provee estabilidad estructural a la enzima y se cree que su presencia se debe a que es un remanente evolutivo de un ancestro dependiente del cofactor.<sup>17</sup> Generalmente se encuentra enlazado covalentemente a una región hidrofóbica del sitio activo, haciéndose indispensable en la estructura y actividad enzimática.

El grupo de HNL FAD dependiente pertenece a plantas Prunoideae y Maloideae, subfamilias de las Rosaceae, con el sustrato principal (R)-(+)-mandelonitrilo. El segundo grupo corresponde a las HNL carentes de FAD, siendo menos prevalentes y con diversas propiedades fisicoquímicas como la especificidad del sustrato, la masa, la glucosilación, el punto isoeléctrico, la estructura y la secuencia de aminoácidos. Estas HNL se encuentran en diferentes especies vegetales *Sorghum bicolor*, *Manihot esculenta*, *Hevea brasiliensis* y *Linum usitatissimum* (Tabla 1).<sup>18</sup>

**Tabla 1.** Hidroxinitril liasas para síntesis orgánica.

Planta	Abreviación; EC	Disponibilidad enzima	Sustrato natural	Cofactor FAD	Estereo- selectividad
<i>Prunus amygdalus</i>	PaHNL 4.1.2.10	Almendras	(R)- Mandelonitrilo	Si	(R)
<i>Linum usitatissimum</i>	LuHNL 4.1.2.10	Plántulas	Acetona cianohidrina, (R)-2- butanona	No	(R)
<i>Sorghum bicolor</i>	SbHNL 4.1.2.11	Plántulas de mijo	(S)-4-Hidroxi mandelonitrilo	No	(S)
<i>Hevea brasiliensis</i>	HbHNL 4.1.2.39	Hojas del árbol de caucho	Acetona cianohidrina	No	(S)
<i>Manihot esculenta</i>	MeHNL 4.1.2.37	Hojas de yuca	Acetona cianohidrina	No	(S)

Del grupo de las FAD dependientes, la almendra (*Prunus amygdalus*, PaHNL) es la fuente más común de (R)-hidroxinitril liasa ((R)-HNL), su crudo desengrasado tiene una actividad enzimática similar a la enzima pura. Su estabilidad se debe a que es naturalmente

<sup>17</sup> DREVENY, I.; KRATKY, C.; GRUBER, K. The active site of hydroxinitrile lyase from *Prunus amygdalus*: Modeling studies provides into the mechanism of cyanogenesis. *Protein Science*, **2002**, *11*, 292-300.

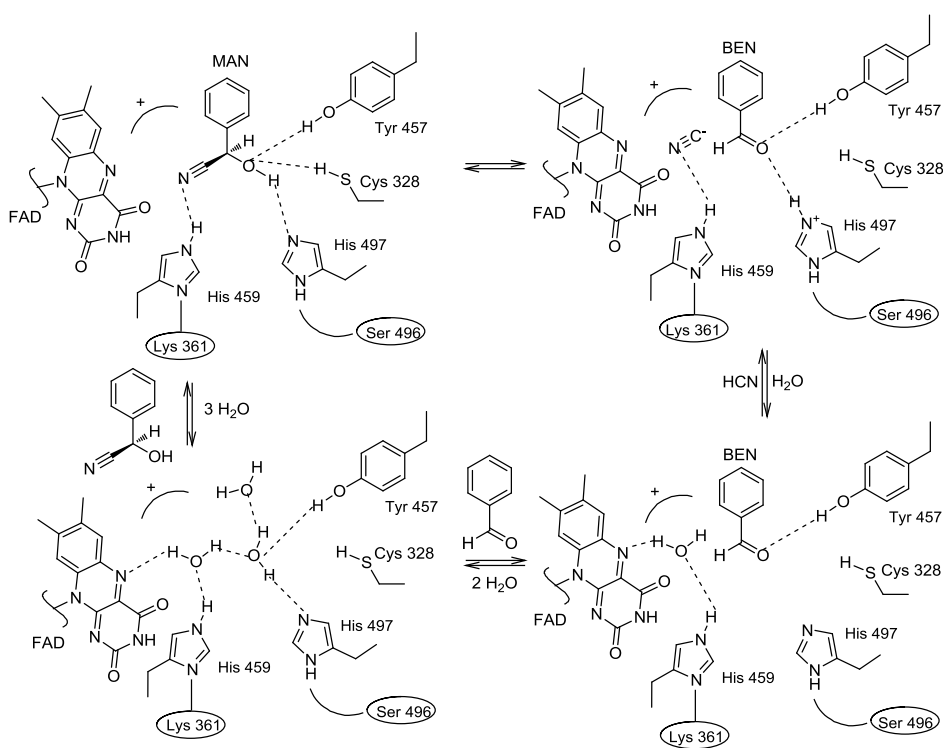
<sup>18</sup> GRIENGL, H.; SCHWAB, H.; FECHTER, M. The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases. *TIBTECH*, **2000**, *18*, 252-256.

inmovilizada por la matriz del alimento que queda al desengrasar las almendras. Además, su uso se ha ampliado debido a que es un catalizador económicamente accesible.<sup>19</sup>

A diferencia de las enzimas (R)-HNL, la adquisición de las (S)-HNL no es tan fácil, por lo que es necesario la clonación o la sobre-expresión en sistemas microbiales.

### Mecanismo, estabilidad y actividad de (R)-HNL (PaHNL)

El mecanismo de reacción en el sitio activo de la enzima se da mediante reacciones ácido/base mediadas por aminoácidos, en el que el agua juega el importante rol de rellenar el sitio activo mientras otra molécula de sustrato se introduce en el sitio, manteniendo la estructura activa de la enzima (**Esquema 5**).



**Esquema 5.** Mecanismo reversible “Uni-Bi”, de degradación y formación de cianohidrina.

La reacción comienza con el ingreso de una molécula de (R)-mandelonitrilo (sustrato natural) al sitio activo enzimático, atrapado por numerosas interacciones hidrofóbicas. Se cree que el aminoácido His497 actúa como base abstrayendo el protón del hidroxilo del mandelonitrilo, mientras el benzaldehído es estabilizado por puentes de hidrógeno de los aminoácidos adyacentes Cys328 y Tyr457. El aminoácido His459 dona un protón al

<sup>19</sup> SHARMA, M.; SHARMA, N.; BHALLA, T. Hydroxynitrile lyases: At the interface of biology and chemistry. *Enzyme. Microb. Tech.*, **2005**, 37, 279-294.

cianuro, y el sistema isoaloxazino del cofactor FAD estabiliza el ion, que luego por intercambio de moléculas de agua al sitio activo, libera tanto el cianuro de hidrógeno como el benzaldehído (**Esquema 5**). Este mecanismo recibe el nombre de “Uni-Bi”, ya que entra una molécula y se eliminan dos.<sup>14</sup> El mecanismo es reversible, por lo que la formación del producto nitrilado a partir del aldehído y del cianuro es posible.

Teniendo en cuenta que el agua es de vital importancia en el sitio activo, tanto para mantener la flexibilidad de la enzima como para suplir la falta de sustrato en el sitio activo, la reacción debe llevarse a cabo en medios acuosos. Además, la reacción se da mediante catálisis ácido/base; el valor de pKa corresponde al aminoácido libre His497 como base general, presentan un pH óptimo para la enzima de 5.5.<sup>14</sup>

No obstante, el producto deseado no es el aldehído sino el producto nitrilado, el cual es inestable bajo las anteriores condiciones enzimáticas. Esto advierte la posibilidad de estabilizar el producto mediante el solvente usado en la reacción ideándose sistemas bifásicos como solvente orgánico/agua inmiscibles, que proporcionen estabilidad enzimática y solubilidad del producto. La mezcla diisopropil éter/agua proporciona rendimientos químicos por encima del 98% y pureza enantiomérica por encima del 99% dependiendo del aldehído usado,<sup>20</sup> supliendo el factor de estabilidad tanto para la enzima como para el producto.

Por otro lado, el efecto de la temperatura sobre la HNL recae en la competencia de los enantiómeros por el sitio activo (relación enantiomérica E). Cuando la temperatura disminuye se incrementa la unión de uno de los enantiómeros, mejorando la selectividad. En algunos casos una disminución en la temperatura de reacción de 25 a 5 °C causa el doble de aumento en esta relación.<sup>21</sup> Además, el aumento en la temperatura causa un mayor movimiento molecular, causando desarreglos estructurales dirigidos hacia la desnaturalización de la enzima, evitando la transformación de los aldehídos a las cianohidrinas.<sup>14</sup>

Por último, la fuente de cianuro, como todo reactivo en una reacción, está supeditado a la concentración, y este caso no es la excepción. Altas concentraciones de HCN conducen a su liberación instantánea del medio de reacción. Alternativamente, la adición de HCN se puede remplazar por la generación indirecta en el medio, por el proceso de trans-hidroxicianación que permite una lenta difusión de HCN haciendo ventajosa la adición y resultando en alta pureza enantiomérica y rendimiento químico.<sup>19</sup>

---

<sup>20</sup> EFFENBERGER, F. Synthesis and reactions of optically active cyanohydrins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1994**, *33*, 1555-1564.

<sup>21</sup> PERSSON, M.; COSTES, D.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. *Enzyme Microb. Techn.*, **2002**, *30*, 916-923.

### 1.3.3. Aplicaciones de las cianohidrinas

El “grupo funcional”  $\alpha$ -hidroxi nitrilo es de interés orgánico debido a la factibilidad en la transformación de uno o de ambos sustituyentes, ya sea en sistemas racémicos o en sistemas asimétricos, siendo estos últimos los de mayor interés sintético por la misma demanda de compuestos quirales.

Ambas partes, el alcohol y el nitrilo se transforman por métodos generales y a menos que se indique lo contrario, éstos procederán libres de racemización, manteniendo la pureza óptica.

#### 1.3.3.1. Reacciones al grupo hidroxilo

La parte hidroxilada de la cianohidrina tiene la capacidad de actuar como nucleófilo o llevar a cabo desplazamientos nucleofílicos. Generalmente se tiende a proteger este grupo para escapar del problema de inestabilidad, degradación, racemización y reacciones colaterales que puedan estar asociadas con cianohidrinas desprotegidas.

La nucleofilicidad del alcohol se utiliza en síntesis quimio-enzimática de (R)-2-cianotetrahidrofurano y pirano, estructuras comunes en componentes de terpenos, feromonas, antibióticos y otros productos naturales biológicamente activos (**Esquema 6 (c)**).

La conversión del grupo hidroxilo a un grupo saliente, permite desplazamiento nucleofílico con inversión de la configuración, presentando sustitución por  $S_N2$ . Sin embargo los sistemas aromáticos son menos estables configuracionalmente debido a la estabilización del catión formado. Afortunadamente, la reacción con sistemas aromáticos se complementa con la reacción de Mitsunobu,<sup>22,23</sup> invirtiendo la configuración de cianohidrinas aromáticas y alifáticas, pero manteniendo la configuración de sistemas alifáticos.<sup>9,19</sup>

#### 1.3.3.2. Reacciones del grupo nitrilo

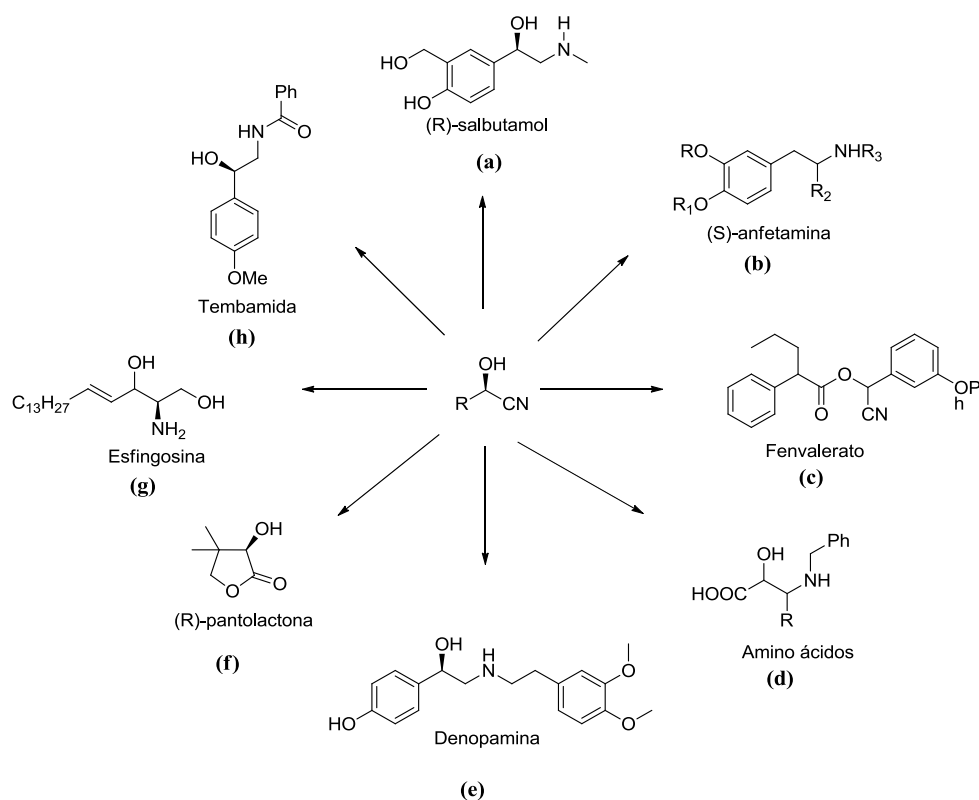
La protección del hidroxilo no es necesaria para algunas transformaciones del nitrilo, como la hidrólisis, la solvólisis y la reducción.

Algunos ejemplos como la hidrólisis de la (R)-cianohidrina del pivaldehído  $\beta$ -sustituido, corresponde a un  $\alpha$ -hidroxiácido que puede llevarse a ciclación para tener la (R)-pantolactona, usado como precursor o auxiliar quiral para el ácido (R)-pantoténico (constituyente de la coenzima A), el (R)-pantenol (bactericida) y (R)-pantoteina (factor de crecimiento) (**Esquema 6, (f)**).

---

<sup>22</sup> VÄNTTINEN, E.; KANERVA, L. Combination of Lipase-Catalysed resolution with the Mitsunobu esterification in one pot. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, *6*, 1779-1786.

<sup>23</sup> AHN, C.; CORREIA, R.; DeSHONG, P. Mechanistic study of the Mitsunobu reaction. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 1751-1753.



**Esquema 6.** Aplicación de cianohidridinas.

La reducción y N-acilación de una (R)-cianohidrina, forma el componente hidroxi-amida, que tiene estructura similar a la adrenalina, con actividad insecticida (**Esquema 6, (h)**).

Sin embargo las cianohidridinas protegidas permiten un amplio rango de transformación del nitrilo. La transformación puede introducir un nuevo centro quiral bajo control diastereoselectivo. El caso de sistemas  $\alpha,\beta$ -insaturados, bajo secuencias de reacción de: reducción, trans-iminación, reducción o Grignard, transiminación y reducción, que seguida de la protección del  $\beta$ -amino alcohol a un oxazolidinona, por ozonólisis, e hidrólisis alcalina, dan  $\alpha$ -hidroxi- $\beta$ -amino ácidos (**Esquema 6, (d)**). La protección como oxazolidinona de los  $\beta$ -aminoalcoholes arílicos permite una hidrogenación del grupo hidroxilo bencílico, para dar un rango de anfetaminas psicoactivas, que pueden proveer utilidad médica<sup>9,19</sup> (**Esquema 6, (b)**).

#### 1.4. Herramientas bioquímicas usadas para determinar la actividad enzimática

##### 1.4.1. Actividad específica enzimática

La actividad específica mide la velocidad de reacción de una enzima con un sustrato en particular (cinética enzimática). Se define como la cantidad de sustrato que la enzima

convierte por mg de proteína en la preparación enzimática por unidad de tiempo. La actividad específica es una medida de pureza ya que el valor aumenta cuando el preparado enzimático es más puro.<sup>24</sup>

#### **1.4.2. Cuantificación de proteínas por el método de *Bradford***

El método de *Bradford* es un método rápido y exacto para la estimación de la concentración de proteínas de un crudo o preparado enzimático. El método consiste en la unión del tinte azul de Coomassie G250 a la proteína. El tinte posee cuatro formas iónicas diferentes, la forma catiónica roja y verde que absorben a 470 nm y 650 nm respectivamente, y la forma aniónica azul que se enlaza a la proteína y tiene una absorbancia máxima de 590 nm a 620 nm. Por lo tanto, la cantidad de proteína se puede estimar determinando la cantidad de la forma aniónica azul del tinte, midiendo la absorbancia a 595, pues al pH de la reacción, se corre el riesgo de encontrar una porción de la forma verde que absorbe a 650 nm interfiriendo con la medida.

El reactivo se prepara disolviendo 100 mg de azul de Coomassie G250 en 50 mL de etanol al 95%. Luego, la solución se mezcla con 100 mL de ácido fosfórico al 85% y se afora a 1 L con agua destilada. El reactivo debe filtrarse (filtro No. 1) y luego guardarse en un recipiente ámbar a temperatura ambiente. El reactivo es estable durante varias semanas, sin embargo se recomienda filtrar antes de su uso.

Cualquiera que sea la proteína a la que se le determinará la concentración, es necesario construir la curva de calibración. A menudo el tinte responde de manera “genérica” a la proteína de albumina sérica bovina (BSA), siendo ésta barata y fácilmente disponible en forma pura. La concentración de la enzima BSA es de 1 mg/mL en una solución stock de agua destilada. La proteína se puede guardar a -20 °C, pero si la concentración varía, ésta se puede medir por absorbancia a 280 nm, la cual para una concentración de 1 mg/mL en una celda de 1 cm es de 1.35. Los implementos del ensayo deben estar libres de detergente.

#### **1.4.3. Electroforesis**

La electroforesis es una técnica importante en la separación de proteínas y ácidos nucleicos, basada en el desplazamiento de proteínas cargadas a través de un gel o matriz porosa que por acción de un campo eléctrico separa las proteínas por su tamaño o peso molecular. La electroforesis se considera un método analítico obteniendo la cantidad de proteínas en la muestra y el grado de pureza de una preparación proteica determinada, junto con la noción del punto isoeléctrico y la masa molecular aproximada de la proteína.<sup>24</sup>

---

<sup>24</sup> NELSON, D.; COX, M. Lehninger Principles of Biochemistry. New York, Worth Publishers, 3ra Ed, 2000, 92-95.

El proceso de la electroforesis se realiza en geles de polímero entrecruzado de poliacrilamida, desplazando la proteína de acuerdo a su cociente carga/masa y a la forma de cada proteína. Para la estimación de la pureza y la masa molecular de las proteínas, se emplea el detergente dodecil sulfato sódico (SDS), el cual se une con fuerza a la mayoría de proteínas en una cantidad aproximada a la masa molecular de la proteína (una molécula por cada dos residuos aminoácidos), donde el anión incorpora una carga negativa que confiere un cociente carga/masa similar para todas las proteínas y, a su vez, altera la conformación nativa (desnaturalización) de éstas, logrando que éstas adopten una conformación similar, separándolas en función de la masa molecular. Luego de ocurrida la migración de las proteínas, éstas se visualizan añadiendo un colorante como el azul de Coomassie, el cual se fija a las proteínas y no al gel, dejando ver en pequeñas bandas las proteínas separadas, mostrando con mayor intensidad las de mayor concentración.

### **1.5. Resolución enantiomérica mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear es una de las herramientas analíticas más importantes en la química moderna (orgánica e inorgánica), que permite determinar estructuras moleculares a resolución atómica en solución. Generalmente se usa para identificar la constitución, conformación y configuración de numerosas moléculas cada día. Sin embargo, para determinar la distinción de enantiómeros, el campo magnético es aquiral, presentando el mismo ambiente químico para los enantiómeros y por tanto el mismo espectro de RMN. La modificación química de enantiómeros es una posibilidad para diferenciar enantiómeros por la técnica de RMN pero esto limita a la existencia de un apropiado grupo funcional en la molécula de interés y especialmente en compuestos donde la modificación es irreversible.

Otra posibilidad es la orientación de la molécula de interés en un medio llamado “medio de alineamiento”, en este caso, la molécula es parcialmente alineada y los parámetros anisotrópicos de RMN como acoplos cuadrupolares, desplazan la anisotropía y ésta puede ser medida. Como la orientación en un medio de alineamiento quiral es diferente para cada enantiómero, los parámetros de anisotropía difieren también, haciendo posible la determinación de la pureza enantiomérica.<sup>25</sup> Los medios de alineamiento son diferentes para cada tipo de moléculas.

Para el caso de las cianohidrinas, es necesario un método simple, fácil de usar, económico y confiable en la determinación de la pureza enantiomérica (exceso enantiomérico, *ee*).

---

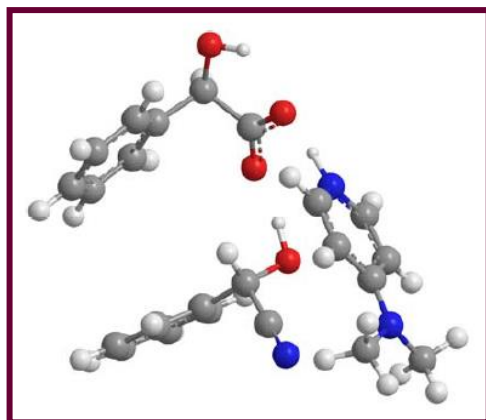
<sup>25</sup> LUY, B. Distinction of enantiomers by NMR spectroscopy using chiral orienting media. *J. Indian I. Sci.*, **2010**, *90*, 119-132.

Reportes recientes muestran que el ácido mandélico ópticamente activo en presencia de dimetilaminopiridina (DMAP) puede ser usado como reactivo (complejo) de desplazamiento quiral para determinar la pureza enantiomérica de cianohidrinas. Datos de algunas cianohidrinas de configuración conocida, analizadas usando el ácido mandélico-DMAP, reveló la existencia de una correlación entre el desplazamiento químico y la configuración absoluta de cianohidrinas.

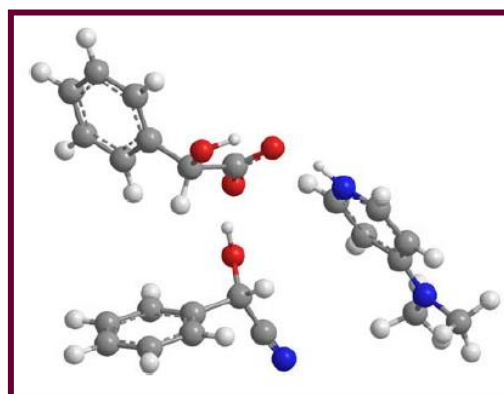
El espectro tomado usando el complejo (S)-ácido mandélico-DMAP y el mandelonitrilo, presenta un desdoblamiento del hidrógeno  $\alpha$  de éste, en una proporción aproximada de 1:1 basado en las integrales, generando un  $\Delta\delta$ , atribuido a la presencia del centro quiral.

Luego formando el complejo ácido mandélico-DMAP con cada uno de los enantiómeros del ácido, se toman los espectros con cianohidrinas de configuración conocida, generando el desdoblamiento del  $\alpha$ -H con cada uno de los enantiómeros del ácido. Hallando el valor de su diferencia  $\Delta\delta^{RS}$  ( $\Delta\delta^R - \Delta\delta^S$ ), se proporciona el exceso enantiomérico del producto nitrilado, donde el signo del valor, indica la configuración de la cianohidrina, positivo para (R) y negativo para (S).

Explorando la naturaleza del complejo formado en solución, el estudio plantea que la afinidad del enlace mandelato-DMAPH<sup>+</sup> con la cianohidrina, es del tipo huésped, determinado en un método de titulación por <sup>1</sup>H-RMN.



(S)-mandelonitrilo/(R)-mandelato-DMAPH<sup>+</sup>



(R)-mandelonitrilo/(R)-mandelato-DMAPH<sup>+</sup>

Seleccionando conformaciones, mediante estimaciones de energía mínima, se cree que el ión mandelato -piridinio muestra una longitud de enlace puente de hidrógeno NH- -O de 2.54 Å y un ángulo de 176°. El grupo hidroxilo del mandelonitrilo OH- -O forma un puente de hidrógeno con el carboxilato al lado opuesto al OH del mandelato. El grupo ciano

es colocado lejos del carboxilato, con el par de electrones del nitrógeno del ciano a 3.56 Å lejos del nitrógeno del grupo dimetilamino del DMAP. En el complejo (S)-mandelonitrilo con el par iónico (R)-mandelato-DMAPH<sup>+</sup>, el anillo fenílico del mandelato está cara a cara con el anillo fenílico del mandelonitrilo, mientras que en el complejo del (S)-mandelonitrilo con el par iónico (S)-mandelato-DMAPH<sup>+</sup>, los dos anillos están en una relación borde a cara.

El  $\alpha$ -H del mandelonitrilo en ambos modelos es colocado casi a la misma posición dentro de la zona de apantallamiento anisotrópico del anillo arilo del DMAP, lo cual explica el desplazamiento químico a campo alto que se observa en ambos enantiómeros.

Mientras el  $\alpha$ -H del mandelonitrilo experimenta apantallamiento anisotrópico adicional debido al anillo del fenilo del mandelato en el complejo (S)-mandelonitrilo/(R)-mandelato-DMAPH<sup>+</sup>, tal efecto de apantallamiento no se presenta por el  $\alpha$ -H del mandelonitrilo en el complejo (S)-mandelonitrilo/(S)-mandelato-DMAPH<sup>+</sup>. Por lo tanto, el valor de  $\Delta\delta^{RS}$  para (S)-mandelonitrilo se espera sea negativo, siendo consistente con los datos arrojados en el estudio.<sup>26</sup>

---

<sup>26</sup> MOON, L.; RAVINDER, S.; KASETTI, Y.; BHARATAM, P. A new chiral schift reagent for the determination of enantiomeric excess and absolute configuration in cyanohydrins. *Chem. Commun.*, **2009**, 1067-1069.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GENERAL

★ Obtener los hidroxipiridin-2-il)acetonitrilos y 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil)acetonitrilos, evaluando la síntesis química convencional y la síntesis enzimática.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

★ Extraer la enzima hidroxinitril liasa ((R)-HNL) de las almendras, determinar su presencia en el crudo, medir su actividad y finalmente usarla en la reacción enzimática para obtener las cianohidrinadas.

★ Encontrar las condiciones óptimas para la síntesis de las cianohidrinadas racémicas y quirales (hidroxipiridin-2-il)acetonitrilos y 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil)acetonitrilos) vía síntesis química convencional y vía catálisis enzimática.

★ Evaluar la posibilidad sintética y condiciones de reacción, en los dos métodos de síntesis utilizadas (catálisis enzimática vs catálisis química).

★ Determinar la configuración absoluta y el exceso enantiomérico de las cianohidrinadas enantioméricamente puras.

★ Caracterizar las estructuras de cada una de las cianohidrinadas y sus derivados por cada una de las reacciones utilizando técnicas instrumentales como IR (Espectroscopia infrarroja), CG-EM (Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas), RMN (Resonancia magnética nuclear) unidimensional ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y bidimensional (COSY, HSQC, HMBC).

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

- ***Materiales y reactivos***

Todos los solventes, reactivos y materiales fueron disponibles comercialmente de las marcas Merck, Aldrich, Mallinckrodt, J.T. Baker, grado síntesis. Éstos fueron apropiadamente purificados si era necesario. Las almendras de donde se extrajo la enzima hidroxinitril liasa, se adquirieron del supermercado teniendo en cuenta que no hubieran sido sometidas a calor, ni algún tratamiento que modificara sus propiedades enzimáticas, la marca elegida fue almendra natural (Carrefour).

- ***Equipos***

La composición, monitoreo y pureza de las reacciones y los reactivos se realizaron mediante cromatografía en capa fina (CCF) de Silufol UV<sub>254</sub> de 0,25 mm de espesor, reveladas en una cámara de luz UV de 254 nm, yodo o ácido molíbdico. La purificación se hizo por medio de cromatografía en columna (CC), utilizando gel de sílice 60 mesh como fase estacionaria y mezcla de solventes modificando la polaridad usando éter de petróleo, acetato de etilo y/o diclorometano como eluyente.

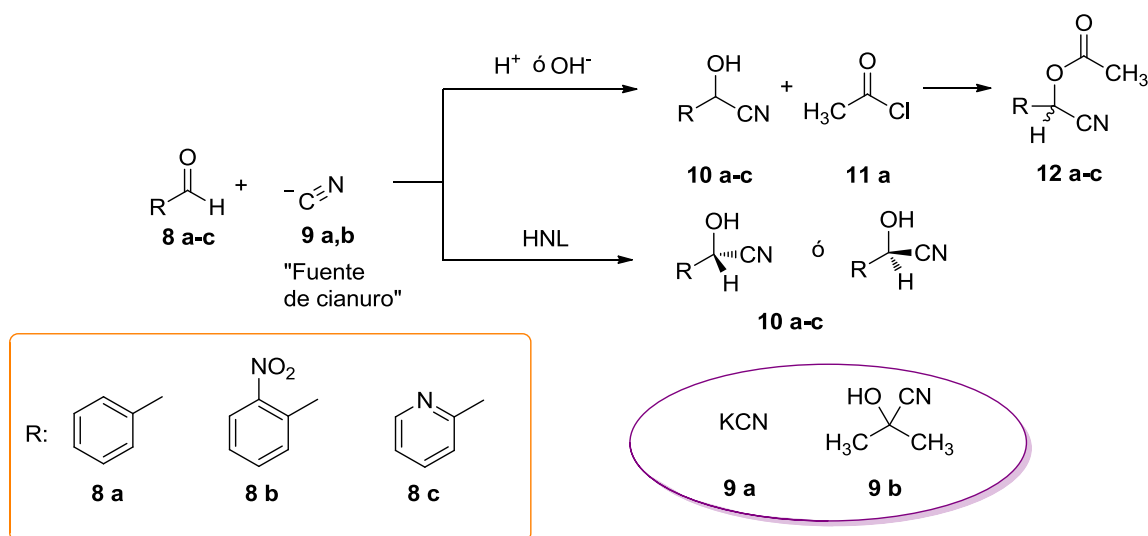
Los espectros de infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro Lumex Infracum FT-02 con transformada de Fourier usando KBr como soporte. Los análisis de cromatografía de gases se llevaron a cabo usando un Hewlett Packard 5890A serie II (columna HP 5 ms 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) acoplado a un detector selectivo de masas HP 5972 (analizador cuadrupolar rango de m/z 40-350) con ionización por impacto de electrones (70 eV), la programación de la columna fue de 100 °C (10 °C/min), 200 °C (15 °C/min) y 280 °C, temperatura del inyector 250 °C y volumen inyectado de 1 µL.

Espectros de resonancia magnética nuclear <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C y 2D se registraron en un espectrómetro Bruker Avance-400 utilizando cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>, TMS 0,03% v/v) o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d<sub>6</sub>). Los puntos de fusión se determinaron utilizando el fusiómetro Fisher-Johns. El pH se midió usando el pH-metro Thermo Scientific (ORION 3 STAR) pH Benchtop. El gel de electroforesis se escaneó mediante un densiómetro UMAX PowerLook 2100XL y visualizado a través del software PD Quest (Biorad).

### 3.1. Síntesis de cianohidrinas vía catálisis química y enzimática y posterior acetilación de las cianohidrinas racémicas

El esquema de síntesis de cianohidrinas con el fin de comparar la efectividad de la reacción, basada en rendimientos, junto a la probabilidad de obtenerlas quirales, plantea una catálisis química en la síntesis convencional para generar el producto racémico, con posterior protección para evitar reacciones colaterales, y también la síntesis por catálisis enzimática mediada por la HNL proveniente de las almendras, para generar el producto enantioméricamente puro (**Esquema 7**).

En este estudio se utilizaron las dos diferentes “fuentes de cianuro” y los tres aldehídos aromáticos **8a**, **8b** y **8c**, tanto en la síntesis de cianohidrinas **10a-c** como en la preparación de los compuestos acetilados **12a-c**.

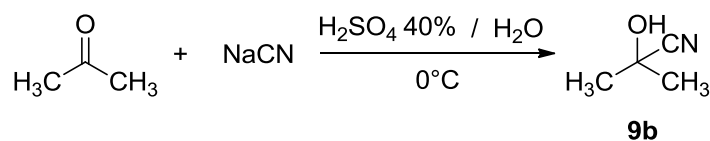


**Esquema 7.** Esquema general de la síntesis de las cianohidrinas **10** y los cianoarilmetil acetatos **12**.

#### 3.1.1. Síntesis de las cianohidrinas 10a-c, usando métodos convencionales mediante catálisis ácida

*La preparación de cianohidrinas requiere atención, precaución y adecuada protección: guantes, gafas y máscara antigás. La reacción debe hacerse en una cabina extractora.*

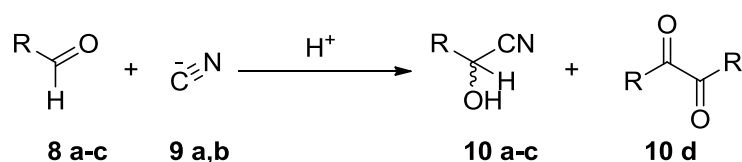
Antes de referirse a los métodos de síntesis de cianohidrinas planeadas, es necesario indicar la preparación previa de la acetona cianohidrina, importante precursor en las posteriores reacciones en las que se utilizará como “fuente de cianuro” orgánico (**Esquema 8**).



**Esquema 8.** Preparación de acetona cianohidrina **9b**.

Su síntesis se realizó en un balón fondo redondo de tres bocas de 100 mL, equipado con un embudo de adición, un agitador magnético y un burbujeador con una solución básica (para atrapar el ácido cianhídrico generado durante la reacción). Al balón se le agregaron 2.00 g (42 mmol) de NaCN en agua (5 mL) y acetona (4 mL, 54 mmol). La solución se agitó vigorosamente y el reactor se rodeó de un baño de hielo, cuando la temperatura cayó 0 – 10 °C, se añadió gota a gota una solución de ácido sulfúrico al 40% (5.7 mL, 42 mmol). La reacción se agitó durante 3 h.<sup>27</sup> Se observó la formación de una capa amarillenta en la superficie; se decantó y se transfirió sobre sulfato de sodio. La capa acuosa se filtró del bisulfito de sodio y se extrajo 2 veces con 25 mL de éter etílico; este se transfirió sobre sulfato de sodio, se filtró, se rotoevaporó y el producto **9b** se combinó con la previamente decantada y filtrada. Se secó al vacío y se obtuvieron 3.63 g (79%) de un líquido amarillento **9b**,  $\delta = 0.932$  g/mL; IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ) 3420<sub>(OH)</sub>, 2993<sub>(CH2)</sub>, 2942<sub>(CH3)</sub>, 2243<sub>(CN)</sub>, 1371<sub>(CH3)</sub>, 1190<sub>(C(CH3))</sub>.

Con el fin de obtener las cianohidrinas **10a-c** propuestas en esta investigación (**Esquema 9**), se plantearon tres protocolos de síntesis variando el medio de reacción (**Tabla 2**). Como se verá más adelante, los protocolos dieron diferentes resultados; además se obtuvo el producto **10d** proveniente de la reacción colateral de dimerización y oxidación del aldehído inicial.



**Esquema 9:** Preparación de las cianohidrinas **10a-c**.

**Tabla 2:** Métodos en la preparación de las cianohidrinas.

Método	Fuente de CN <sup>-</sup>	Ácido	T [°C]	T [min]
<b>A</b>	KCN ( <b>9a</b> )	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 40%	0	180
<b>B</b>	KCN ( <b>9a</b> )	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0	90
<b>C</b>	KCN ( <b>9a</b> )	HCl 5N	0	600

<sup>27</sup> COX, R.; STORMONT, R. Acetone cyanohydrin. *Org. Syn.*, **1943**, *Coll. Vol. 2*, 7.

### Método A:

Este método utiliza las condiciones usadas en la preparación de acetona cianohidrina **9b** (ver el protocolo descrito anteriormente), pero empleando el cianuro de potasio **9a** como fuente de cianuro. El rendimiento de las cianohidrinas fue: **10a** 71%, **10b** 25%, el producto **10c** no se logró obtener por este método.

### Método B:

En un balón fondo redondo de dos bocas de 50 mL rodeado de un baño de hielo, equipado con un agitador magnético, un embudo de adición y un burbujeador con una solución básica (NaOH 1M), se agregó una solución de KCN (0.32 g, 5 mmol) en 1 mL de agua junto a 5 mmol del correspondiente aldehído (**Tabla 2**). Luego se agregó gota a gota una solución saturada de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (2.5 g, 13.2 mmol) mientras que por la otra boca se agregaron pedazos de hielo.<sup>28</sup> El producto **10a** se formó en la capa superior de la solución acuosa como un líquido amarillo, el cual se decantó.

La cianohidrina **10b** no se formó usando el procedimiento anterior, por lo tanto se cambió el orden de agregación de reactivos. A una suspensión del aldehído **8b** (5 mmol) en agua (4.5 mL), se le agregó Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (1.19 g, 6.25 mmol). Una vez la suspensión se desvaneció, se enfrió en un baño de hielo y se agregó gota a gota una solución de KCN (0.41 g, 6.25 mmol) en 2.4 mL agua. La mezcla se agitó hasta que llegara a temperatura ambiente observándose la formación de sólido,<sup>29</sup> se filtró y las aguas se extrajeron con acetato de etilo, se secó sobre sulfato de sodio, se rotoevaporó, se puso en vacío hasta sequedad.

El producto **10c** no se obtuvo por este método, debido a la capacidad del piridina-2-aldehído **8c** de dimerizarse formando el producto inesperado, la  $\alpha$ -piridoína **10d**, cuyos datos se presentan en el protocolo del método C.

### Método C:

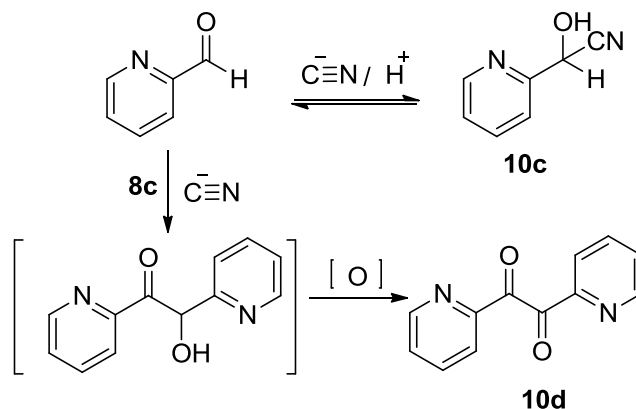
Este método se hizo con el fin de obtener la cianohidrina **10c**. En un balón de Schlenk de 50 mL, equipado con agitador magnético y un embudo de adición se añadió gota a gota una solución 5N de HCl a 5 mmol del aldehído **8c**, tras cada adición del ácido se midió el pH, una vez se alcanzó pH 2, se enfrió el sistema y se adicionó una solución saturada de KCN

---

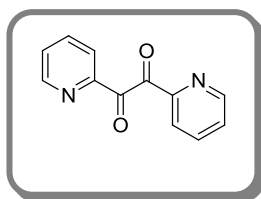
<sup>28</sup> YOSEF, H.; MORSY, N.; MAHRAN, M.; ABOUL-ENEIN, H. Preparation and Reaction of Optically Active Cyanohydrins Using the (R)-Hydroxynitrile Lyase from *Prunus amygdalus*. *J. Iran. Chem. Soc.*, **2007**, *4*, 44-58.

<sup>29</sup> ROSSI, F.; KAO, J. Nmoc-DBHQ, a new caged molecule for modulating sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase activity with light flashes. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 3266-3271.

esperando llegar a pH neutro.<sup>30</sup> Sin embargo mientras se adicionaba el KCN, se formó una masa cuyos tratamientos (filtración y secado al aire) dio un sólido rojizo, identificado como la  $\alpha$ -piridoína **10d** (Esquema 10), antes mencionada.

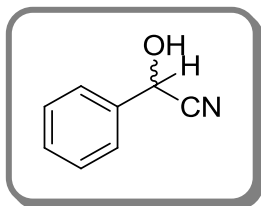


**Esquema 10.** Equilibrio 2-piridincarboxaldehído / 2-hidroxi-2-pididinil acetonitrilo y posterior formación de la  $\alpha$ -piridoína.



**$\alpha$ -Piridoína (10d)**

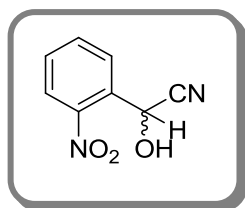
P.f: 180 °C, IR (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3378<sub>(OH)</sub>, 1589<sub>(CO)</sub>, 1465<sub>(OH)</sub>, 1265<sub>(CO)</sub>. GC-MS (IE 70 eV):  $t_R$  = 15.6 min,  $m/z$  (%) = 212 ( $M^{+*}$ , 16), 156 (40), 78 (100), 51 (50).



**2-Hidroxi-2-fenilacetonitrilo (10a)**

Líquido amarillo viscoso, obtenido mediante el método **A** con un rendimiento del 71% y por **B** el 84%;  $R_f$ : 0.4 (3:1 hexanos/acetato de etilo). IR (KBr  $\text{cm}^{-1}$ ): 3425  $\nu_{(OH)}$ , 3070  $\nu_{(CH)}$ , 2252  $\nu_{(CN)}$ , 1040  $\nu_{(CO)}$ . RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{(ppm)}$ : 7.51 (2H, dd,  $J = 6.5, 3.1$  Hz,  $H_{\text{Ph-6}}$ , 2), 7.46-7.42 (4H, m,  $H_{\text{Ph-3, 4, 5}}$ ), 5.52 (1H, s,  $H-1'$ ), 3.72 (1H, s, OH).  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{(ppm)}$ : 135.28 (-), 129.93 (+), 129.29 (2C) (+), 126.78 (2C) (+) 119.02 (CN) (-), 63.62 (+). GC-MS:  $t_R$  = 7.57 min, MS (EI)  $m/z$  (%) 133 ( $M^{+*}$  55), 115 (32), 105 (88), 89 (12), 77 (100), 51 (75). Fórmula molecular:  $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}$  (P.M.: 133.15 g/mol).

<sup>30</sup> MATHES, W.; SAUERMILCH, W. Über einige Beobachtungen in der Gruppe der Pyridinaldehyde. *Chem. Ber.*, **1956**, 89/6, 1515-1521.

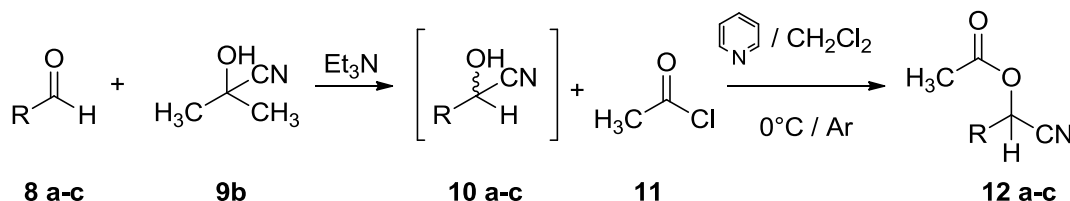


### 2-Hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (10b)

Cristales blancuzcos, p.f. = 92 °C, Método A: a 0.7 g (5 mmol) de **8c**, con 4.4 mL de la solución al (40%) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se le añadieron gota a gota 1.36 g (21 mmol) de KCN en 2.6 mL de agua. Rendimiento (25%). Método B: Rendimiento (41%); R<sub>f</sub>: 0.33 (3:1 hexanos/acetato de etilo); IR (KBr cm<sup>-1</sup>): 3492 ν<sub>(OH)</sub>, 3370 ν<sub>(OH)</sub>, 2248ν<sub>(CN)</sub>, 1524 ν<sub>(NO<sub>2</sub> as)</sub>, 1341 ν<sub>(NO<sub>2</sub> sy)</sub>, 1180 ν<sub>(C-OH)</sub>. GC-MS: t<sub>R</sub> = 14.69 min, MS (EI) m/z (%) 178 (M<sup>+</sup>\* 55), 150 (1), 121 (100), 93 (60), 76 (62), 65 (88). Fórmula molecular: C<sub>8</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (P.M.: 178.14 g/mol).

### Preparación “one pot” por formación de cianohidrinas y posterior acetilación en la síntesis de cianoarilmetil acetatos

Para la síntesis de las cianohidrinas **10a-c** se implementó la acetona cianohidrina **9b** y la trietilamina como catalizador en la liberación de cianuro. Sin embargo, debido a que algunas cianohidrinas fueron muy reactivas, inestables e imposibles de apartar del crudo, se preparó el siguiente procedimiento, que mediante reacciones sucesivas (cianación y acetilación) en un mismo reactor (one pot) se obtuviesen los cianoarilmetil acetatos **12a-c** (Esquema 11).

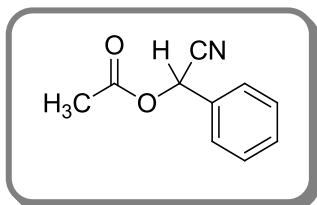


**Esquema 11.** Formación de las cianohidrinas y acetilación, reacción one-pot.

En un balón de Schlenk de 50 mL equipado con un agitador magnético se agregó el respectivo aldehído (9.3 mmol), la acetona cianohidrina **9b** (0.79 g, 9.3 mmol) y la trietilamina (0.046 g, 0.46 mmol) en 1.5 mL de acetonitrilo.<sup>31</sup> Se agitó durante una hora y se monitoreó por capa fina, observando el cambio de color en la solución y/o formación de precipitado. Inmediatamente, se puso en atmósfera de argón y se agregó piridina (1.47 g, 22 mmol) en 5 mL de diclorometano. El sistema se enfrió y se añadió lentamente el cloruro de acetilo (0.89 g, 11.3 mmol). Se agitó vigorosamente durante 1.5 h. La solución se lavó 3 veces con agua y luego con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub>. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el solvente se eliminó a presión reducida. Los

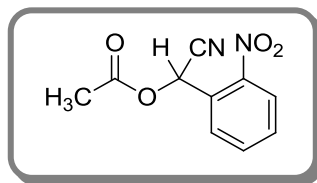
<sup>31</sup> PARASKAR, A.; SUDALAI, A.; Cu(OTf)<sub>2</sub> or Et<sub>3</sub>N-catalyzed three component condensation of aldehydes, amines and cyanides: a high yielding synthesis of α-aminonitriles. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, 47, 5759-5762.

cianoarilmetil acetatos se purificaron mediante cromatografía en columna (CC) en mezcla hexanos/acetato en las proporciones indicadas en los monitoreos de cromatografía de capa fina (CCF).



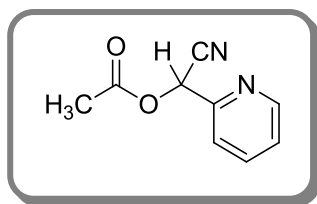
#### ***Ciano(fenil)metil acetato racémico (12a)***

Para la formación inicial de la cianohidrina se usó el método **B**:  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (2.14 g, 11.3 mmol), cianuro de potasio **9a** (1.27 g, 19.6 mmol) y el benzaldehído **8a** (0.98 g, 0.95 mL, 9.3 mmol). Para la consecutiva acetilación se le añadió una mezcla de DMAP (0.11 g, 0.91 mmol), piridina (2.24g, 2.28 mL, 28.0 mmol) y anhídrido acético (1.94 g, 1.79 mL, 19 mmol). Mediante análisis por cromatografía de gases el crudo se constituye por un 48% del compuesto. Líquido amarillo viscoso. GC-MS:  $t_R = 14.7$  min, MS (EI)  $m/z$  (%) 175 ( $M^+$ , 22), 133 (100), 115 (98), 105 (39), 89 (32), 77 (22), 43 (55). Fórmula molecular:  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$  (P.M.: 175.18 g/mol)



#### ***Ciano(2-nitrofenil)metil acetato racémico (12b)***

Compuesto preparado según el protocolo “one pot” a partir del 2-nitrobenzaldehído (1.40 g, 9.3 mmol), acetona cianohidrina (0.79 g, 9.3 mmol), trietilamina (0.046 g, 0.46 mmol), piridina (1.47 g, 22.0 mmol) y cloruro de acetilo (0.89 g, 11.3 mmol). Después de cromatografía en columna se obtuvieron 0.97 g (4.41 mmol) de un sólido amarillo claro. Rendimiento de 47%.  $R_f = 0.23$  (3:1 hexano/acetato de etilo);  $pf = 53$  °C; IR (disco de KBr  $\text{cm}^{-1}$ ): 1758  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$ , 1527  $\nu_{(\text{NO}_2 \text{ as})}$ , 1357  $\nu_{(\text{NO}_2 \text{ sy})}$ , 1218  $\nu_{(\text{CO})}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{(\text{ppm})}$ : 8.21 (1H, dd,  $J = 8.2, 1.2$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ph}-3}$ ), 7.94 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.3$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ph}-6}$ ), 7.83 (1H, td,  $J = 7.7, 1.3$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ph}-5}$ ), 7.73-7.68 (1H, m,  $\text{H}_{\text{Ph}-4}$ ), 7.07 (1H, s, H-7), 2.23 (3H, s, H-10).  $^{13}\text{C}$  RMN (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{(\text{ppm})}$ : 168.46 ( $\text{C}_{\text{co}-9}$ ), 147.00 ( $\text{C}_{\text{Ar}-2}$ ), 134.74 (C-3, +), 131.42 (C-6, +), 129.29 (C-5, +), 127.17 ( $\text{C}_{\text{Ar}-1}$ ), 125.89 (C-4, +), 115.11 (CN-8C), 59.66 (C-7, +), 20.27 (C-10, +). Fórmula molecular:  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4$  (P.M.: 220.18 g/mol)



#### ***Ciano(piridin-2-il)metil acetato racémico (12c)***

Compuesto preparado según el protocolo “one pot” a partir del 2-piridincarboxaldehído **8c** (1.00 g, 9.3 mmol), acetona cianohidrina **9b** (0.79 g, 9.3 mmol), trietilamina (0.046 g, 0.46

mmol), piridina (1.47 g, 22.0 mmol) y cloruro de acetilo (0.89 g, 11.3 mmol). Después de cromatografía en columna se obtuvo 0.34 g (1.93 mmol) de un sólido amarillo ocre. Rendimiento del 21%.  $R_f = 0.4$  (1:1 hexano/acetato de etilo); p.f = 40°C; IR (disco de KBr  $\text{cm}^{-1}$ ): 3486  $\nu_{(\text{OH})}$ , 2946  $\nu_{(\text{CH}_3)}$ , 1758  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$ , 1218  $\nu_{(\text{C}=\text{O})}$ ; RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{(\text{ppm})}$ : 8.69 (1H, dd,  $J = 4.8, 0.7$  Hz,  $\text{H}_{\text{Py-6}}$ ), 7.82 (1H, td,  $J = 1.7, 7.5, 7.5$  Hz,  $\text{H}_{\text{Py-3}}$ ), 7.55 (1H, d,  $J = 7.9$  Hz,  $\text{H}_{\text{Py-4}}$ ), 7.38 (1H, ddd,  $J = 7.6, 4.8, 0.8$ ,  $\text{H}_{\text{Py-5}}$ ), 6.48 (1H, s, H-7), 2.22 (3H, s, H-10).  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta_{(\text{ppm})}$ : 168.90 (9C-CO), 150.93 (2C-CAr), 150.30 (6C, +), 137.78 (3C, +), 124.96 (4C, +), 122.15 (5C, +), 115.60 (C8-CN), 63.98 (7C, +), 20.54 (10C, +); CG:  $t_R = 15.68$  min, EM (IE), m/z (%): 176 ( $\text{M}^+$ , 3), 161 (3), 134 (100), 117 (17), 106 (13), 79 (63), 43 (39). Fórmula molecular:  $\text{C}_9\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2$  (P.M.: 176.17 g/mol).

### 3.1.2. Síntesis enzimática de cianohidrinás

#### 3.1.2.1. Preparación y cálculo de la actividad enzimática del crudo de la enzima hidroxinitril liasa (HNL) proveniente de las almendras

Almendras con piel (60 g) se picaron en tamaño de 5 mm aproximadamente, luego se sumergieron en acetato de etilo toda la noche, se decantaron y se sumergieron de nuevo en acetato de etilo; este procedimiento se repitió 4 veces hasta obtener el 30% en peso de aceite de almendra. Luego las almendras se secaron al aire libre y luego se molieron evitando que la temperatura superara los 40 °C. El crudo se lavó de nuevo con acetato de etilo hasta obtener un 20% en peso más de aceite de almendra. Se secó y se obtuvieron 29.83 g del crudo enzimático. Se protegió de la luz y se guardó a una temperatura de 4 °C.<sup>32</sup>

#### Actividad enzimática

La actividad enzimática se determina de dos formas: la primera la actividad enzimática volumétrica, que evalúa la actividad de la enzima de acuerdo al volumen usado para el ensayo, y la segunda, la actividad enzimática específica que consta de la actividad volumétrica dividida en la cantidad de proteína en el crudo, para lo cual es necesario determinar la cantidad de proteína por el método de Bradford.

La unidad de actividad (U) para la hidroxinitril liasa (HNL) se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de benzaldehído a partir de mandelonitrilo bajo las condiciones evaluadas.

---

<sup>32</sup> NIEUWENDIJK, A.; WARMERDAM, E.; BRUSSEE, J.; GEN, A. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, 6, 801-806.

⇒ Sobrenadante del crudo HNL

Se prepararon 500 mL de buffer de citrato 50 mM a pH 5, con 4.66 g (15.84 mmol) de citrato de sodio y 1.93 g (9.2 mmol) de ácido cítrico, se aforó con agua tipo I.

En un balón fondo redondo equipado con un agitador magnético se agregaron 100 mg del crudo enzimático previamente preparado en 10 mL de buffer de citrato. El reactor se puso en baño de hielo y la solución se agitó vigorosamente durante 4 h, manteniendo una temperatura aproximada a 8 °C. Se centrifugó a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se guardó protegido de la luz a temperatura de 4 °C.

⇒ Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La curva de calibración se realizó con una solución stock de 1mg/mL de la proteína estándar seroalbúmina bovina (BSA), la cual se diluye en un rango de 0.1 y 1mg/mL, a cada una de las diluciones se les agrega 5 mL del reactivo de Bradford y se agita suavemente evitando la formación de espuma. Se midió la absorbancia a 595 nm, obteniéndose la siguiente ecuación de la curva:

$$C = 0.998 * Abs + 0.002$$

Ensayo realizado:

A tres tubos de ensayo con 50 µL de buffer de citrato se les agregan 2.5 µL del reactivo de Bradford y se midió la absorbancia (**Tabla 3**). A otros tres tubos con 50 µL del sobrenadante enzimático previamente preparado se les agrega 2.5 µL del reactivo de Bradford, se agita evitando la formación de espuma, y finalmente se mide la absorbancia (**Tabla 4**).

**Tabla 3:** Ensayo de Bradford del blanco.

BLANCO	
50 µl Buffer	Absorbancia
1	0.032
2	0.025
3	0.028

**Tabla 4:** Ensayo de Bradford del crudo de HNL.

ENSAYO	
50 µl Buffer y HNL	Absorbancia
1	0.384
2	0.448
3	0.295
Promedio	0.375

⇒ Actividad enzimática

La actividad catalítica del crudo de HNL se cuantificó a través de la determinación del método de velocidades iniciales de reacción. El ensayo se llevó a cabo midiendo el

aumento en el valor de la absorbancia a 280 nm, producido por la formación del benzaldehído a partir del mandelonitrilo (coeficiente de extinción molar 1.3761 mL/μmol\*cm) en una solución 120 mM disuelto en buffer de citrato 50 mM a pH 5 y a 25°C.<sup>33</sup>

Para iniciar la reacción, a 100 μL de la suspensión del crudo HNL, se añadieron 2.5 mL del sustrato disuelto en el buffer, se monitoreó el aumento de absorbancia durante 70 s.

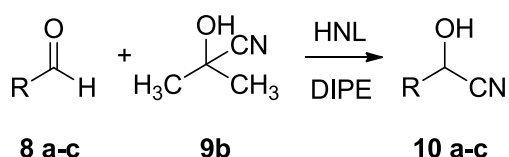
## ELECTROFORESIS

Con el fin de determinar la presencia de la hidroxinitril liasa a partir de su masa molecular,<sup>34</sup> el crudo enzimático se sometió a electroforesis, la cual se realizó a temperatura ambiente y 150 mv de voltaje constante, utilizando como electrolito Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, SDS 2% (v/v), β-mercaptoetanol 5% (v/v) y azul de bromofenol al 0.005% (p/v).

El sobrenadante del crudo fue mezclado en proporción 3:1 con el buffer de ruptura (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8 - SDS 2 % (v/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v), glicerol 10 % (v/v) y azul de bromofenol a 0.005% (p/v)). La mezcla se sometió a una temperatura de 100 °C durante 10 min y luego se refrigeró.

El revelado de las proteínas se realizó con la tinción de azul brillante de Coomassie R-250 (0.25% pv) disuelto en metanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v). Para la determinación de las masas moleculares de las proteínas se utilizaron marcadores de un amplio rango de peso molecular que contenía una mezcla de 14 proteínas recombinantes altamente purificadas y diseñadas para el tamaño preciso de las proteínas analizadas por SDS-PAGE.

### 3.1.2.2. Síntesis quiral de cianohidrinas 10a-c usando el crudo de la enzima HNL.



**Esquema 12.** Síntesis enzimática de cianohidrinas 10a-c.

Se preparó un buffer de acetato 0.1M a pH 5 con 0.11 g (1.83 mmol) de ácido acético glacial y 0.43 g (3.2 mmol) de acetato de sodio trihidratado, se aforó a 50 mL con agua tipo

<sup>33</sup> KRAMMER, B.; RUMBOLD, K.; TSCHEMMERNEGG, M.; PÖCHLAUER, P.; SCHWAB, H. A novel screening assay for hydroxynitrile lyases suitable for high-throughput screening. *J. Biotechn.*, **2007**, *129*, 151-161.

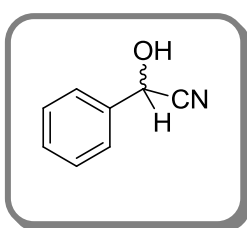
<sup>34</sup> CALVO, G. Biotransformaciones en la síntesis y resolución de compuestos de interés farmacéutico. Oviedo. Universidad de Oviedo, Biblioteca Universitaria, **2009**, p 15.

I. En un balón fondo redondo de 50 mL se agregaron 5 g del crudo de la enzima HNL junto con 10 mL del buffer de acetato. El reactor se enfrió y se agitó durante 30 min.

En otro balón fondo redondo de 50 mL se agregaron 2 g del preparado anterior junto a 6 mmol del aldehído, se mezclaron hasta homogeneidad y se agregaron 10 mL de diisopropil éter (DIPE) agitando vigorosamente a una temperatura de 0-4 °C, finalmente se agregó 0.71 mL (7.8 mmol) de acetona cianohidrina y se continuó la agitación durante 24 h.

El crudo se filtró y lavó con DIPE, el filtrado se recogió sobre sulfato de sodio, y el residuo se lavó con agua, se filtró de nuevo y el agua se extrajo con DIPE. La capa orgánica se reunió con anteriormente filtrada, se secó sobre sulfato de sodio y finalmente se eliminó el solvente mediante vacío.

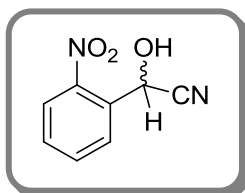
La reacción enzimática con el 2-piridincarboxaldehído no llevó a la formación del producto cianohidrínico, debido a que el heteroátomo del grupo arilo podría debilitar la interacción entre el sustrato y la enzima,<sup>35</sup> interfiriendo con la función catalítica en el sitio activo de la enzima.<sup>36</sup>



#### **2-Hidroxi-2-fenilacetonitrilo (10a)**

Se preparó usando 0.5 g de la pulpa de la enzima HNL a la que se le agregó el aldehído **8a** (0.13 g, 1.25 mmol) en 5 mL de DIPE, luego se añadió acetona cianohidrina **9b** (0.85 g, 10 mmol). Se obtuvo un crudo líquido amarillo. El crudo se analizó sin posterior purificación.

Mediante cromatografía de gases acoplado a masas; el crudo se constituyó por un 11.55 % del compuesto.  $R_f$ : 0.23 (5:1 hexanos /AcOEt). IR (KBr  $\text{cm}^{-1}$ ): 3394  $\nu_{\text{OH}}$ , 1450  $\nu_{\text{OH}}$ , 1203  $\nu_{\text{OH}}$ . GC-MS:  $t_R$  = 13.9 min. MS (EI)  $m/z$  (%) 133 ( $M^{+*}$  68), 115 (39), 105 (91), 77 (100), 51 (52). Fórmula molecular:  $\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}$  (P.M.: 133.15 g/mol).



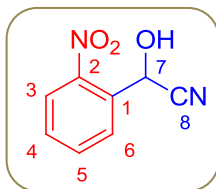
#### **2-Hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (10b)**

Se preparó usando 2 g del preparado enzima-buffer en 10 mL de DIPE. Se agregaron 0.9 g (6 mmol) del aldehído **8b** y 0.66 g (7.7 mmol) de acetona cianohidrina **9b**. Se obtuvieron 1.02 g del crudo, de los cuales se usaron 0.5 g para purificar por cromatografía en columna con una mezcla de polaridad 5:1 Hxn/AcOEt, obteniendo 0.17 g de un sólido verde-amarillo correspondiente a la cianohidrina **10c**. Mediante cromatografía de gases el crudo se constituye por 98.52% del

<sup>35</sup> XU, Q.; XIE, Y.; GENG, X.; CHEN, P. Enzymatic kinetic resolution of racemic cyanohydrins via enantioselective acylation. *Tetrahedron*, **2010**, 66, 624-630.

<sup>36</sup> OGNANOV, V.; DATCHEVA, V.; KYLER, K. Preparation of chiral cyanohydrins by an Oxynitrilase-mediated transcyanation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, 113, 6992-6996

compuesto.  $R_f$ : 0.33 (3:1 Hexanos/AcOEt). P.f.: 93 °C. IR (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3486  $\nu_{\text{(OH)}}$ , 2252  $\nu_{\text{(C}\equiv\text{N)}}$ , 1527  $\nu_{\text{(NO}_2 \text{ as)}}$ , 1342  $\nu_{\text{(NO}_2 \text{ sy)}}$ , 1172  $\nu_{\text{(C-NO)}}$ . GC-MS:  $t_R = 14.5$  min. MS (EI)  $m/z$  (%) 178 ( $M^{+*}$ , 1), 150 (1), 121 (100), 93 (57), 76 (61), 65 (80).



$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{(ppm)}}$ : 8.20 (1H, dd,  $J = 8.2, 1.2$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ph-3}}$ ), 7.65 (1H, td,  $J = 8.2, 1.4$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ph-4}}$ ), 7.80 (1H, td,  $J = 7.7, 1.3$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ph-5}}$ ), 7.98 (1H, dd,  $J = 7.8, 1.2$  Hz,  $\text{H}_{\text{Ph-6}}$ ), 6.20 (1H, s,  $\text{H-1}'$ ), 4.17 (1H, s, OH).  $^{13}\text{C}$  RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{(ppm)}}$ : 146.98 (C-2), 135.00 (C-5, +), 130.96 (C-4, +), 130.96 (C-1), 129.48 (C-6, +), 125.95 (C-3, +), 117.61 (C-8), 60.65 (C-7, +). Correlación COSY [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{H}}$ ]: 6.20/6.19 [H-7/H-7], 7.65/6.19 [H-4/H-7], 7.81/6.19 [H-5/H-7], 7.98/6.19 [H-6/H-7], 7.65/7.65 [H-4/H-4], 7.80/7.65 [H-5/H-4], 7.98/7.65 [H-6/H-4], 8.19/7.65 [H-3/H-4], 7.80/7.80 [H-5/H-5], 7.98/7.80 [H-6/H-5], 8.19/7.80 [H-3/H-5], 7.98/7.98 [H-6/H-6], 8.20/8.20 [H-3/H-3]. Correlación HSQC [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ ]: 8.20/125.92 [H-3/C-3], 7.98/129.39 [H-6/C-6], 7.80/135.01 [H-5/C-5], 7.65/130.96 [H-4/C-4], 6.20/60.43 [H-7/C-7]. Correlación HMBC [ $\delta_{\text{H}}/\delta_{\text{C}}$ ]: 6.20/117.51/129.43/130.77/146.79 [H-7/C-8/C-6/C-1/C-2], 7.98/60.5/130.77/146.79 [H-6/C-7/C-4/C-2], 7.80/125.79/130.77 [H-5/C-1/C-3], 8.20/130.77/134.95 [H-3/C-1/C-5], 7.65/129.43/146.79 [H-4/C-6/C-2]. Fórmula Molecular:  $\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3$  (P.M.: 178.14 g/mol).

Determinación de la configuración absoluta de la cianohidrina **10b** se realizó según el protocolo descrito<sup>26</sup>: El análisis se realizó evaluando el espectro de  $^1\text{H}$  RMN de la mezcla entre el ácido mandélico (4.26 mg, 28  $\mu\text{mol}$ ), DMAP (3.42 mg, 28  $\mu\text{mol}$ ) y la cianohidrina **10b** (5 mg, 28  $\mu\text{mol}$ ) en dos tubos de RMN diferentes para cada enantiómero del ácido. En los dos espectros se observan dos singletes en proporciones 1:1 correspondientes al H del carbono quiral. Para hallar el exceso enantiomérico, se hace la diferencia entre los desplazamientos químicos de cada par de singletes; cada valor es señalado por  $\Delta\delta^{\text{S}}$  para el tubo con el (S)-ácido mandélico y  $\Delta\delta^{\text{R}}$  para el (R)-ácido mandélico, y por la diferencia entre los dos deltas, se obtiene el valor de exceso enantiomérico, el cual viene señalando la conformación mediante el signo que acompañe al valor. Para el experimento con el (S)-ácido mandélico, cada uno de los singletes se encuentran en  $\delta = 6.15$  y 6.05, la diferencia es:  $\Delta\delta^{\text{S}} = 0.1$ , usando el (R)-ácido mandélico los desplazamientos son  $\delta = 6.14$  y 6.05 y la diferencia es:  $\Delta\delta^{\text{R}} = 0.09$ .

De los cuales se determina la diferencia  $\Delta\delta^{\text{RS}} = \Delta\delta^{\text{S}} - \Delta\delta^{\text{R}}$ , = -0.01.

## 4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

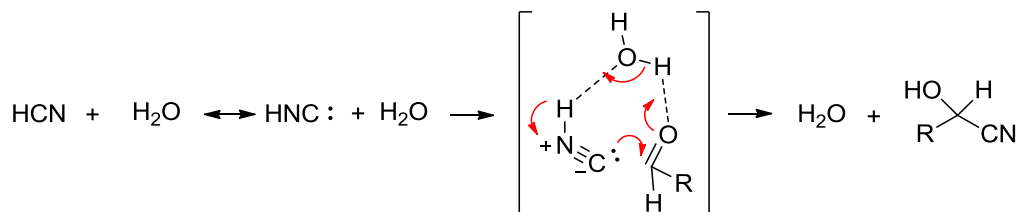
La síntesis de los cianoarilmetil acetatos consiste en la protección del núcleo de las cianohidrinas, con el fin de hacerlas más estables y obtener mejores rendimientos para posteriores modificaciones.

El trabajo en el laboratorio evaluó los métodos convencionales<sup>27</sup> de síntesis de cianohidrinas junto a los métodos enzimáticos que proporcionan la cianohidrina de interés enantioméricamente selectiva.

### 4.1. Preparación de los $\alpha$ -hidroxinitrilos racémicos 10a-c, mediante catálisis ácida

La evaluación de los métodos en la síntesis de la cianohidrinas (**10a-c**) se realizó usando tres medios de reacción diferentes: ácido sulfúrico, clorhídrico y la sal ácida metabisulfito de sodio, y como dador del ión cianuro, el cianuro de potasio. El mecanismo de reacción en medio ácido, puede ser explicado de dos formas con estados de transición cíclicos, el primero de 7 miembros y el segundo de 6 miembros, los cuales dependen de la forma del ión cianuro en la solución.<sup>37</sup>

El estado de transición de 7 miembros requiere que el HCN generado en la solución, se isomericice a HNC, llevando el par de electrones sobre el carbono (**Esquema 13**). El oxígeno del carbonilo es protonado por el medio ácido, haciendo el carbonilo propenso al ataque nucleofílico. El cianuro se hace más reactivo contrarrestando la baja nucleofilicidad del enlace H-C comparada con el par de electrones libres, generando el ataque y la posterior adición de este al aldehído.

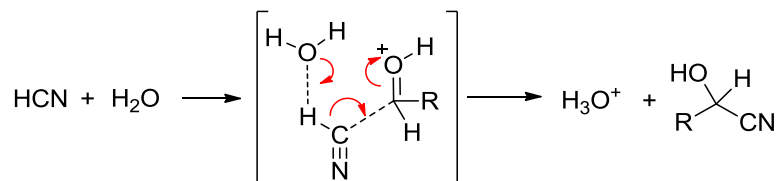


**Esquema 13.** Estado de transición cíclico de 7 miembros en la adición del ion cianuro al carbonilo del aldehído.

En el estado de transición cíclico de 6 miembros, el oxígeno del carbonilo se protona por el medio ácido, haciendo electrodeficiente al carbono para el ataque nucleofílico por parte del carbono del HCN. El ácido cianhídrico se comporta como ácido débil frente a la molécula de agua, la cual actuando como una base extrae el protón del ácido, formando la base

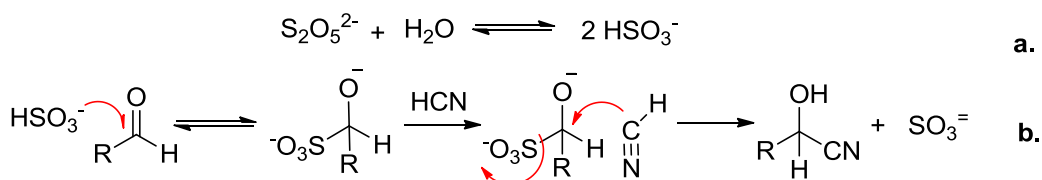
<sup>37</sup> RZEPA, H. Chemistry with a twist. WordPress. <http://www.ch.imperial.ac.uk/rzepa/blog/?p=3576>  
<23/01/2013>

conjugada del ácido cianhídrico (CN<sup>-</sup>), haciendo efectivo el ataque nucleofílico al carbonilo electrodeficiente (**Esquema 14**).



**Esquema 14.** Estado de transición cíclico de 6 miembros en la adición del ión cianuro al carbonilo del aldehído.

Para el caso de la sal ácida de metabisulfito de sodio, el mecanismo de adición del cianuro es diferente, ya que el metabisulfito de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) en agua se convierte en bisulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (**Esquema 15a**), el cual en presencia del aldehído se adiciona al carbono carbonílico,<sup>38</sup> haciéndolo deficiente electrónicamente y a la vez vulnerable al ataque del cianuro. El cianuro, por su parte, cumple con el ataque sustituyendo el sulfito, mientras que el medio ácido protona el oxígeno para finalmente generar la cianohidrina (**Esquema 15b**).



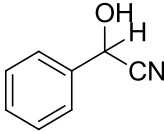

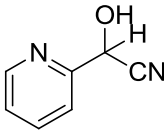
**Esquema 15.** (a) Disociación del metabisulfito de sodio. (b) Mecanismo de adición de cianuro mediada por la sal ácida metabisulfito de sodio.

Los rendimientos respecto a cianohidrinas **10a**, **10b** de acuerdo con los métodos evaluados, se observan en la **Tabla 5**.

El mandelonitrilo **10a**, siendo el sustrato natural de la enzima HNL en la cianogénesis, es para nuestro estudio el compuesto base de cada una de las reacciones, determinando la viabilidad de cada método en la síntesis convencional de las cianohidrinas. De acuerdo con los resultados, se observa que el rendimiento del mandelonitrilo por el método **B** es mayor con respecto al método **A**, proveyendo también una vía más segura en la generación de cianohidrinas ya que el HCN se genera a medida que el sulfito se une al aldehído y se gasta inmediatamente, haciendo la reacción menos riesgosa.

<sup>38</sup> MORRISON, R. T. y BOYD, R. N. Química Orgánica, 6ª Ed, México, Pearson Educación, 2002, p. 637-638.

**Tabla 5:** Rendimiento en la síntesis de cianohidrinas mediante los métodos A, B, C.

Cianohidrina final	Rendimiento		
	A KCN/H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 40%	B KCN/Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	C KCN/HCl 5N
 <b>10a</b>	71%	84%	N.E*
 <b>10b</b>	25%	41%	N.E*
 <b>10c</b>	N.R**	N.R**	N.R**

\*N.E Procedimiento no evaluado para la síntesis de estas cianohidrinas.

\*\* N.R No hubo reacción.

El aldehído **8b** se usó para comparar la síntesis con respecto a la síntesis con el aldehído **8c**, ya que los dos anillos se encuentran desactivados y podrían presentar reactividad similar en el propósito de la síntesis enzimática enantioselectiva. Sin embargo, la cianohidrina **10b** se obtuvo sin preocuparse por reacciones colaterales, como la condensación benzoínica, pues el medio ácido dirigió la síntesis hacia la cianohidrina, que a diferencia de la nitrilación del aldehído **8c**, siempre compitió con la condensación, ya que la basicidad del anillo piridínico es tan elevada que al entrar el cianuro en la estructura, le era más fácil formar su condensado que la cianohidrina (**Esquema 16**). Esta reacción se realiza vía adición nucleofílica del cianuro al aldehído **8c**, donde es formada la cianohidrina **10c**, sin embargo, el medio es suficientemente básico para que el H alfa se elimine de la cianohidrina (**II**) que luego por el ataque nucleofílico de otra molécula de aldehído se adiciona formando la estructura **III**.<sup>10</sup> Finalmente por la transferencia de un protón a la molécula, la eliminación del cianuro por rearrreglo de cargas y la acción del oxígeno en la oxidación de la estructura **V**, se obtiene la  $\alpha$ -piridoína **10d** (**Esquema 16**).



**Esquema 16.** Mecanismo de dimerización del 2-piridincarboxaldehído y obtención de la  $\alpha$ -piridoína.

El bajo rendimiento del producto **10b** se debe al equilibrio intrínseco entre la cianohidrina y el aldehído, pues en control por cromatografía en capa fina independientemente del tiempo de reacción, siempre se observaron las dos manchas correspondientes al aldehído y a la cianohidrina.

Las cianohidrinas **10a** y **10b** se analizaron mediante espectroscopia IR, identificando las bandas de absorción para OH y CN, y por CG-EM determinando el tiempo de retención y el ión molecular (Tabla 6).

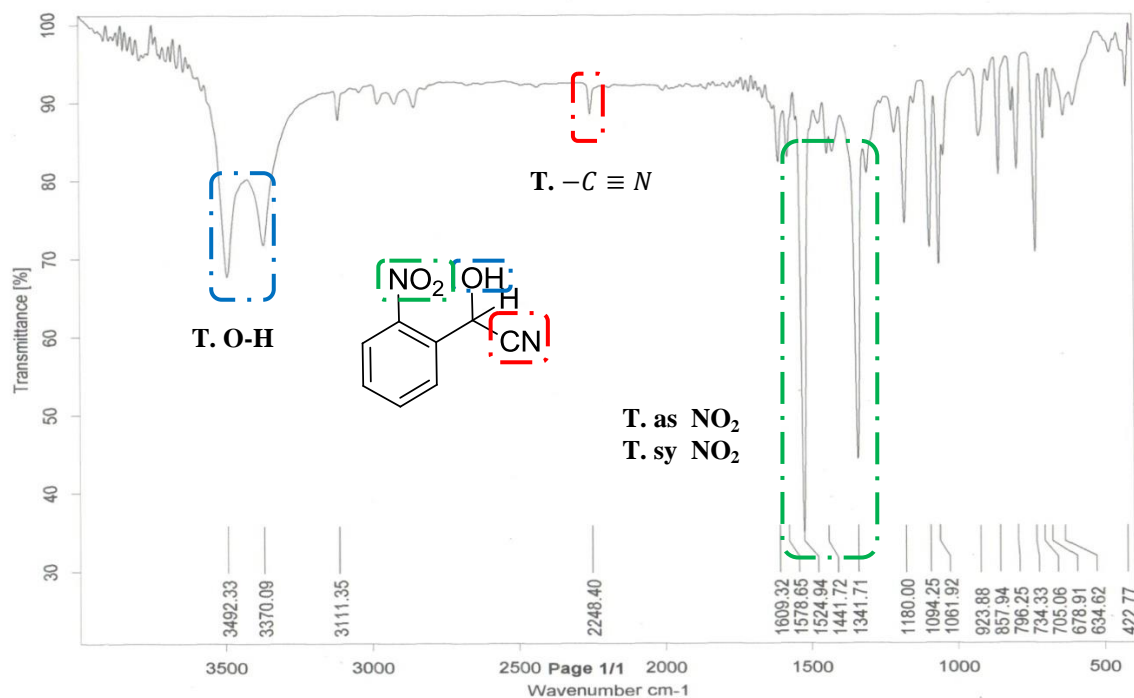
**Tabla 6:** Propiedades físicas y espectroscópicas de las cianohidrinas **10a-10b**.

Comp.	PM [g/mol]	Estado físico	P.f [°C]	$R_f^a$	$t_R$ (min)	EM [M <sup>+</sup> ] (m/z)	IR (KBr) $\gamma$ , $\text{cm}^{-1}$	
							OH	CN
<b>10a</b>	133.1	Líquido	---	0.40	7.57	133.1	3425	2252
<b>10b</b>	178.1	Sólido blancuzco	95	0.33	14.69	178.1	3492	2248

<sup>a</sup> Polaridad de 3:1 hexanos/AcOEt.

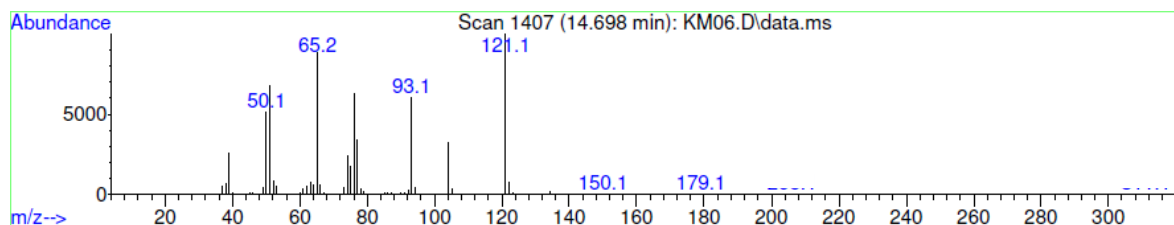
El análisis por IR indicó la presencia de grupos funcionales, mediante las bandas de absorción observadas para cada grupo. La banda de tensión del enlace OH, se encuentra alrededor de  $3650 - 3200 \text{ cm}^{-1}$  adjudicando  $3492$  y  $3370 \text{ cm}^{-1}$  a la vibración de tensión del OH de la molécula **10b**. La banda de tensión de  $-\text{C} \equiv \text{N}$  se encuentra alrededor de  $2260 - 2215 \text{ cm}^{-1}$ , señalando la banda en  $2248 \text{ cm}^{-1}$ . En el caso del compuesto **10b**, las bandas de

tensión simétrica ( $T_{sy}$ ) y asimétrica ( $T_{as}$ ) del grupo  $\text{NO}_2$  se presentaron en  $1341\text{ cm}^{-1}$  y  $1524\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. (Figura 1).



**Figura 1:** Espectro de IR del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo **10b**.

El espectro de masas (Figura 2) presenta el patrón de fragmentación (Esquema 17) que inicia con el ion molecular  $m/z$  178.1. La ausencia del ion molecular indica que posee un tiempo de vida corto, ya sea por descomposición térmica o que el ion molecular estable no existe, impidiendo que este llegue al analizador y que solo sus fragmentos más estables alcancen a ser detectados por el equipo.<sup>39</sup>

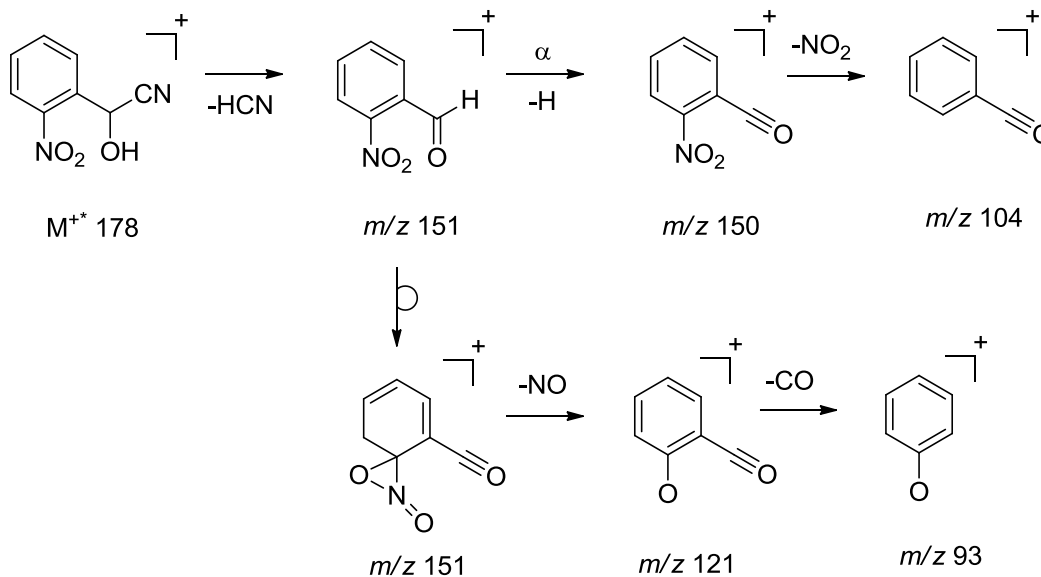


**Figura 2:** Fragmentograma del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (**10b**).

El Esquema 17 ilustra la ruta de fragmentación propuesta para el 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil)-acetonitrilo **10b**, iniciando con la eliminación de  $\text{HCN}$  formando el ión  $m/z$  151. Este ión puede reordenar el grupo nitro para eliminar un fragmento de  $\text{NO}$  dando paso al ión pico base  $m/z$  121, que por expulsión de una molécula de monóxido de carbono forma el ión  $m/z$

<sup>39</sup> GROSS, J. Mass Spectrometry: a Textbook. Heidelberg, Springer, 2da Ed., 2004, p. 263.

93. El ión  $m/z$  151 también puede mediante una ruptura  $\alpha$  eliminar el H, para luego eliminar el grupo nitro y formar el fragmento  $m/z$  104.



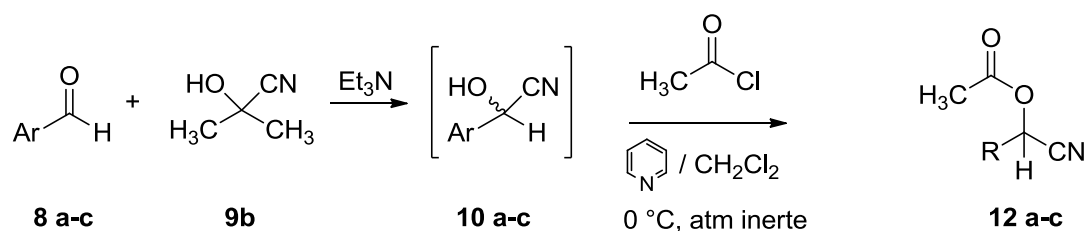
**Esquema 17.** Ruta de fragmentación propuesta para el 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil)acetoniitrilo **10b**.

#### 4.2. Preparación “one pot” de cianoarilmetil acetatos formando el intermediario cianohidrínico

Después de haber realizado los tres métodos diferentes para la obtención directa de las cianohidrinas **10** y teniendo varios problemas en su síntesis general (**Tabla 5**), nuestra atención giró hacia las tácticas sintéticas para obtener los derivados de las cianohidrinas deseadas. Así, en la siguiente etapa de esta investigación se seleccionó la táctica “one-pot” que permite realizar las sucesivas reacciones de la cianación/acetilación, donde al mismo tiempo se protege el grupo funcional lábil (OH) de las cianohidrinas formadas *in situ*.

Primera etapa de esta táctica; la reacción de cianación (reacción de Strecker) se realizó en diferentes condiciones de reacción a las usadas en los métodos **A-C** de síntesis de cianohidrinas.

Cambiando la naturaleza química de la fuente de cianuro (acetona cianohidrina en vez del cianuro de potasio) y el medio de reacción (triethylamina en vez de catalizadores ácidos) se procedió a la otra etapa, la reacción de acetilación (del grupo OH de las cianohidrinas) utilizando el cloruro de acetilo **11** y piridina (condiciones de reacción clásicas). Así, sin aislarse las cianohidrinas, se formaron los productos finales, derivados acetilados de las cianohidrinas, aunque con rendimientos bajos (**Esquema 18**).

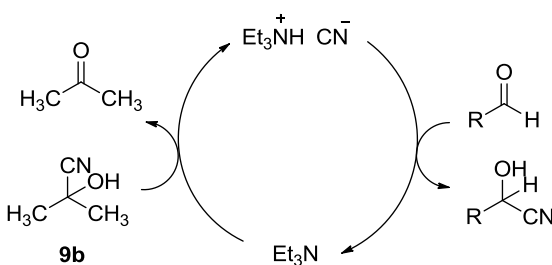


Ar: **a**= Ph; **b**= 2-NO<sub>2</sub>Ph; **c**= 2-Py

**Esquema 18.** Formación de las cianohidrias y acetilación, reacción one-pot.

Teniendo en cuenta que en cada etapa de esta táctica se realizan las sucesivas reacciones, es de suponer que cada una tiene su propio mecanismo. Estos mecanismos se discuten a continuación basándose en los trabajos publicados sobre éstos.

La primera reacción se llevó a cabo usando cantidades equimolares de acetona cianohidrina **9b** y de los respectivos benzaldehídos. La formación de la cianohidrina se dio cuando se agregó la trietilamina (5% con respecto a los reactivos) en acetonitrilo. Mediante el ciclo catalítico de la trietilamina con la acetona cianohidrina, el cianuro se libera de acuerdo a la cantidad presente de ésta, evitando el exceso de cianuro en el medio, y favoreciendo la nitrilación (**Esquema 19**), que en el caso del 2-piridincarboxaldehído **8c** proporcionó la cianohidrina, pudiendo ésta acetilarse antes de aislarla del medio.



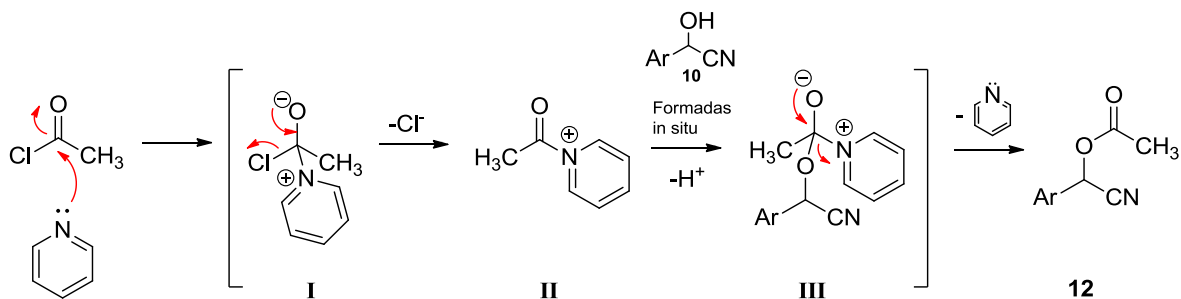
**Esquema 19:** Ciclo catalítico propuesto para el proceso de catálisis en la formación de cianohidrias.<sup>31</sup>

Teniendo en cuenta que la reacción de formación de cianohidrias mantiene un equilibrio, y que este depende de la estabilidad de la cianohidrina, la cual es baja en medios acuosos,<sup>40</sup> el solvente usado en este procedimiento proporcionó la estabilidad suficiente para mantener las cianohidrias **10**. La segunda reacción de acetilación, además de hacerse para proteger el hidroxilo, se realizó en el mismo reactor con el fin de aprovechar el equilibrio entre

<sup>40</sup> HAN, S., LIN, G., LI, Z. Synthesis of (R)-cyanohydrins by crude (R)-oxynitrilase-catalyzed reactions in micro-aqueous medium. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, 9, 1835-1838.

aldehído-cianohidrina, desplazándolo hacia los productos, y por lo tanto mejorando rendimientos.

Una vez en capa fina se observó la formación de 3 manchas, se procedió a la acetilación, la cual se realizó en atmósfera de argón, usando la piridina como catalizador de la acetilación y el cloruro de acetilo como el agente acilante. En el **Esquema 20** se da el mecanismo de reacción general propuesto para la acetilación.



**Esquema 20:** Mecanismo de reacción de acetilación catalizado por la piridina.

Los intermediarios **I** y **II** se forman durante el ataque nucleofílico de la piridina al carbono carboxílico del agente acilante que la hace más sensible al subsecuente ataque de OH de las cianohidrinadas formadas *in situ* dando lugar a la formación de otro intermediario **III**, de forma tetraédrica inestable lo que provoca la eliminación de la molécula de piridina, liberándose así los derivados acetilados.<sup>10</sup> Los tres derivados fueron analizados y caracterizados por técnicas fisicoquímicas (**Tabla 7**).

**Tabla 7:** Propiedades físicas y espectroscópicas (IR) de O-acetilcianohidrinadas **12a-c**.

Comp.	Estado físico	P.f [°C]	R <sub>f</sub> <sup>a</sup>	PM [g/mol]	IR (KBr) $\gamma$ , cm <sup>-1</sup>	
					C=O	CN
<b>12a</b>	Líquido amarillo	---	0.20	175.1	1755	N.O**
<b>12b</b>	Sólido amarillo	53	0.23	220.1	1758	N.O
<b>12c</b>	Sólido beige	40	0.40 <sup>†</sup>	176.1	1758	N.O

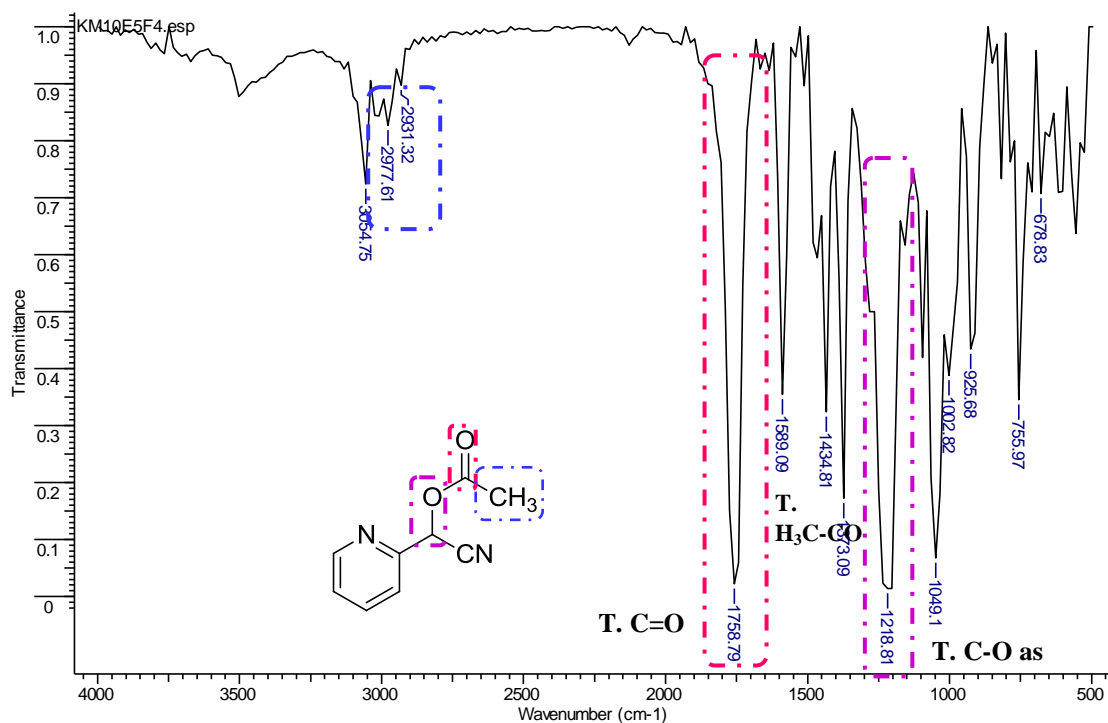
<sup>a</sup> Polaridad 3:1 hexanos/AcOEt      \*\* N.O no se observa.

<sup>†</sup> Polaridad 1:1 hexanos/AcOEt.

El análisis por IR corroboró el grupo acetilo en las cianohidrinadas. Sin embargo, la banda que corresponde al cianuro no se observó, hecho que puede deberse al impedimento estérico que genera el grupo acetilo, impidiendo su absorción.

El siguiente espectro de IR corresponde al producto final **12c**, en donde se denotan las siguientes características: la banda de tensión del C=O en 1758 cm<sup>-1</sup> y la tensión asimétrica

del C-O en  $1218\text{ cm}^{-1}$ . Además de observarse las bandas de tensión simétrica y asimétrica en  $2931\text{ cm}^{-1}$  y  $2977\text{ cm}^{-1}$  del grupo  $\text{CH}_3$  (**Figura 3**).



**Figura 3.** Espectro IR del ciano(piridin-2-il)metil acetato (**12c**).

Para corroborar la fórmula molecular y presencia del cianuro, los compuestos se analizaron por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (**Tabla 8**)

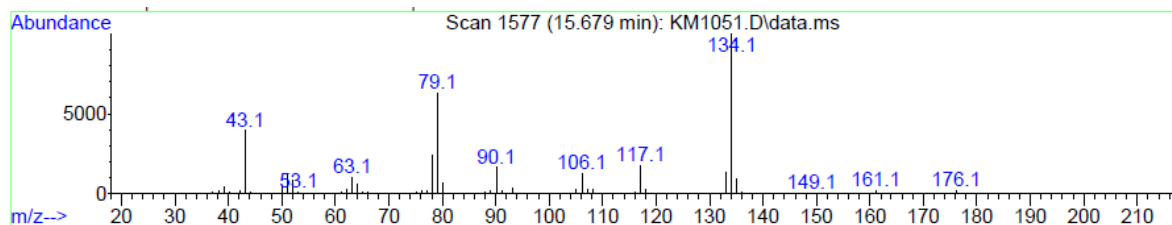
**Tabla 8:** Datos espectrométricos de los acetatos sustituidos **12**.

Comp.	EM		RMN, $\delta$ , ppm			
	$M^{+*}$ [ $m/z$ ]	Ión Pico base	$^1\text{H CH}_3$	$^1\text{H CH}$	$^{13}\text{C CN}$	$^{13}\text{C CO}$
<b>12a</b>	175.1	133.1	---	---	---	---
<b>12b</b>	220.1	43.2	2.23	7.07	115.11	168.46
<b>12c</b>	176.1	134.1	2.22	6.48	115.60	168.90

\*No presenta datos, porque este compuesto no se aisló ni purificó

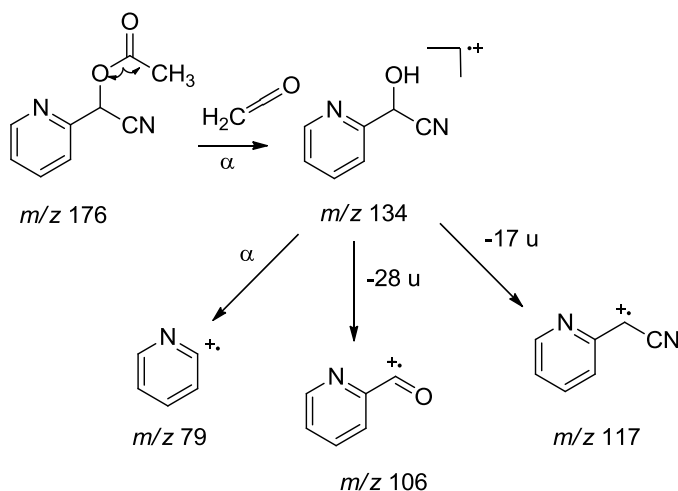
El análisis por espectrometría de masas arrojó información acerca del ion molecular, señalando el peso molecular de los compuestos finales, que junto a los iones fragmento generados a partir de las reacciones de fragmentación, forman diferentes estructuras moleculares, que concuerdan con la estructura de los compuestos deseados.

En el caso del acetato **12c**, se observa el ion masa molecular en  $m/z$  176.1, masa par, que refleja la presencia de dos átomos de nitrógeno. El ion molecular no es intenso, lo cual indica que es lábil y tiene un tiempo de vida corto, sin embargo presenta iones fragmentos representados por las señales de mayor intensidad como el ion pico base en  $m/z$  134.1 que pertenece a la pérdida de 42 u correspondientes al acetilo con la transposición de un átomo de H al oxígeno del éster (**Figura 4**).



**Figura 4.** Espectro de masas del ciano(piridin-2-il)metil acetato (**12c**).

El patrón de fragmentación es similar para los tres cianoarilmetil acetatos **12**. En el caso de ciano(2-nitrofenil)metil acetato (**12b**) (**Anexo III C**), no se alcanza a observar el ión molecular, pero sabiendo su peso molecular y restando el primer ión de la derecha del espectro (174 u) se observa una pérdida de 46 u que corresponden al grupo nitro, dejando como ion fragmento a  $m/z$  174, el cual posee la estructura básica a los otros dos acetatos, formando un patrón de fragmentación similar al presentado para el ciano(piridin-2-il)metil acetato (**12c**).



**Esquema 21:** Posible ruta de fragmentación del ciano(piridin-2-il)metil acetato (**12c**).

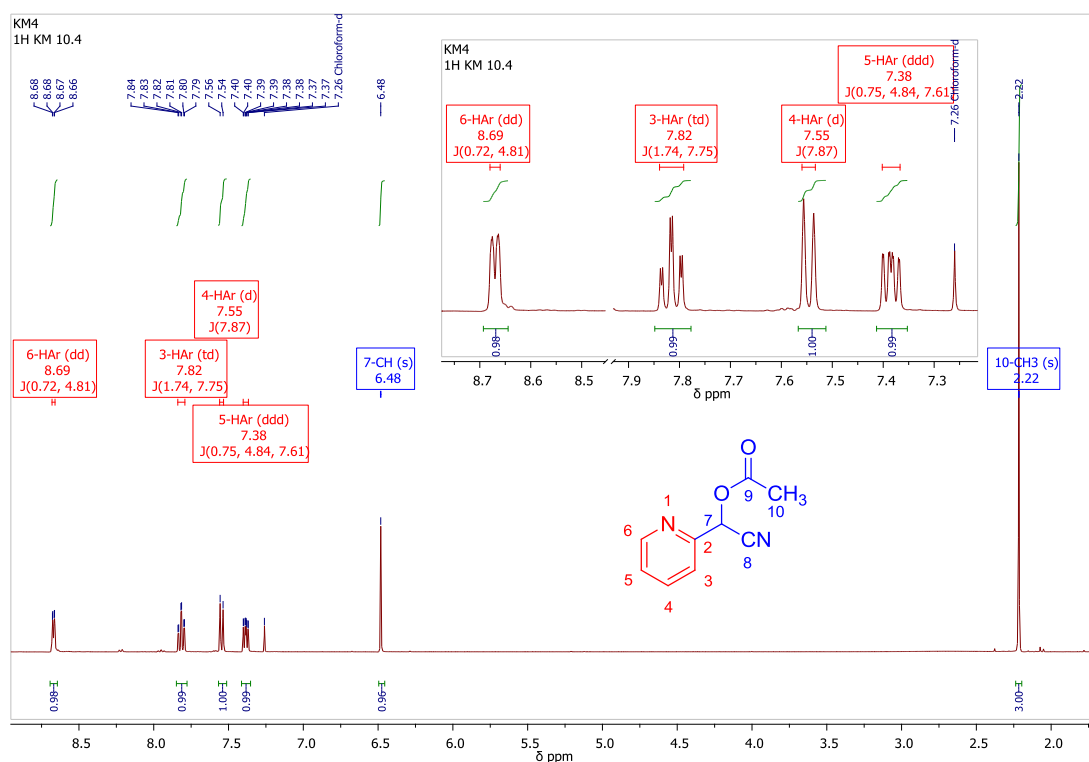
La ruta de fragmentación del ciano(piridin-2-il)metil acetato (**12c**) comienza con la ruptura del enlace  $\alpha$  del éster, y por transposición de uno de los hidrógenos del metilo, se forma el ion fragmento, que corresponde al ión pico base  $m/z$  134. El ión  $m/z$  79 se forma a partir de

una ruptura  $\alpha$  con respecto al alcohol, y los iones  $m/z$  106 y  $m/z$  117 corresponden a las pérdidas de los grupos CN y OH, respectivamente (**Esquema 21**).

En algunos espectros el ión  $m/z$  43 es de gran intensidad, el cual corresponde al ion del fragmento acetilo sin la transposición del protón.

Finalmente para confirmar la estructura de los cianoarilmetil acetatos, se realizó el análisis por espectroscopia de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y DEPT-135).

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del producto **12c** (**Figura 5**), se aprecian las señales de los diferentes grupos de protones en la molécula. Iniciando de campo alto a campo bajo, se ubican los singletes en 2.22 ppm y 6.48 ppm que corresponden a los protones del metilo ( $10\text{-CH}_3$ ) y metino (7-CH) respectivamente. En 7.38 ppm se encuentra un doblete doblete (ddd) con constantes de acoplamiento  $J = 7.6, 4.8, 0.8$  Hz, correspondiente al protón  $5\text{-H}_{\text{Ar}}$  del anillo, acoplado con el doblete doblete (dd) en 8.69 ppm del protón  $6\text{-H}_{\text{Ar}}$  con  $J = 4.8, 0.72$  Hz, también con el doblete del protón  $4\text{-H}_{\text{Ar}}$  en 7.55 ppm de  $J = 7.87$  Hz y finalmente con el triplete doblete del protón  $3\text{-H}_{\text{Ar}}$  en 7.82 ppm y  $J = 7.5, 7.5, 1.7$  Hz.

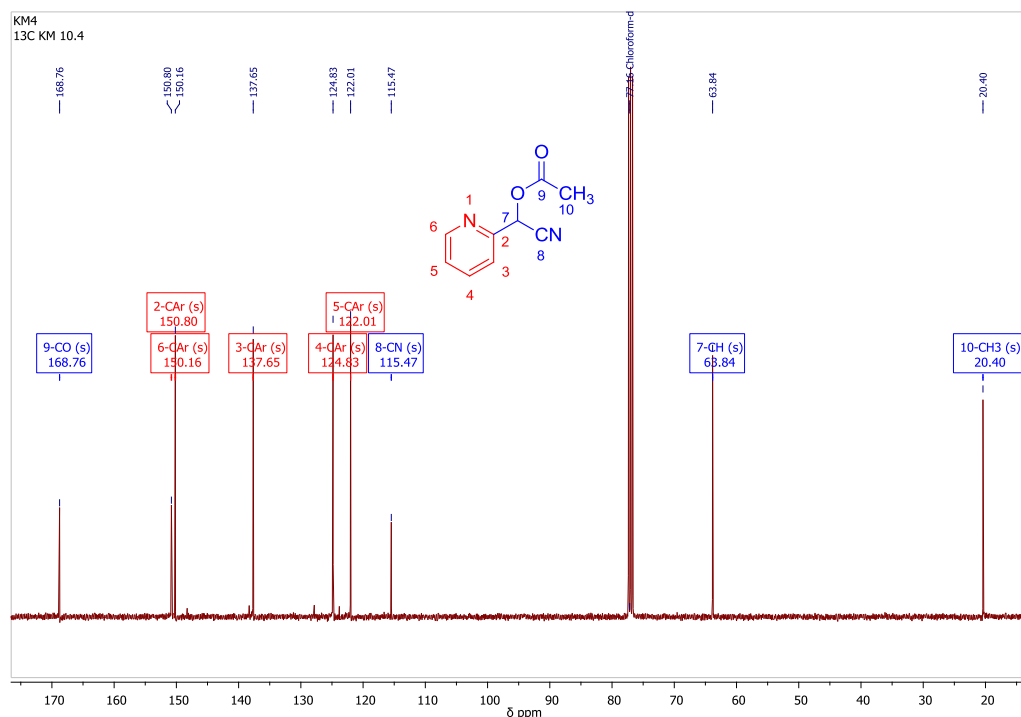


**Figura 5.** Espectro de  $^1\text{H}$  RMN del ciano(piridin-2-il)metil acetato (**12c**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).

El espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN del mismo producto **12c** (**Figura 6**) confirmó el número de carbonos presentes en la molécula, cuya ubicación indicó la naturaleza de dichos núcleos y

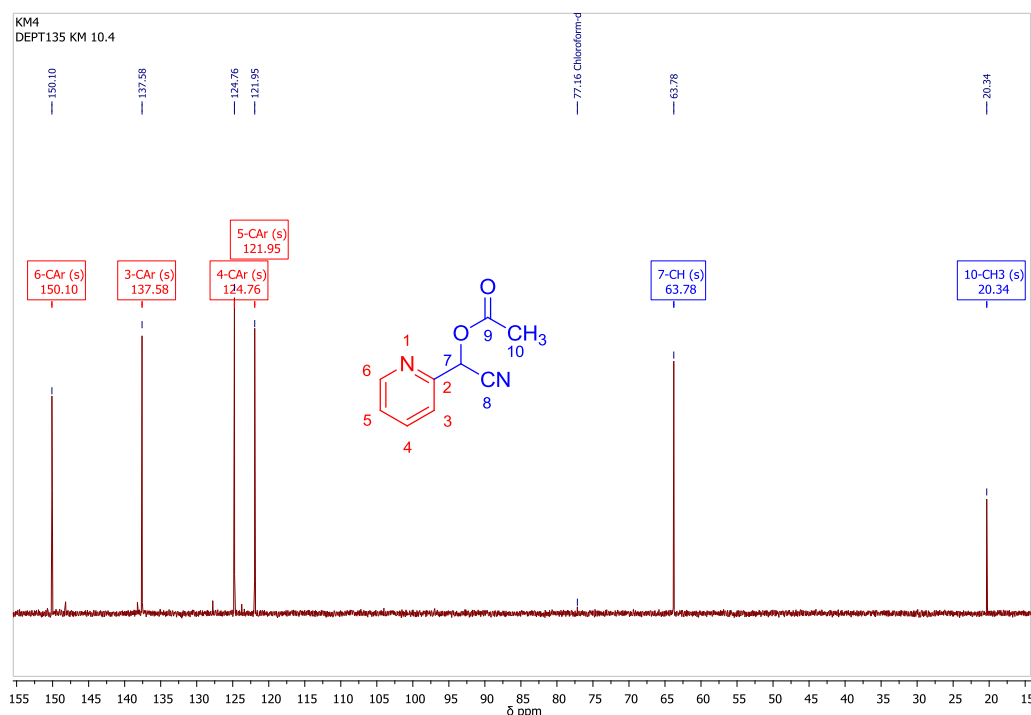
su coherencia con la estructura propuesta. En el espectro se destaca la señal en 168.76 ppm que corresponde al carbono carbonilo del éster (9-CO) y en 115.47 ppm se encuentra el carbono correspondiente al cianuro (8-CN). Las señales comprendidas entre 132.01 ppm y 150.80 ppm corresponden a los carbonos del anillo, y por último, las señales en 20.40 ppm y en 63.84 ppm indican los carbonos metilo (10-CH<sub>3</sub>) y metino (7-CH) de la molécula señalada como el ciano(piridin-2-il)metil acetato (**12c**).

Finalmente con el experimento DEPT-135, se determina el número de protones unidos directamente a un núcleo de carbono y que mediante intensidades positivas se indican a los metilos (-CH<sub>3</sub>) y metinos (-CH), y en intensidades negativas a los metilenos (CH<sub>2</sub>), sin poseer señales para los carbonos cuaternarios.<sup>41</sup> Los núcleos que corresponden a los carbonos cuaternarios como el carbonilo (9-CO), el cianuro (8-CN) y el carbono C-2 del anillo no aparecen, tal cual como lo determina el experimento, dejando con intensidades positivas a los carbonos CH del anillo, al 7-CH y al metilo 10-CH<sub>3</sub> (**Figura 7**).



**Figura 6:** Espectro de <sup>13</sup>C RMN del ciano(piridin-2-il)metil acetato (**12c**) (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz).

<sup>41</sup> SILVERTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric identification of organic compounds. New York: John Wiley & Sons, **2005**, p. 216.



**Figura 7:** Espectro DEPT-135 del compuesto ciano(piridin-2-il)metil acetato (**12c**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz).

Mediante la información arrojada por el análisis de los diferentes espectros tomados, se concluye que la estructura propuesta, se acopla a cada resultado obtenido, confirmando que se sintetizó el compuesto ciano(piridin-2-il)metil acetato (**12c**).

### 4.3. Síntesis enzimática de cianohidrinás

#### 4.3.1. Actividad enzimática del crudo de la enzima HNL proveniente de las almendras

La concentración de proteína se determina con el promedio de la absorbancia del ensayo de Bradford de cada 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante del crudo enzimático de HNL (**Tabla 4**).

La concentración de la proteína se estima mediante la ecuación de la curva de calibración de la proteína estándar seroalbúmina bovina (BSA) (**Ecuación 1**)

$$C = 0.998 * Abs + 0.002 \quad (1)$$

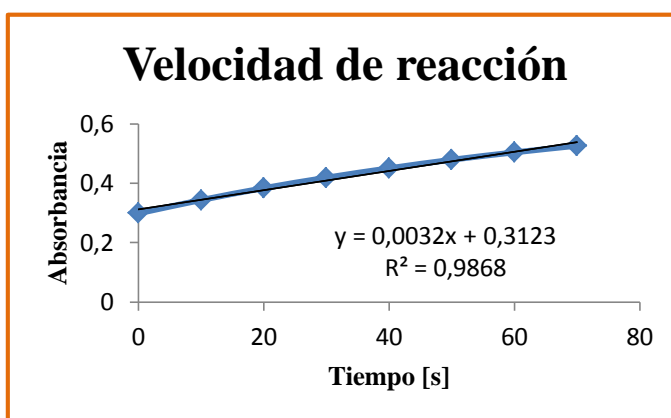
$$C = 0.38$$

La actividad específica se determinó mediante el aumento del valor de la absorbancia a 280 nm (**Tabla 9**), producido por la formación del benzaldehído a partir del mandelonitrilo

(coeficiente de extinción molar  $1.3761 \text{ mL } \mu\text{mol}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ ). Hallando la velocidad de conversión (pendiente de la curva, **Figura 8**), se determina la actividad volumétrica, reemplazándola en la **Ecuación 2**. La actividad volumétrica corresponde a la cantidad de sustrato que el crudo de HNL convierte por ml de proteína en la preparación enzimática. En el ensayo el volumen total en la celda fue de 2.62 mL (2.5 mL de buffer, 100  $\mu\text{L}$  del crudo enzimático y 20  $\mu\text{L}$  de mandelonitrilo), y el volumen del crudo enzimático en la celda fue de 100  $\mu\text{L}$ , por tanto los valores se reemplazan en la **Ecuación 2**. El valor obtenido se divide en la concentración del enzima previamente hallado por el método de Bradford, dando una actividad específica enzimática de 9.61 unidades de enzima que catalizan 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  de mandelonitrilo a benzaldehído.

**Tabla 9:** Datos del método de velocidades iniciales de reacción.

Tiempo [s]	Absorbancia
0	0.29
10	0.34
20	0.38
30	0.41
40	0.45
50	0.47
60	0.50
70	0.52



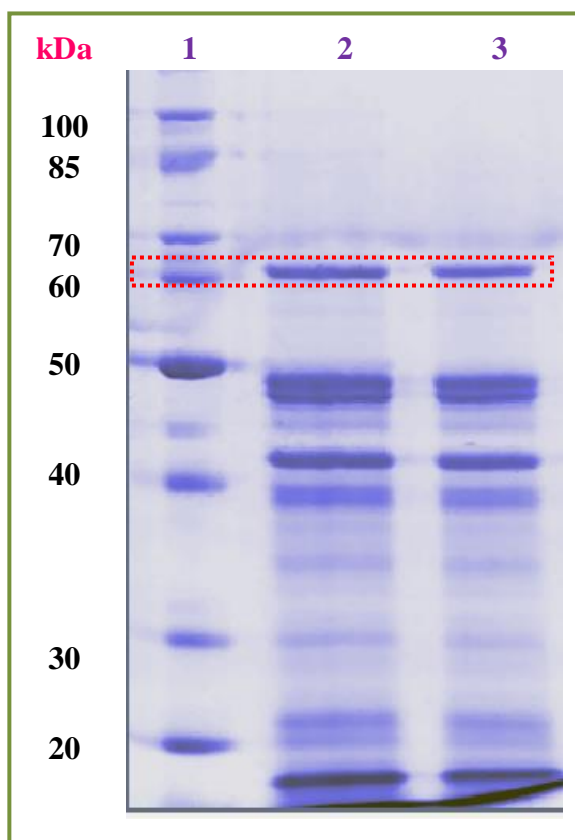
**Figura 8:** Velocidad de reacción de la desnitritación del mandelonitrilo a benzaldehído.

$$A \text{ volumétrica} \left( \frac{U}{\text{mL}} \right) = \frac{m}{\epsilon} \times \frac{V_{\text{Ensayo}}}{V_{\text{Enzima}}} = \quad (2)$$

$$Av = \frac{0.0032}{1.3761 \left[ \frac{\text{mL}}{\text{mol} * \text{cm}} \right]} * \frac{60 \text{ [s]}}{1 \text{ [min]}} * \frac{2.62 \text{ [mL]}}{0.1 \text{ [mL]}} = 3.65 \frac{U}{\text{mL}}$$

$$A \text{ específica} = \frac{A \text{ volumétrica}}{C. \text{ Proteína}} = \frac{3.65 \text{ [U/mL]}}{0.38 \text{ [mg/mL]}} = 9.61 \left[ \frac{U}{\text{mg}} \right] \quad (3)$$

En la **Figura 9** se muestra el perfil electroforético de proteínas obtenido por SDS-PAGE del crudo de HNL. En este se puede observar que la HNL si se encuentra en el crudo, indicada por la banda en 60 KDa.<sup>34</sup>



**Figura 9:** Gel de electroforesis del crudo enzimático de la hidroxinitril liasa. Carril 1 marcadores de masa molar. Carriles 2 y 3 crudo enzimático.

#### 4.3.2. Síntesis de cianohidrinan 10a-c usando el crudo de la enzima hidroxinitril liasa

En esta etapa se usó el crudo de las almendras previamente preparado, que contiene la enzima encargada de la cianogénesis. En general, esta enzima es responsable por la adición enantioselectiva del ión cianuro al compuesto carbonílico de interés.

Teniendo en cuenta que los parámetros como temperatura, pH, agua, solvente orgánico y la interfase agua/solvente orgánico,<sup>40,42</sup> son de vital importancia en el medio enzimático para llevar a cabo la catálisis y evitar la reacción no enzimática que lleve a la formación de la mezcla racémica, se diseñó un procedimiento donde estos parámetros se manejaran de tal forma que contribuyera a la reacción enzimática enantioselectiva.

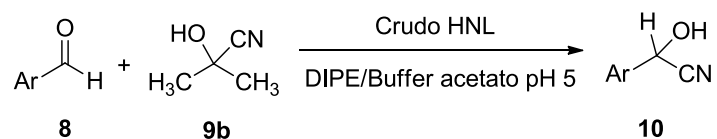
<sup>42</sup> HICKEL, A.; RADKE, C.; BLANCH, H. Hydroxynitrile Lyase at the Diisopropyl Ether/Water Interface: Evidence for Interfacial Enzyme Activity. *Biohecnol and Bioeng.*, **1999**, 65, 4, 435-436.

Comenzando con el parámetro de manipulación externa, la temperatura, se manejó en el rango de uno a cuatro grados (1 – 4 °C), rango que causa incremento en la selectividad, manteniendo la estructura interna de la enzima activa.<sup>21</sup>

Se conoce que las enzimas poseen propiedades sensibles al pH, como la actividad, la fijación del sustrato a la enzima, la ionización del sustrato y en la variación de la estructura proteica.<sup>43</sup> En el caso de la hidroxinitril liasa, se ha notado que la pureza de los productos incrementa con una disminución del pH del buffer de reacción, pero se observa también que la velocidad de la reacción enzimática cae bruscamente a pH por debajo de cinco.<sup>36</sup> La labilidad de la cianohidrina también se encuentra implicada en el pH, de tal forma que su descomposición es significativamente rápida a pH > 4. En este orden de ideas, el pH usado en la reacción es de 5, preparado por el buffer de acetato 0.1M, al cual se le agregó el crudo de las almendras, formando una pulpa enzimática de pH 5 con el propicio ambiente acuoso.

En el caso del medio acuoso necesario para la enzima, es necesario resaltar que el agua es parte fundamental en el mecanismo de reacción donde participa la enzima HNL. Sin embargo, usar el agua como solvente puede causar la racemización del producto esperado, disminuyendo el exceso enantiomérico (*ee*) en la reacción. Por otro lado, se ha encontrado que altos rendimientos y excesos enantioméricos se alcanzan en ambientes bifásicos de agua/solvente orgánico inmiscible en agua.<sup>40</sup> Por lo tanto y teniendo en cuenta que el solvente diisopropil éter (DIPE) se ha venido usando sin presentar problemas en la actividad de la enzima y que es un excelente disolvente para los productos cianohidrinados, éste se usa en un sistema bifásico con el agua, con reportes de ser el mejor medio para llevar a cabo la síntesis (**Esquema 22**).<sup>42,44</sup>

El tiempo de reacción se determinó por cromatografía en capa fina, definido por la conversión del aldehído de partida, presentando tiempos de reacción de 24 h.



**Esquema 22.** Síntesis enantioselectiva usando el crudo de HNL.

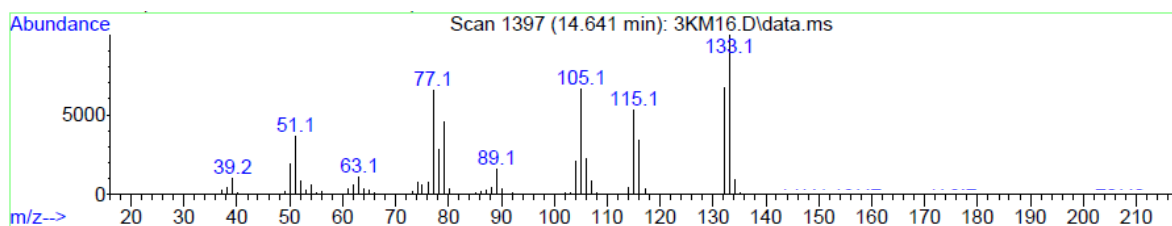
Analizando los productos provenientes de la reacción enzimática, la cianohidrina **10a** no se purificó debido a que en capa fina se observaron cuatro manchas y la purificación de esta cianohidrina llevó a la descomposición total, evitando el análisis del compuesto puro. Por

<sup>43</sup> VOET, D.; VOET, D. Bioquímica. *John Wiley & Sons, Inc.* Editorial Médica Panamericana. 3a Edición. **2004**, p. 502.

<sup>44</sup> HICKEL, A.; RADKE, C.; BLANCH, H. Role of organic solvents on Pa-Hydroxynitrile lyase interfacial activity and stability. *Biohecnol. Bioeng.*, **2001**, *74*, 1, 18-28.

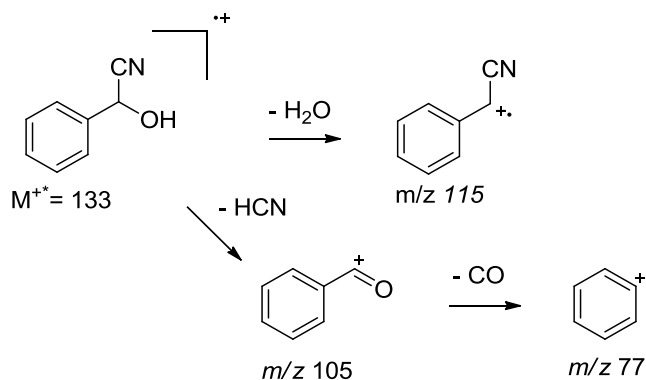
esta razón, se analizó el crudo mediante cromatografía de gases acoplado a masas, con el fin de determinar el porcentaje de formación de la cianohidrina y confirmar el peso molecular.

El análisis por CG-MS presenta que el 11.55% del crudo analizado corresponde al producto **10a**, presentando un espectro de masas con ión molecular  $m/z$  133.1 (**Figura 10**). El bajo porcentaje del mandelonitrilo **10a** se debe a que se han formado otros dos compuestos señalados por las bases de datos como el ácido benzoico,  $M^{*+}$  122.1 (86) y el  $\alpha$ -Oxobencenacetonitrilo,  $M^{*+}$  131.1 (72), junto al aldehído de partida  $M^{*+}$  106.1 (65).



**Figura 10.** Espectro de masas del 2-hidroxi-2-fenilacetoni-trilo (**10a**).

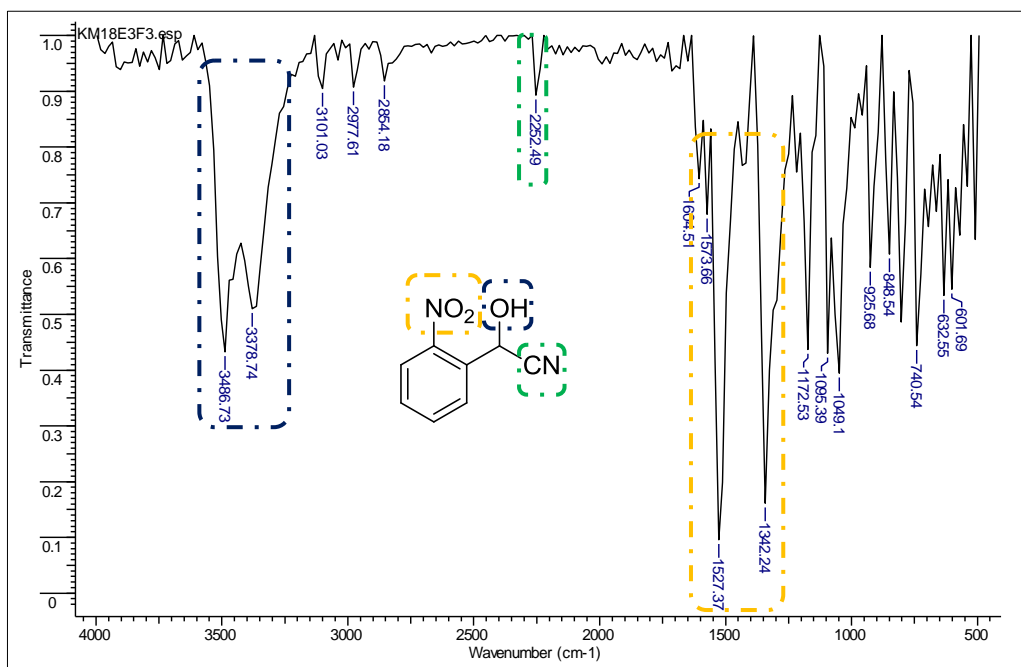
El patrón de fragmentación de **10a** inicia con la pérdida de 18u, que corresponden a la molécula de agua. El siguiente ión fragmento corresponde a la pérdida del HCN y posterior desprotonación en la formación del aldehído. El ión fragmento  $m/z$  77 es debido a la eliminación del CO a partir del ión  $m/z$  105 (**Esquema 23**).



**Esquema 23.** Posible ruta de fragmentación del 2-hidroxi-2-fenilacetoni-trilo (**10a**).

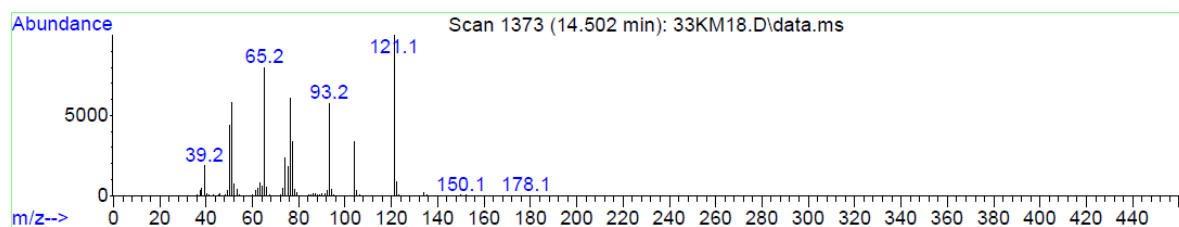
Por otro lado, la cianohidrina **10b** con fragmento nitrofenil presentó dos manchas en capa fina, correspondientes a los productos inicial y final. Esta mezcla se purificó por cromatografía en columna, usando sílica gel previamente sumergida en la mezcla de polaridad 5:1 hexanos/acetato de etilo, empacándola en una columna de vidrio de tal forma que la salida del solvente “fuera a chorro”. Se obtuvo la fracción de la cianohidrina deseada **10b** con un rendimiento del 34%.

El espectro de IR del producto **10b** indicó la presencia de las funciones principales del esqueleto del compuesto obtenido. Las bandas en  $3378\text{ cm}^{-1}$  y  $3486\text{ cm}^{-1}$  corresponden a la vibración de tensión del OH, la banda en  $2252\text{ cm}^{-1}$  señala el nitrilo y las bandas en  $1527\text{ cm}^{-1}$  y  $1342\text{ cm}^{-1}$  señala la tensión simétrica y asimétrica del grupo nitro (**Figura 11**).



**Figura 11.** Espectro de IR del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (**10b**).

El espectro de masas presenta el patrón de fragmentación indicado en la **Figura 12**. La ruta de fragmentación se presentó en la sección 5.1 (**Esquema 17**) correspondiente a la cianohidrina 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil)-acetonitrilo racémica.

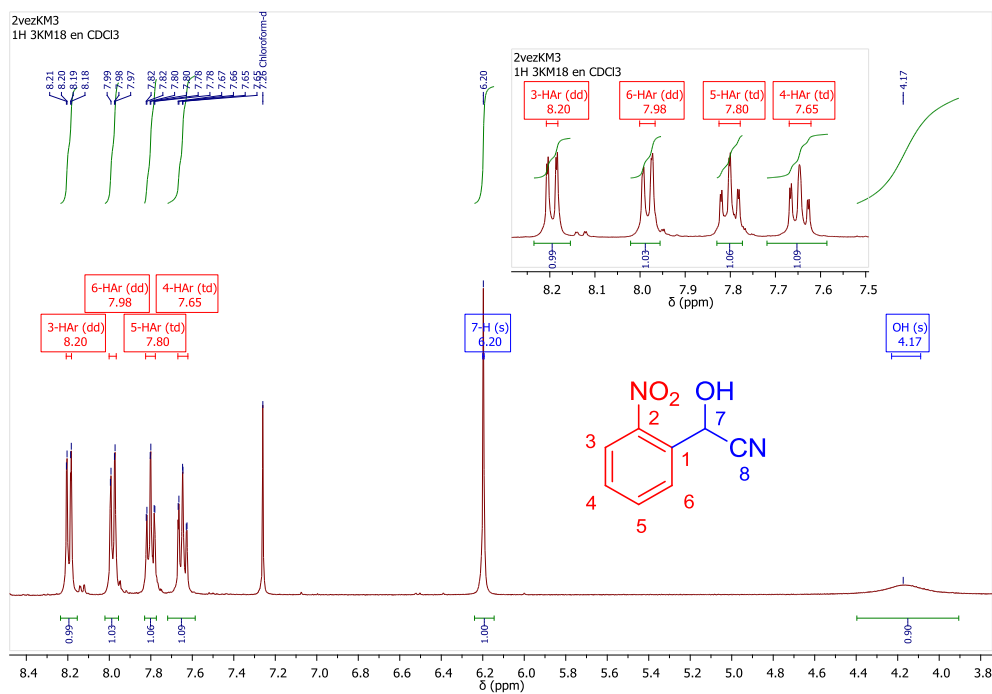


**Figura 12.** Fragmentograma del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (**10b**).

Finalmente, la estructura molecular de la cianohidrina **10b** se confirmó mediante resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN, DEPT-135), en experimentos bidimensionales de correlación homonuclear ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY) y heteronuclear (HSQC y HMBC) y mediante el experimento para determinar la configuración absoluta usando DMAP y ácido mandélico

(R) y (S), en los cuales se adjudicaron la totalidad de las señales acorde a la estructura molecular de la cianohidrina deseada.

Desde campos bajos hacia campos altos en el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de **10b** (Figura 13) se observaron las señales de doblete doblete en 8.20 ppm ( $J = 8.2, 1.2$  Hz), doblete doblete 7.98 ppm ( $J = 7.8, 1.2$  Hz), triplete doblete 7.80 ppm ( $J = 7.7, 7.7, 1.3$  Hz) y el triplete doblete 7.65 ppm ( $J = 8.2, 7.8, 1.40$  Hz) correspondientes a los protones del anillo 3- $\text{H}_{\text{Ar}}$ , 6- $\text{H}_{\text{Ar}}$ , 5- $\text{H}_{\text{Ar}}$  y 4- $\text{H}_{\text{Ar}}$  respectivamente (Figura 13). El desplazamiento del protón 7-H en 6.20 ppm, se debe a que los tres grupos funcionales electronegativos adyacentes, “jalan” los electrones (efecto inductivo) desapantallando este protón que se encuentra como singlete ya que el protón adyacente corresponde al del OH, puede generar puentes de hidrógeno y no se encuentra el tiempo suficiente sobre el oxígeno<sup>45</sup> para que acople con el protón metínico.



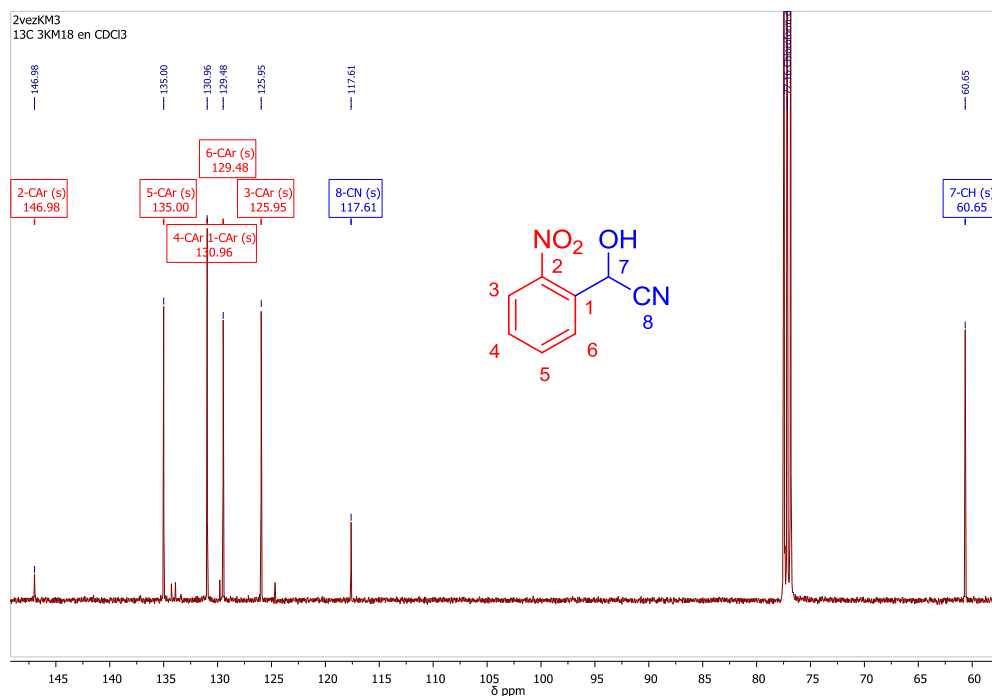
**Figura 13.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil)acetoniitrilo (**10b**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

El experimento de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 14) indicó el número de carbonos en la molécula y de acuerdo a su desplazamiento reveló la naturaleza de cada carbono. Sin embargo, para este espectro se esperaron ocho señales respectivas a cada carbono de la molécula, pero solo pudieron ser observadas siete. Siguiendo el desplazamiento y la naturaleza de la señal

<sup>45</sup> SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F.; KIEMLE, D. Spectrometric Identification of organic compounds. New York; John Wiley & Sons, **2005**, p. 150-152.

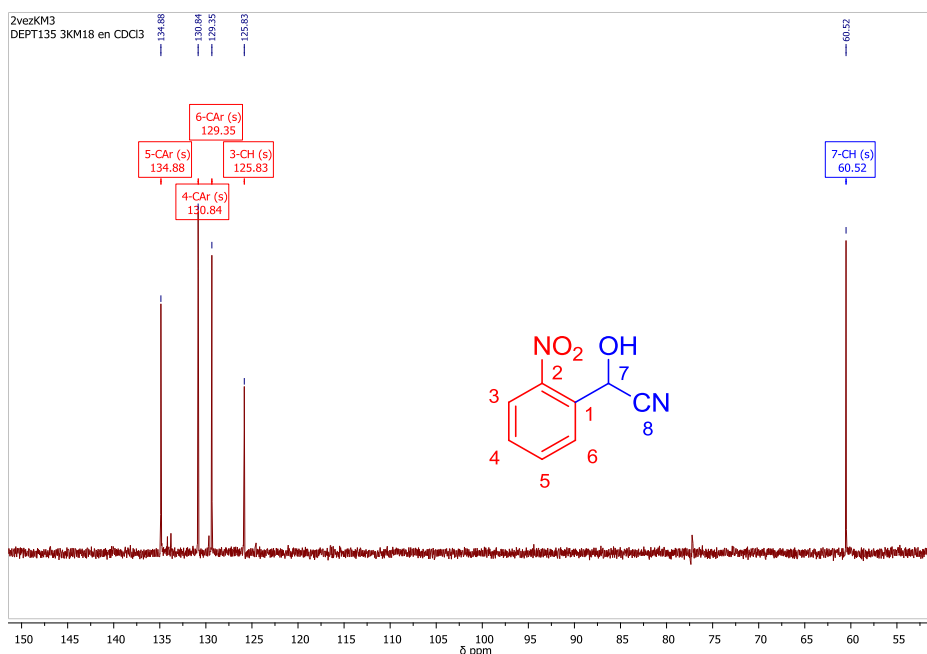
faltante, se determinó que esta señal corresponde al carbono cuaternario C-1 en la estructura propuesta.

Iniciando el análisis a campos bajos, se tiene el carbono C-2 en 146.98 ppm, siguiendo con 135.00 ppm del C-5, 129.48 ppm del C-6, 130.96 ppm del C-4, y en 125.95 ppm del C-3. El carbono del nitrilo C-8 se encuentra a 117.61 ppm, y por último, el carbono metínico en 60.65 ppm.



**Figura 14:** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetnitrilo (**10b**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

Complementando la información, el espectro DEPT-135 reveló la ausencia de los carbonos cuaternarios, C-2, C-8 respectivos a los grupos  $\text{NO}_2$  y CN. Omitiendo la señal del carbono cuaternario C-1 (**Figura 15**).

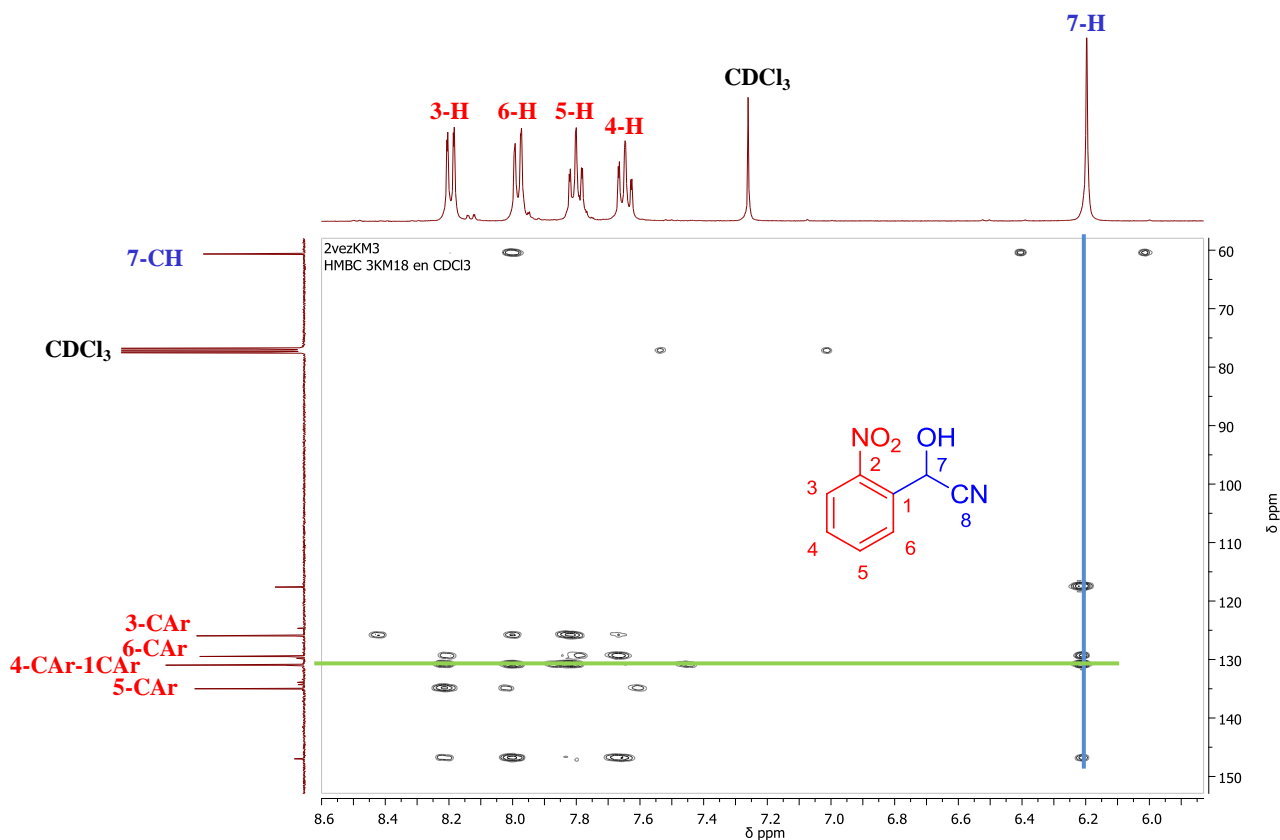


**Figura 15:** Espectro de DEPT-135 del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (**10b**) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

El experimento HMBC, que correlaciona a carbonos e hidrógenos mediante acoples entre 2 y 3 enlaces y permite elucidar de manera indirecta la presencia de carbonos y protones, por ejemplo el carbono C-1, mediante los acoples a 2 enlaces con los hidrógenos H-6, H-7 y a 3 enlaces con H-5. Para el análisis del espectro de HMBC, se tiene en cuenta las posibles rotaciones intermoleculares, además de ignorar las señales llamadas “satélites”, las cuales son un par de señales espaciadas uniformemente alrededor del pico  $^1\text{H-RMN-HMBC}$  principal.<sup>46</sup>

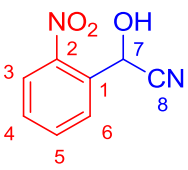
Para empezar, se buscaron los acoples relacionados al protón H-7, el cual se encuentra a 2 enlaces del carbono C-1, además de ser el hidrógeno por fuera del sistema aromático, que evita repetir y a su vez coincidir interacciones entre los hidrógenos y carbonos del anillo. Para esto se trazó una línea vertical que parte de la señal del protón H-7 y cruza todos los acoples con los carbonos; estos puntos se observan con su correspondiente asignación en la **Tabla 10**.

<sup>46</sup> SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F.; KIEMLE, D. Spectrometric Identification of Organic Compounds. New York John Wiley & Sons. **2005**, p. 257



**Figura 16.** Interacción carbono-hidrógeno a 2 y 3 enlaces del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil)acetonitrilo 10b a través del espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC

**Tabla 10.** Puntos de interacción carbono-hidrógeno a 2 y 3 enlaces del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil)acetonitrilo en el espectro  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC.

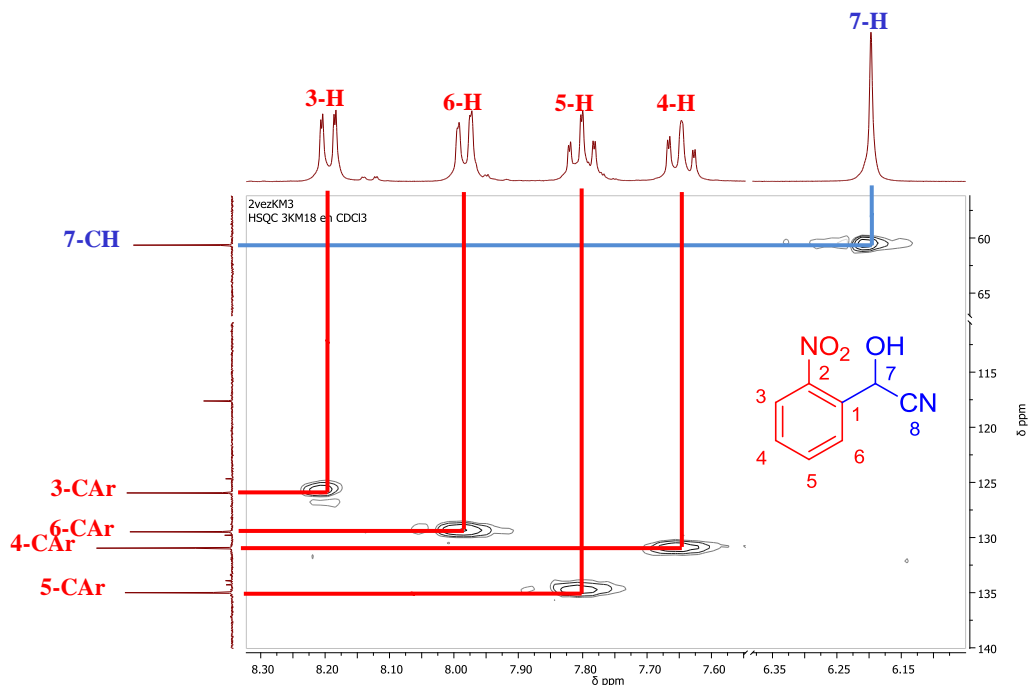
	Correlación $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$	Datos
		H7 – C8
	H7 – C6	6.20 , 129.43
	H7 – C4	6.20 , 130.85
	H7 – C2	6.20 , 146.92

Teniendo en cuenta que en la estructura propuesta, el hidrógeno H-7 se encuentra a tres enlaces con los carbonos C-2 y C-6 presentando los acoples en los puntos 6.20, 146.92 ppm y 6.20, 129.43 ppm respectivamente, y que a dos enlaces se copla con C8 y C1, presentando el punto 6:20, 117.51 ppm para C-8 y el punto 6.20, 130.85 ppm para una señal adjudicada a C4, se cree que sobre esta señal se encuentra solapada el C-1, ya que el acople con el carbono C-4 a 5 enlaces no es posible para este experimento. Siguiendo los acoples de la señal de carbono a 130.85 ppm (línea verde), se encuentran los acoples respectivos con los hidrógenos H-5 y H-6, teniendo en cuenta que el C-4 también acopla con estos, además de H-3 (**Figura 16**).

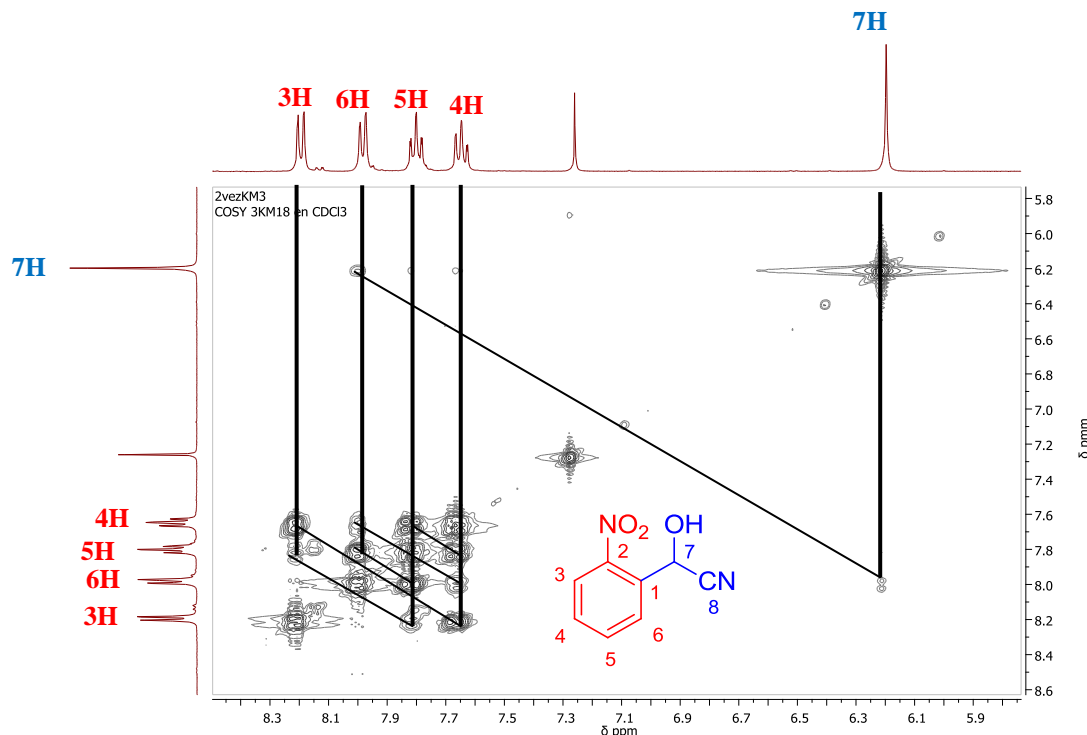
Usando el experimento de acoplamiento heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, que determina la conectividad entre los protones con el carbono, se confirmó la asignación realizada de los protones, junto a la posterior asignación de los carbonos (**Figura 17**).

Complementando la información revelada en el espectro de HSQC, se elucidó el espectro del experimento COSY distinguiendo la correlación que existe entre los protones del anillo y el protón metínico C-7, confirmando bidimensionalmente la estructura del 2-hidroxi-2(2-nitrofenil) acetonitrilo **10b**.

Observando la diagonal del espectro COSY (**Figura 18**), e indicando que cada señal a un lado de la diagonal tenga su imagen especular al otro lado, se determinaron los acoplos correspondientes a cada una de estas señales, mostrando que los protones del anillo aromático acoplan entre sí, siguiendo la secuencia: H-3 acopla con H-4 en el punto 8.20 ppm, 7.64 ppm y a su vez acopla con el protón H-5 en el punto 8.20 ppm, 7.80 ppm, de igual forma el protón H-4 además de acoplar con H-3 acopla con los protones H-6 en 7.64 ppm, 7.99 ppm y con H-5 en 7.64 ppm, 7.80 ppm. En el caso del protón 6H acoplado ya con 4H, también acopla con H-5 en 7.99 ppm, 7.80 ppm, y finalmente, con H-7 (protón metínico) en 7.99 ppm, 6.20 ppm, siendo el protón H-6 del anillo adyacente a H-7, confirmando la asignación dada.



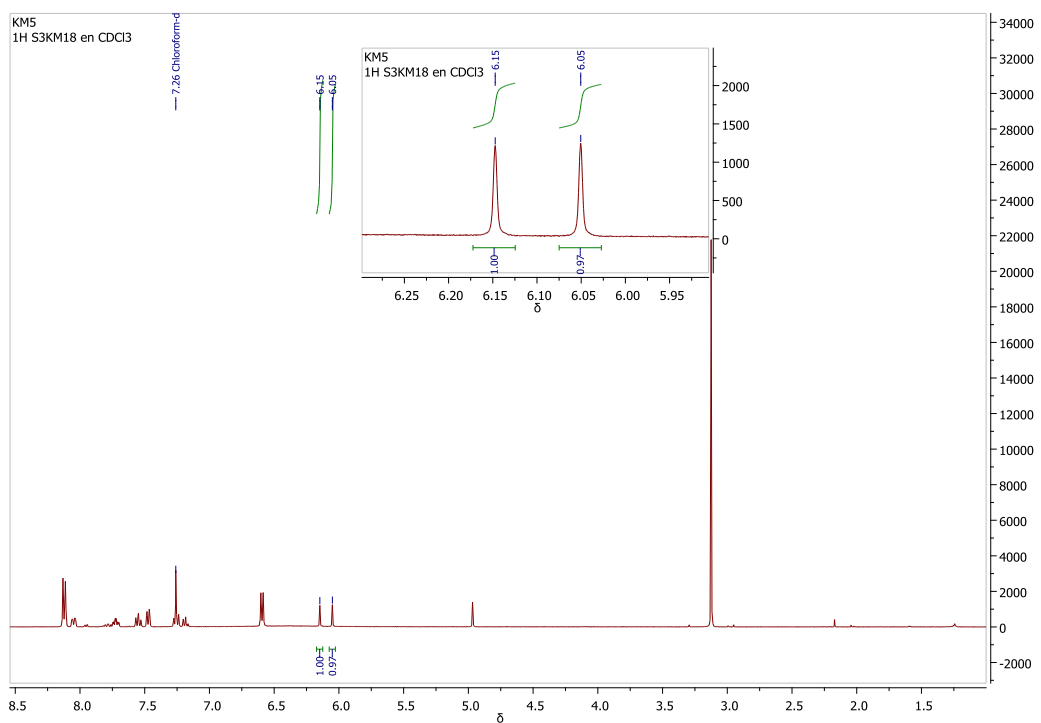
**Figura 17.** Interacción de los protones con los carbonos a través del espectro HSQC.



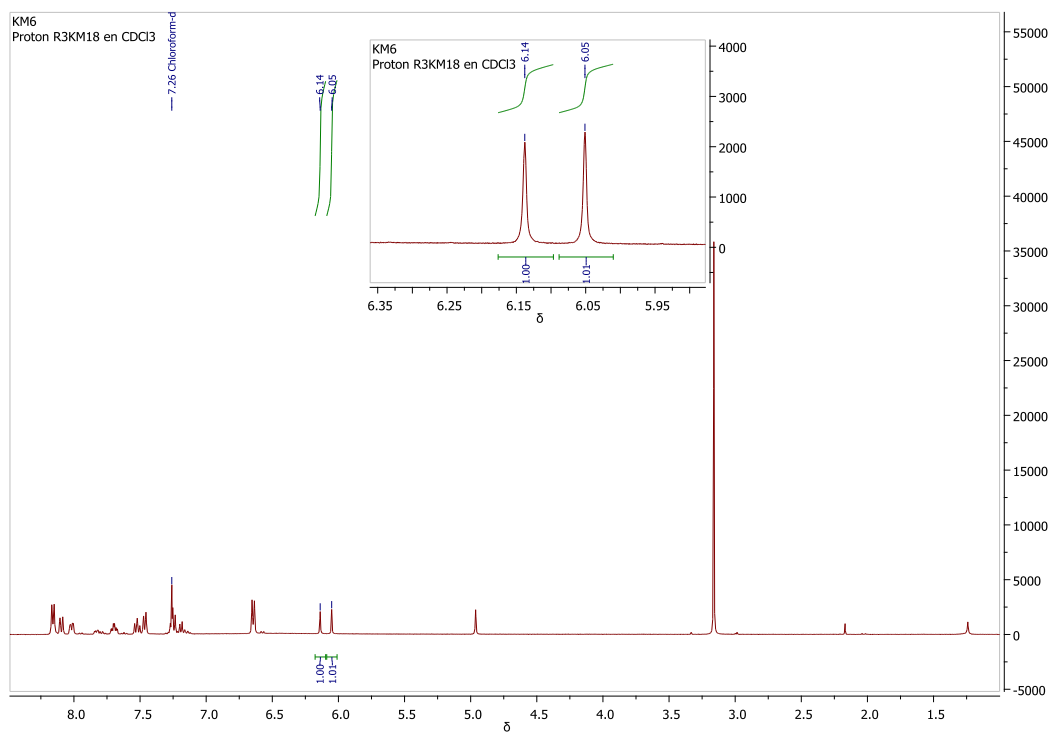
**Figura 18.** Interacción entre protones a través del espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY.

Por último, el experimento que se hizo para determinar el exceso enantiomérico y la configuración absoluta de esta cianohidrina mediante resonancia magnética nuclear, se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Moon et al.<sup>26</sup>

En resonancia magnética nuclear, los núcleos diastereotopos exhiben desplazamientos equivalentes o isócronos en solventes aquirales, como lo es el caso del protón metilénico de la cianohidrina. Sin embargo, en solventes quirales los núcleos residen en diferentes ambientes y en principio deberían tener diferente desplazamiento químico. El experimento, usando el complejo DMAP-ácido mandélico, generó el ambiente propicio para que el protón  $\alpha$  revele un comportamiento anisocrono y se observaran las señales respectivas (como dos singletes) en proporción 1:1 (**Figura 19**, **Figura 20**); mostrando la existencia de una correlación entre el desplazamiento químico y la configuración absoluta de la cianohidrina **10b**.



**Figura 19.** Anisocronía del protón metilénico, usando DMAP-(S)-ácido mandélico.



**Figura 20.** Anisocronía del protón metilénico, usando DMAP-(R)-ácido mandélico.

El análisis se lleva a cabo hallando para cada espectro la diferencia entre las señales del protón H-7, determinadas por  $\Delta\delta^S = 0.1$  y  $\Delta\delta^R = 0.09$ .

Obteniendo  $\Delta\delta^{RS} = \Delta\delta^S - \Delta\delta^R$ , = - 0.01, se tiene el valor de exceso enantiomérico y por el signo menos la configuración absoluta S. Sin embargo, este compuesto mostró el valor correspondiente a compuestos que interfieren en la formación del complejo, por lo cual el valor no es válido para determinar la configuración y el exceso enantiomérico.

Según el modelo molecular presentado para el complejo DMAP-ácido mandélico, unido por el par iónico piridinio-mandelato (NH<sup>-</sup> - -O), la cianohidrina entra, formando un puente de hidrógeno con el hidroxilo y el carboxilato del mandelato OH<sup>-</sup> - -O, manteniendo el grupo ciano al lado opuesto del carboxilato. De esta forma, el hidrógeno  $\alpha$  se encuentra en la zona anisotrópica del anillo del DMAP, moviendo la señal a campo alto. Es posible que el grupo nitro del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo interfiera con el carboxilato del mandelato, ya sea apantallando al hidrógeno  $\alpha$  o impidiendo su entrada al complejo por su voluptuosidad y a la cercanía de este al grupo bifuncional, impidiendo la apreciación de la configuración absoluta de esta cianohidrina.

## 5. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos propuestos para este trabajo de investigación, se puede concluir que:

- ★ La síntesis de cianohidrinas racémicas se realizó mediante catálisis ácida usando como fuente de cianuro la sal de cianuro de potasio, presentando el mejor rendimiento de síntesis para el 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil)acetonitrilo **10b**, la catálisis con el reactivo metabisulfito de sodio. En el caso de la síntesis del hidroxipiridin-2-il)acetonitrilo **10c** se procedió a la protección del grupo hidroxilo, logrado mediante la táctica “one pot”, formando inicialmente la cianohidrina y sin extracción acetilarla. Obteniendo un rendimiento del 21 % para la cianohidrina que no se puede preparar por medios ácidos en síntesis de cianohidrinas.
- ★ La enzima hidroxinitril liasa crudo de las almendras, presentó una actividad específica de 9.61 U/mg de preparado, encontrándose también en el análisis por electroforesis con un peso molecular de 60 kDa.
- ★ La síntesis de las cianohidrinas enantioméricamente puras se llevó a cabo mediante la preparación del crudo enzimático proveniente de las almendras, sumergido en un buffer de acetato a pH 5, usando como solvente el diisopropil éter y como fuente de cianuro, la acetona cianohidrina, de donde se formó con eficiencia la cianohidrina 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil)acetonitrilo.
- ★ La configuración absoluta de la cianohidrina y el exceso enantiomérico de la reacción enzimática, no se pudo determinar por resonancia magnética nuclear, ya que el grupo nitro del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil)acetonitrilo interfirió con el experimento usado. Sin embargo, debido a que la presencia de la cianohidrina es evidente, se cree que la síntesis enantioselectiva sí ocurrió.
- ★ Comparando el rendimiento de la única cianohidrina obtenida **10b** por ambas rutas, se indica que tanto la síntesis de la cianohidrina racémica como la enzimática proveen rendimientos por debajo del 50 %, revelando que el equilibrio se dirige hacia los reactivos, ya sea porque el solvente no es suficiente para estabilizar el producto, o porque la cianohidrina en sí, es inestable.
- ★ El análisis por cada una de las técnicas espectroscópicas y espectrométricas, permitieron establecer las estructuras de las cianohidrinas sintetizadas, presentando concordancia con las estructuras esperadas.
- ★ La síntesis de cianohidrinas no puede ser determinada con un solo procedimiento, ya que el éxito sintético de estas, dependen del aldehído de partida y de la estabilidad de la cianohidrina en el medio de reacción.

## BIBLIOGRAFÍA

1. BIOLOGY Department of McDaniel College Plant Defense Systems & Medicinal Botany <http://www2.mcdaniel.edu/Biology/botf99/herbnew/aprodbc.htm> <3/04/2013>
2. FRAENKEL, G. The raison d'Etre of secondary plant substances. *Science*, **1959**, *129*, 1466-1470.
3. THEIS, N.; LERDAU, M; The evolution of function in plant secondary metabolites. *J. Plant. Sci.*, **2003**, *164*, 93-102.
4. VENTURI, S. Evolutionary significance of Iodine. *Curr. Chem. Biol.*, **2011**, *5*, 155-162.
5. NAHRSTEDT, A. Cyanogenic compounds as protecting agents for organisms. *Pl. Syst. Evol.*, **1985**, *150*, 35-47.
6. VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon.*, **2000**, *38*, 11-36.
7. DADASHIPOUR, M.; ASANO, Y. Hydroxynitril lyases: Insights into biochemistry, discovery, and engineering. *ACS Catal.*, **2011**, *1*, 1121-1149.
8. IUPAC Compendium of chemical terminology Gold Book. Version 2.3.2 (2012-8-19). P. 364.
9. GREGORY, R. Cyanohydrins in nature and the laboratory: Biology, Preparations, and Synthetic applications. *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 3649-3682.
10. CLAYDEN, J.; GREEVES. N.; WARREN. S.; WOTHERS. P. Organic chemistry. New York. Oxford University Press. **2001**. P. 137-138.
11. PELLISSIER, H. Dynamic kinetic resolution. *Tetrahedron*, **2003**, *59*, 8291-8327.
12. MICHEL, J.; HOLMES, I. Chemically catalyzed asymmetric cyanohydrins syntheses. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, *43*, 2752-2778.
13. HERNÁNDEZ, L.; LUNA, H.; RUÍZ-TERÁN, F.; VÁZQUEZ, A. Screening for hydroxynitrile lyase activity in crude preparations of some edible plants. *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, **2004**, *30*, 105-108.
14. DREVENY, I.; ANDRYUSHKOVA, A.; GLIEDER, A.; GRUBER, K.; KRATKY, C. Substrate binding in the FAD-dependent hydroxynitrile lyase from almond provides insight into the mechanism of cyanohydrin formation and explains the absence of dehydrogenation activity. *Biochem.*, **2009**, *48*, 3370-3377.
15. DREVENY, I.; GRUBER, K.; GLIEDER, A.; THOMPSON, A.; KRATKY, C. The hydroxynitrile lyase from almond: A lyase that looks like an oxidoreductase. *Structure*, **2001**, *9*, 803-815.
16. ROSENTHALER, L. Durch enzyme bewirkte asymmetrische synthesen. *Biochem. Z.*, **1908**, *14*, 238-253.
17. DREVENY, I.; KRATKY, C.; GRUBER, K. The active site of hydroxynitrile lyase from *Prunus amygdalus*: Modeling studies provides into the mechanism of cyanogenesis. *Protein Science*, **2002**, *11*, 292-300.
18. GRIENGL, H.; SCHWAB, H.; FECHTER, M. The synthesis of chiral cyanohydrins by oxynitrilases. *TIBTECH*, **2000**, *18*, 252-256.
19. SHARMA, M.; SHARMA, N.; BHALLA, T. Hydroxynitrile lyases: At the interface of biology and chemistry. *Enzyme Microb. Techn.*, **2005**, *37*, 279-294.
20. EFFENBERGER, F. Synthesis and reactions of optically active cyanohydrins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1994**, *33*, 1555-1564.

21. PERSSON, M.; COSTES, D.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Effects of solvent, water activity and temperature on lipase and hydroxynitrile lyase enantioselectivity. *Enzyme Microb. Techn.*, **2002**, *30*, 916-923.
22. VÄNTTINEN, E.; KANERVA, L. Combination of Lipase-Catalysed resolution with the Mitsunobu esterification in one pot. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, *6*, 1779-1786.
23. AHN, C.; CORREIA, R.; DeSHONG, P. Mechanistic study of the Mitsunobu reaction. *J. Org. Chem.*, **2002**, *67*, 1751-1753.
24. NELSON, D.; COX, M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York, Worth Publishers, 3ra Ed, **2000**, 92-95.
25. LUY, B. Distinction of enantiomers by NMR spectroscopy using chiral orienting media. *J. Indian I. Sci*, **2010**, *90*, 119-132.
26. MOON, L.; RAVINDER, S.; KASETTI, Y.; BHARATAM, P. A new chiral shift reagent for the determination of enantiomeric excess and absolute configuration in cyanohydrins. *Chem. Commun.*, **2009**, 1067-1069.
27. COX, R.; STORMONT, R. Acetone cyanohidrin. *Org. Syn.*, **1943**, *Coll. Vol. 2*, 7.
28. YOSEF, H.; MORSY, N.; MAHRAN, M.; ABOUL-ENEIN, H. Preparation and Reaction of Optically Active Cyanohydrins Using the (R)-Hydroxynitrile Lyase from *Prunus amygdalus*. *J. Iran. Chem. Soc.*, **2007**, *4*, 44-58.
29. ROSSI, F.; KAO, J. Nmoc-DBHQ, a new caged molecule for modulating sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase activity with light flashes. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 3266-3271.
30. MATHES, W.; SAUERMILCH, W.; Über einige Beobachtungen in der Gruppe der Pyridinaldehyde. *Chem. Ber.*, **1989**, *6/1956*, 1515-1521.
31. PARASKAR, A.; SUDALAI, A.; Cu(OTf)<sub>2</sub> or Et<sub>3</sub>N-catalyzed three component condensation of aldehydes, amines and cyanides: a high yielding synthesis of  $\alpha$ -aminonitriles. *Tetrahedron Lett.*, **2006**, *47*, 5759-5762.
32. NIEUWENDIJK, A.; WARMERDAM, E.; BRUSSEE, J.; GEN, A. An enantioselective synthesis of the Williams glycine template. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1995**, *6*, 801-806.
33. KRAMMER, B.; RUMBOLD, K.; TSCHEMMERNEGG, M.; PÖCHLAUER, P.; SCHWAB, H.; Anovel screening assay for hydroxynitrile lyases suitable for high-throughput screening. *J. Biotechn.*, **2007**, *129*, 151-161.
34. CALVO, G. Biotransformaciones en la síntesis y resolución de compuestos de interés farmacéutico. Oviedo. Universidad de Oviedo Biblioteca Universitaria, **2009**, p 15.
35. XU, Q.; XIE, Y.; GENG, X.; CHEN, P. Enzymatic kinetic resolution of racemic cyanohydrins via enantioselective acylation. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 624-630.
36. OGNYANOV, V.; DATCHEVA, V.; KYLER, K. Preparation of chiral cyanohydrins by an Oxynitrilase-mediated transcyanation. *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 6992-6996
37. RZEPA, H. Chemistry with a twist. WordPress. <http://www.ch.imperial.ac.uk/rzepa/blog/?p=3576> <23/01/2013>
38. MORRISON, R. T. y BOYD, R. N. *Química Orgánica*, 6ª Ed, México, Pearson Educación, 2002, p. 637-638.
39. GROSS, J. *Mass Spectrometry: a Textbook*. Heidelberg, Springer, 2da Ed., **2004**, p. 263.

40. HAN, S., LIN, G., LI, Z. Synthesis of (R)-cyanohydrins by crude (R)-oxynitrilase-catalyzed reactions in micro-aqueous medium. *Tetrahedron: Asymmetry*, **1998**, *9*, 1835-1838.
41. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric identification of organic compounds. New York: John Wiley & Sons, **2005**, p.216 .
42. HICKEL, A.; RADKE, C.; BLANCH, H. Hydroxynitrile Lyase at the Diisopropyl Ether/Water Interface: Evidence for Interfacial Enzyme Activity. *Biohecto. and Bioeng.*, **1999**, *65*, *4*, 435-436.
43. VOET,D.; VOET, D. Bioquímica. *John Wiley & Sons, Inc.* Editorial Médica Panamericana. 3a Edición. **2004**, p. 502.
44. HICKEL, A.; RADKE, C.; BLANCH, H. Role of organic solvents on Pa-Hydroxynitrile lyase interfacial activity and stability. *Biohecto. Bioeng.*, **2001**, *74*, *1*, 18-28.
45. SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F.; KIEMLE, D. Spectrometric Identification of organic compounds. New York; John Wiley & Sons, **2005**, p. 150-152.
46. SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F.; KIEMLE, D. Spectrometric Identification of Organic Compounds. New York John Wiley & Sons. **2005**, p. 257

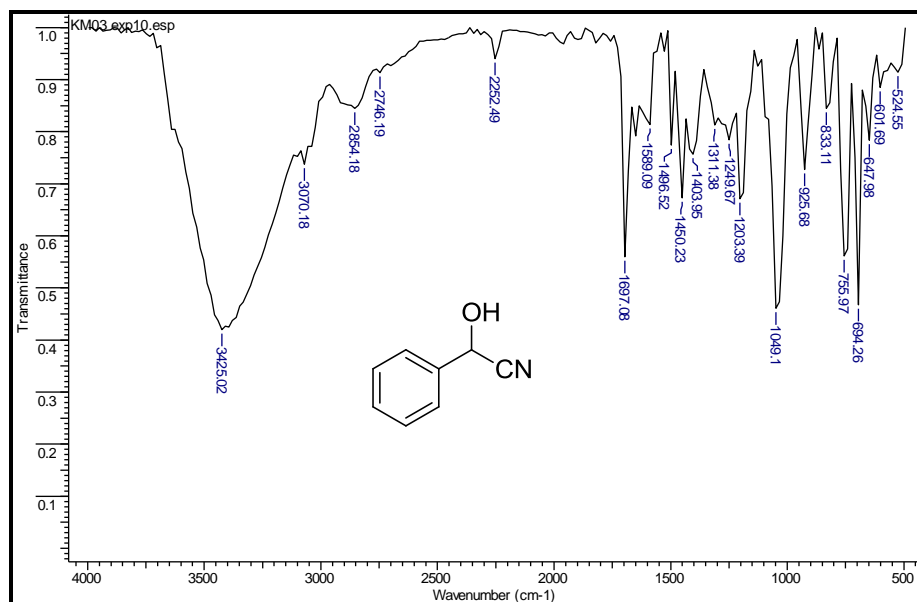
## **ANEXOS**

## ANEXOS I-II

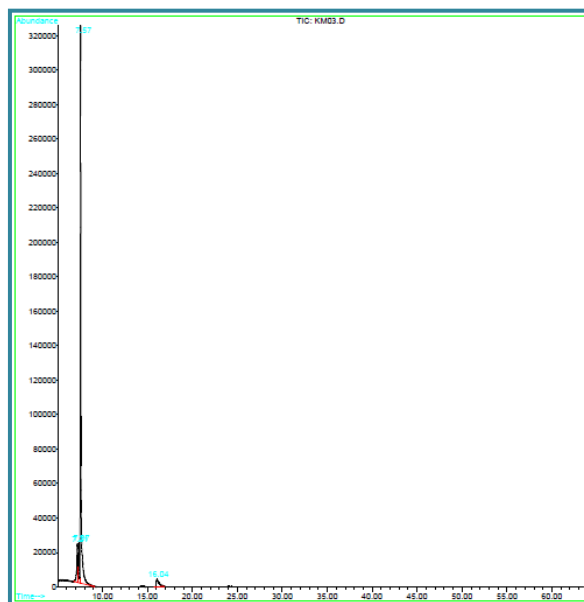
### Información espectral relacionada a las cianohidrinas 10a-10b

#### Anexo I. Espectros relacionados al compuesto 10a

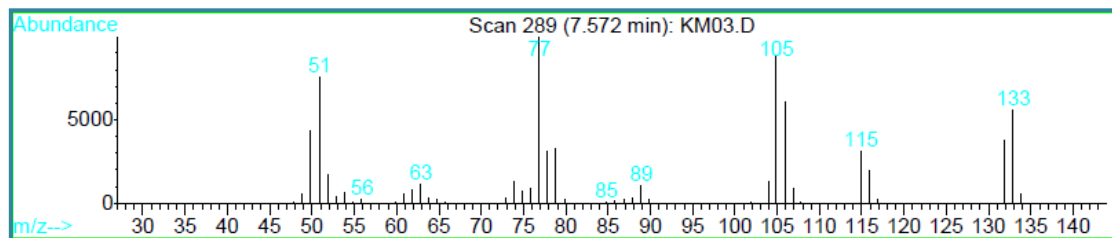
##### ANEXO I A Espectro infrarrojo del mandelonitrilo (10a).



##### ANEXO I B. Cromatograma del mandelonitrilo (10a)

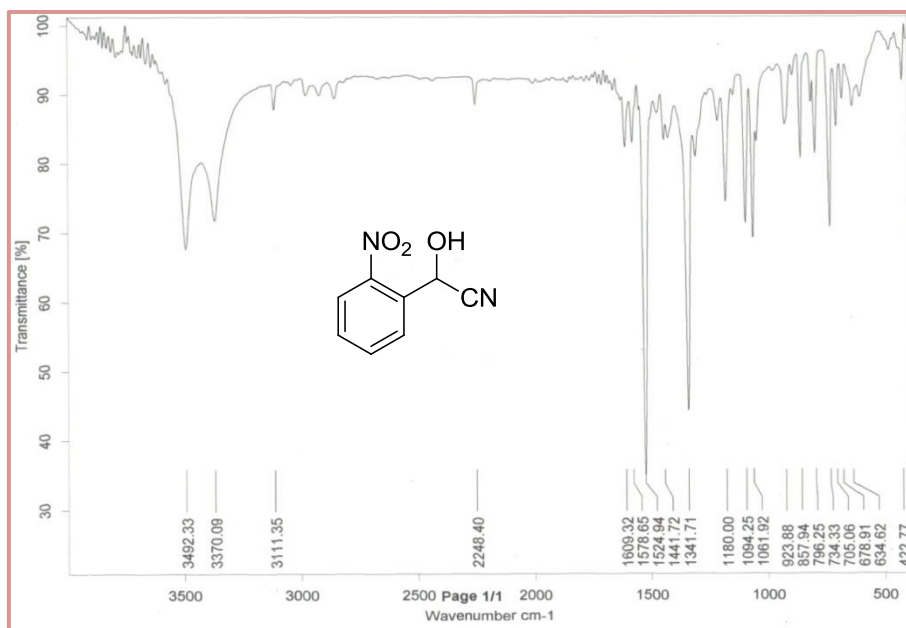


### ANEXO I C Fragmentograma del mandelonitrilo (10a)

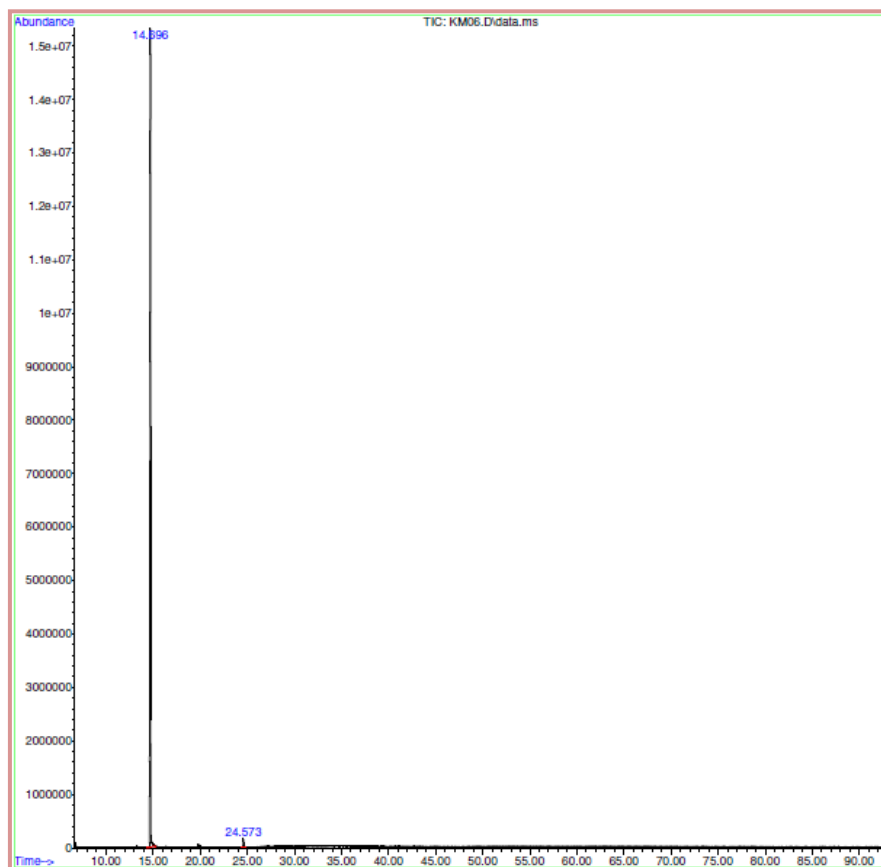


### Anexo II. Espectros relacionados al compuesto 10b

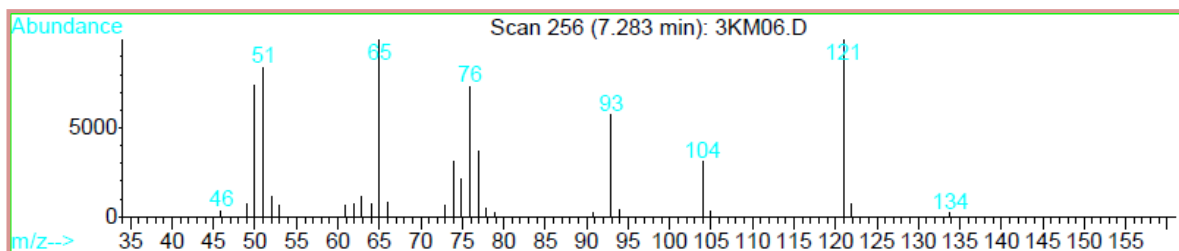
#### ANEXO II A Espectro infrarrojo del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (10b)



**ANEXO II B** Cromatograma del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (*10b*)



**ANEXO II C** Fragmentograma del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (*10b*)

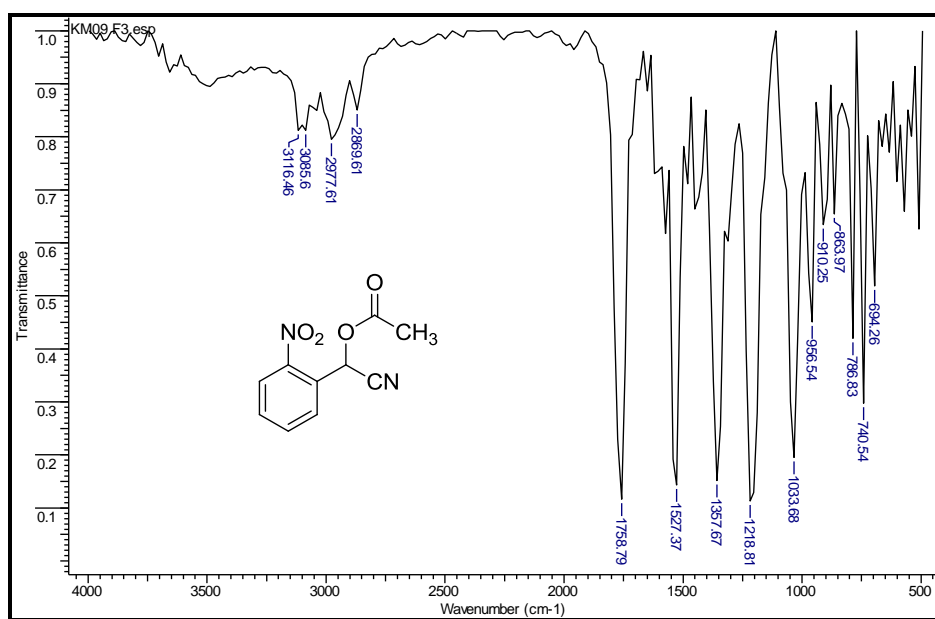


## ANEXOS III-IV

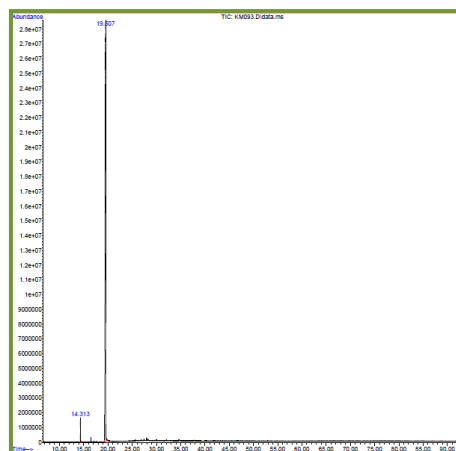
### Información espectral relacionada a cianoarilmethyl acetatos *12b-12c*

#### Anexo III. Espectros relacionados al compuesto *12b*

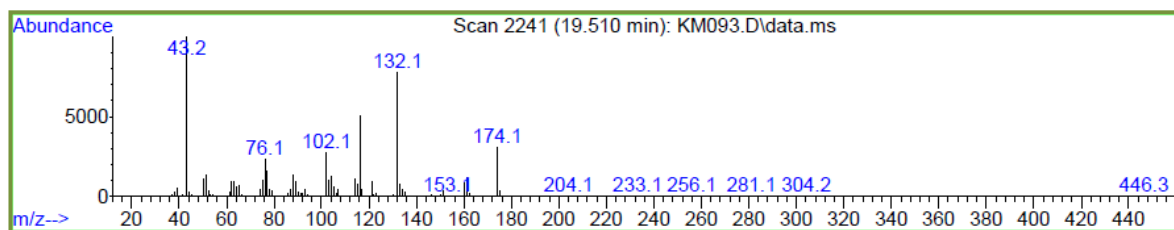
##### ANEXO III A Espectro infrarrojo del Ciano(2-nitrofenil)methyl acetato (*12b*).



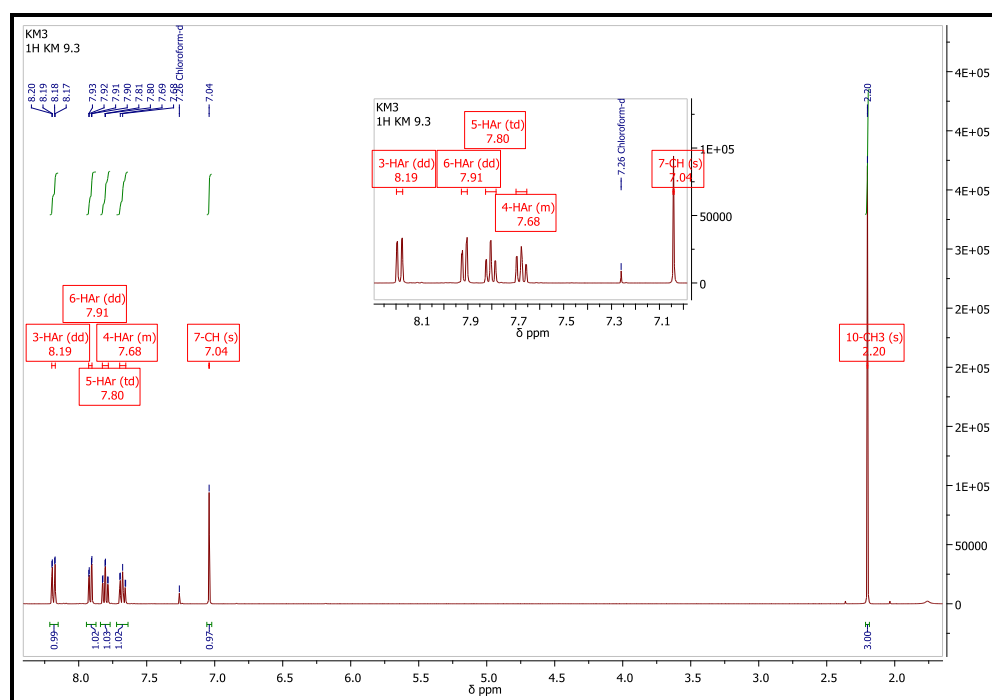
##### ANEXO III B Cromatograma del Ciano(2-nitrofenil)methyl acetato (*12b*)



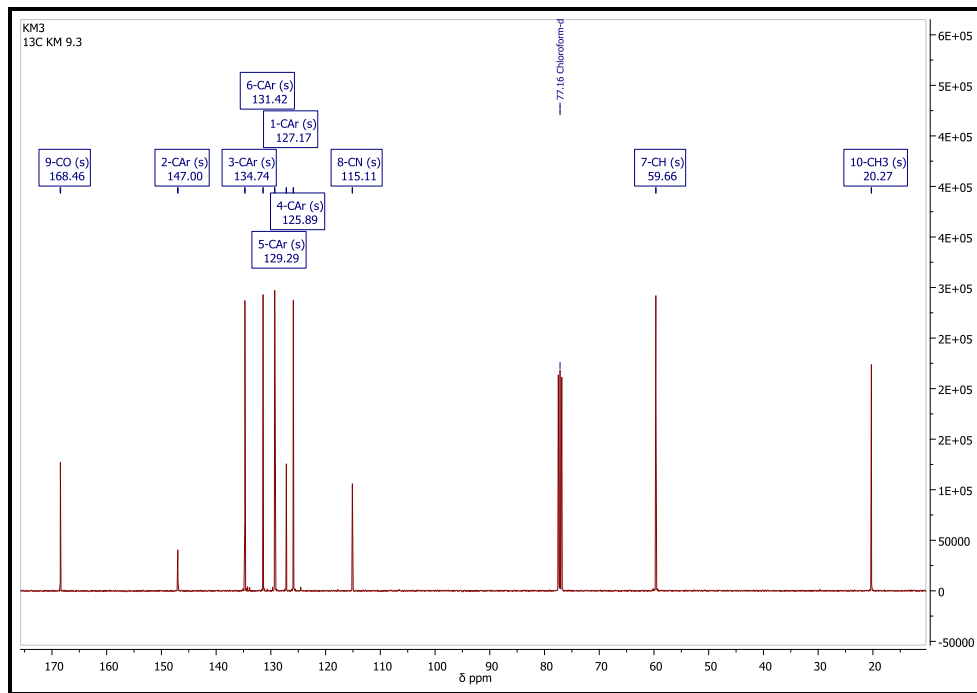
### ANEXO III C Fragmentograma del Ciano(2-nitrofenil)metil acetato (*12b*)



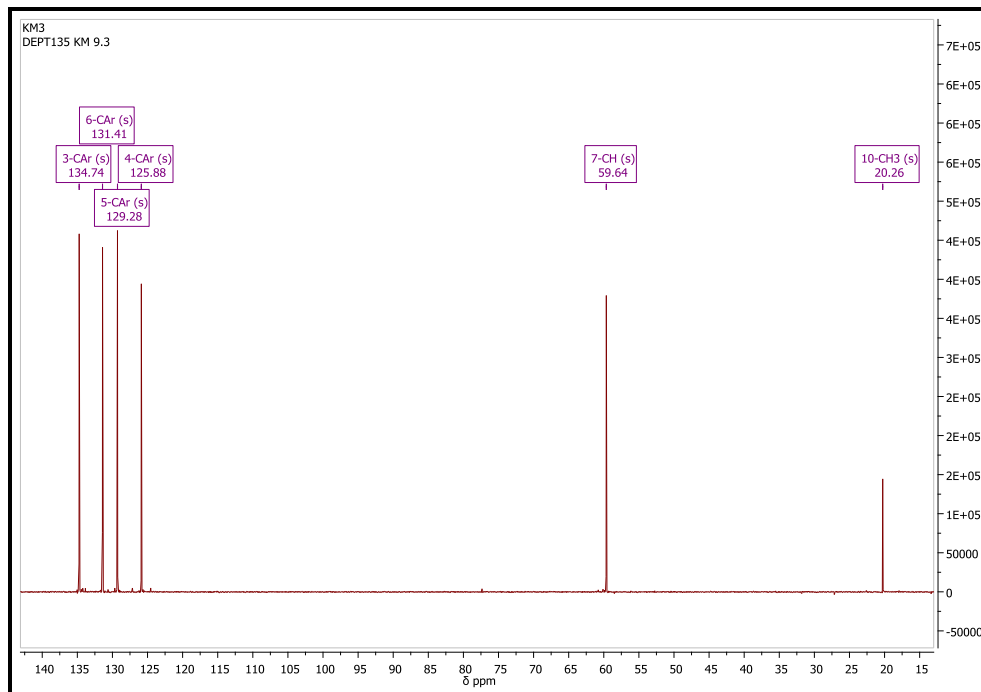
### ANEXO III D Espectro de $^1\text{H}$ -RMN del Ciano(2-nitrofenil)metil acetato (*12b*)



**ANEXO III E** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del Ciano(2-nitrofenil)metil acetato (*12b*)

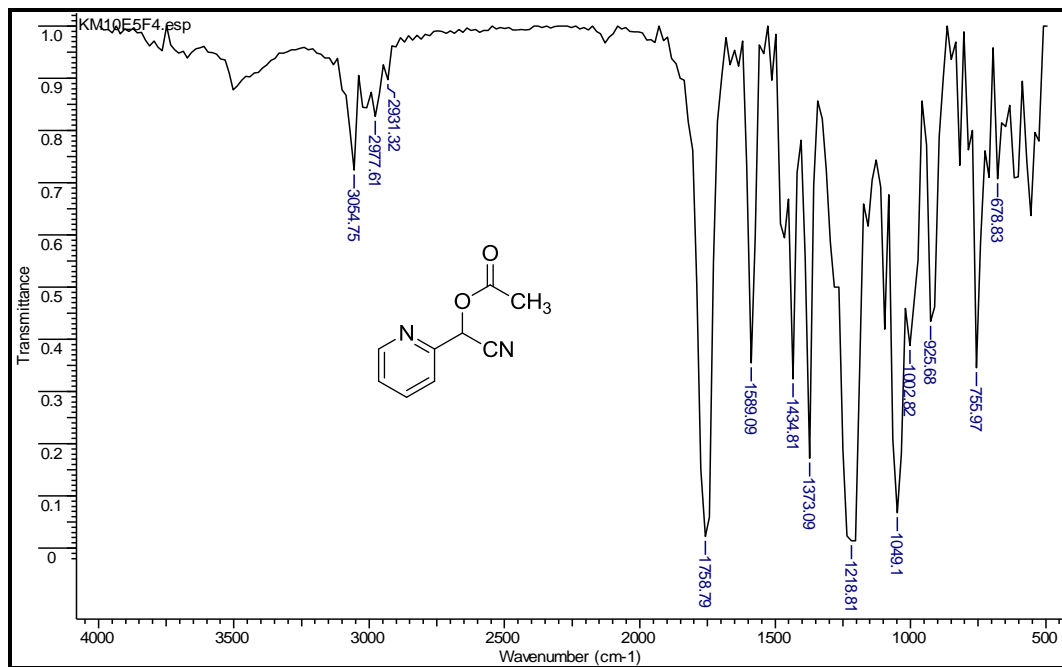


**ANEXO III F** Espectro de DEPT-135 del Ciano(2-nitrofenil)metil acetato (*12b*)

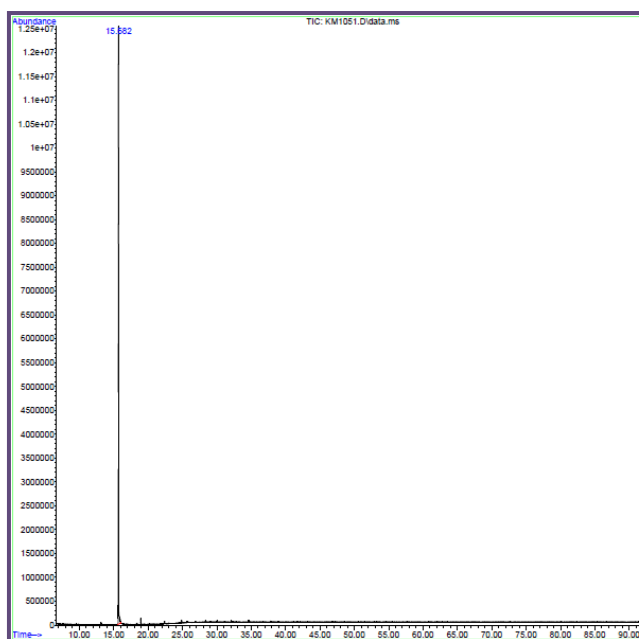


## Anexo IV. Espectros relacionados al compuesto *12c*

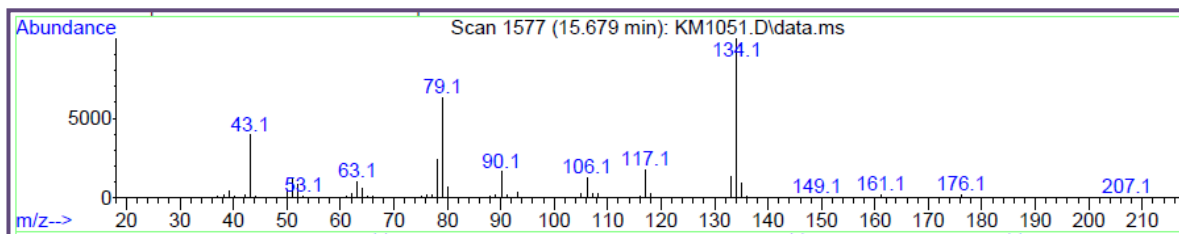
### ANEXO IV A Espectro infrarrojo del Ciano(piridin-2-il)metil acetato (*12c*).



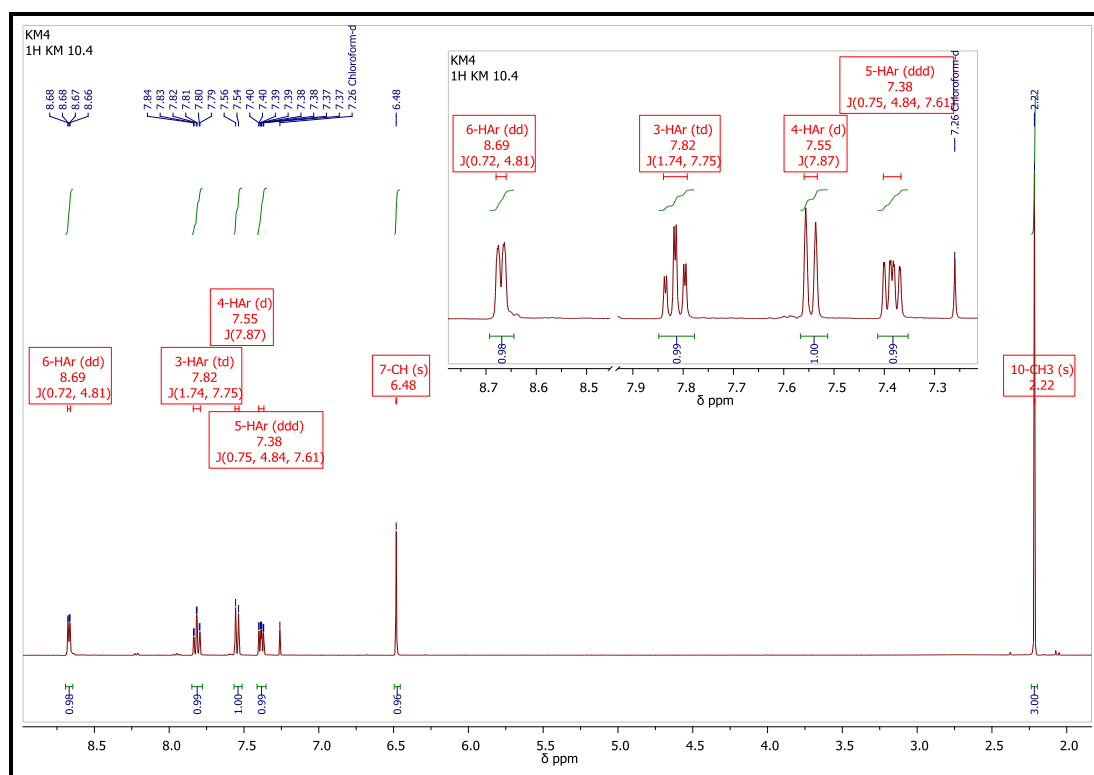
### ANEXO IV B Cromatograma del Ciano(piridin-2-il)metil acetato (*12c*)



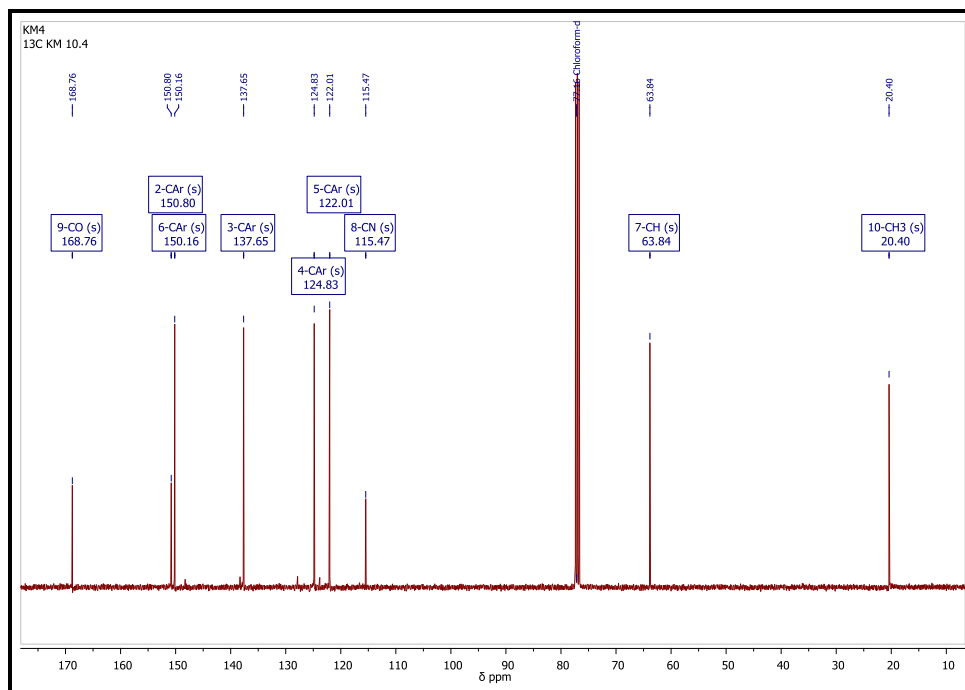
### ANEXO IV C Fragmentograma del Ciano(piridin-2-il)metil acetato (*12c*)



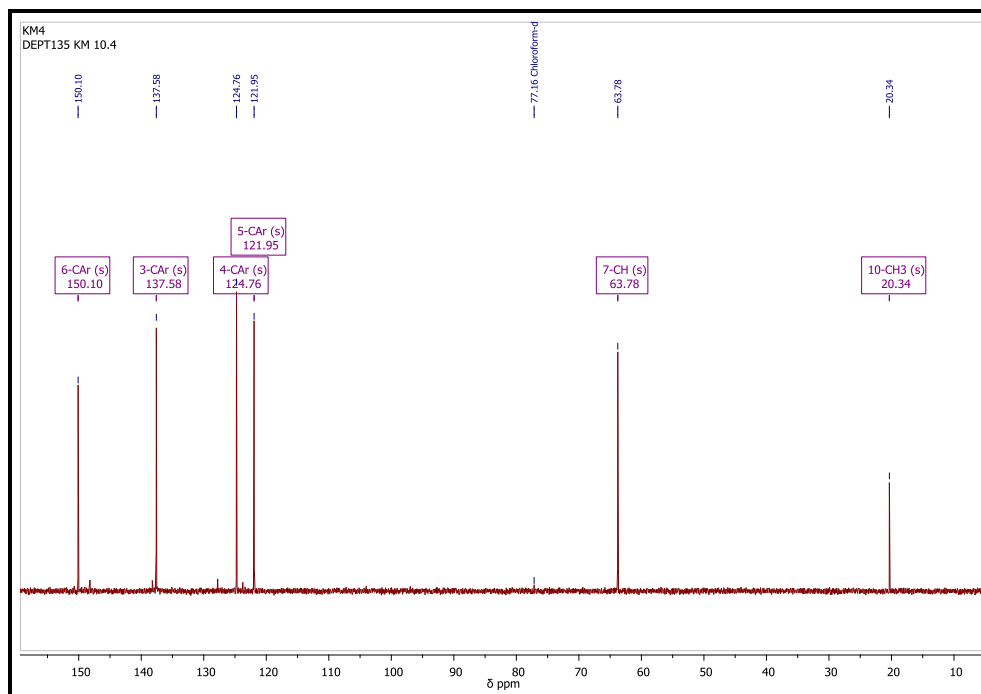
### ANEXO IV D Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del Ciano(piridin-2-il)metil acetato (*12c*)



ANEXO IV E Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del Ciano(piridin-2-il)metil acetato (*12c*).



ANEXO IV F Espectro de DEPT-135 del Ciano(piridin-2-il)metil acetato (*12c*).

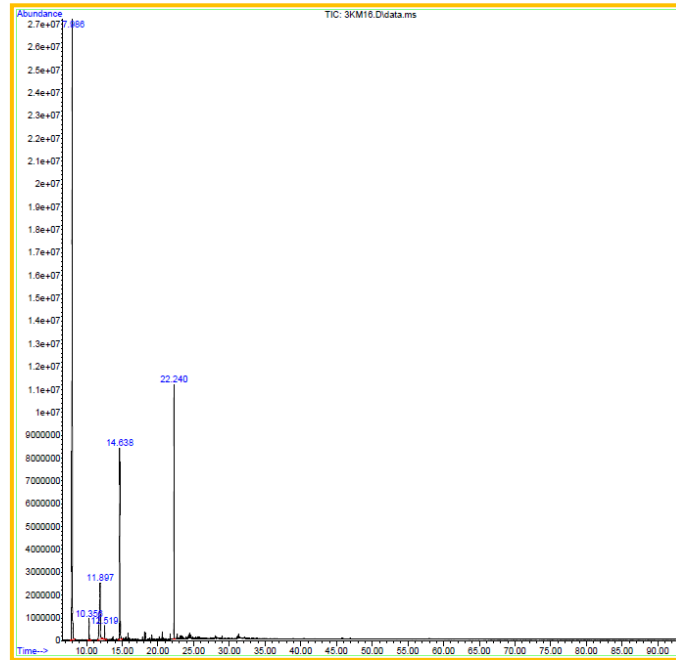


## ANEXOS V-VI

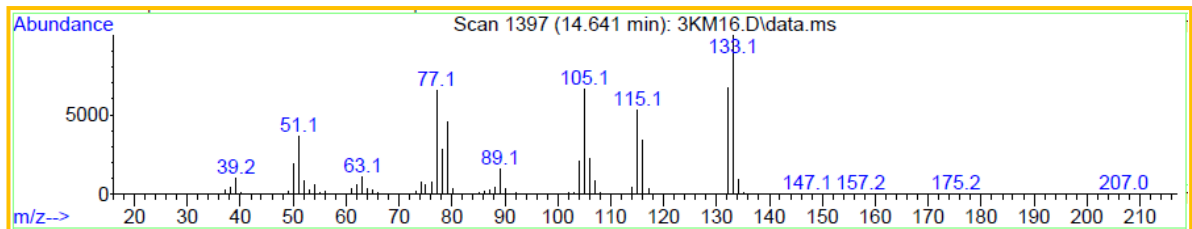
### Información espectral relacionada a la cianohidrinas *10a* *10b*

#### Anexo V. Espectros relacionados al compuesto *10a*

##### ANEXO V A Cromatograma del mandelonitrilo (*10a*)

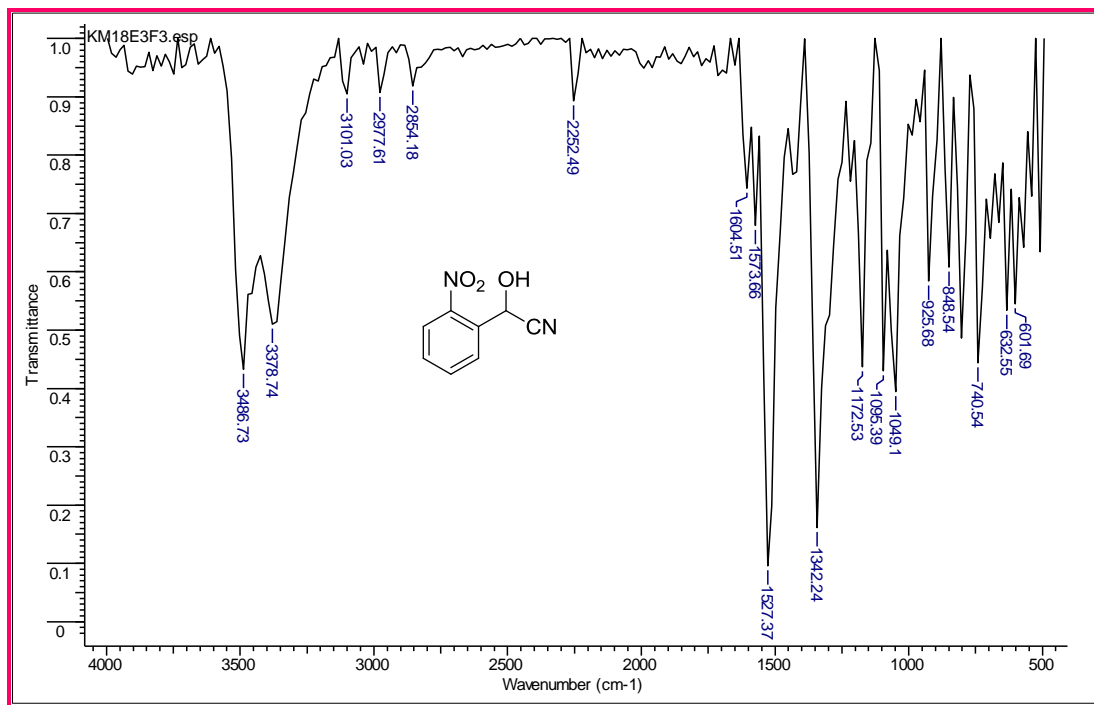


##### ANEXO V B Fragmentograma del mandelonitrilo (*10a*)

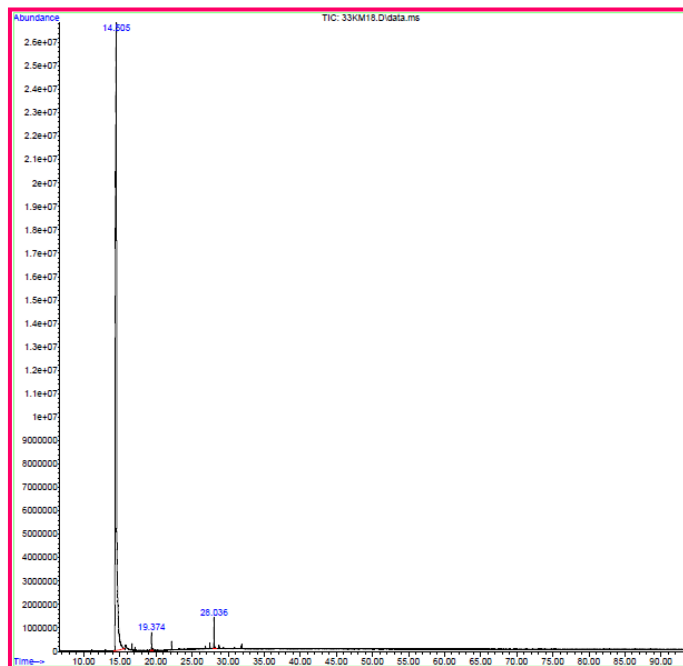


## Anexo VI. Espectros relacionados al compuesto *10b*

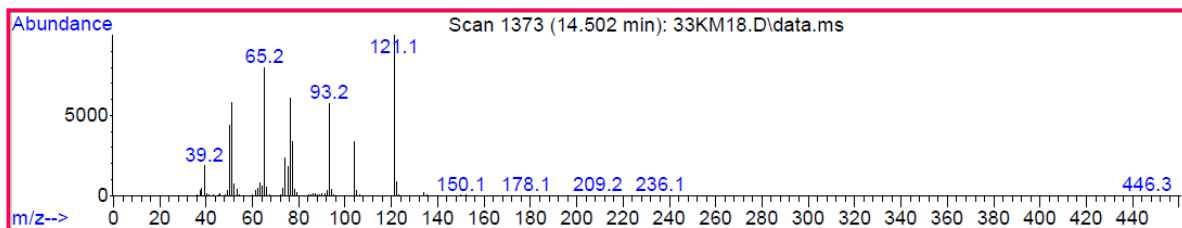
### ANEXO VI A Espectro infrarrojo del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (*10b*)



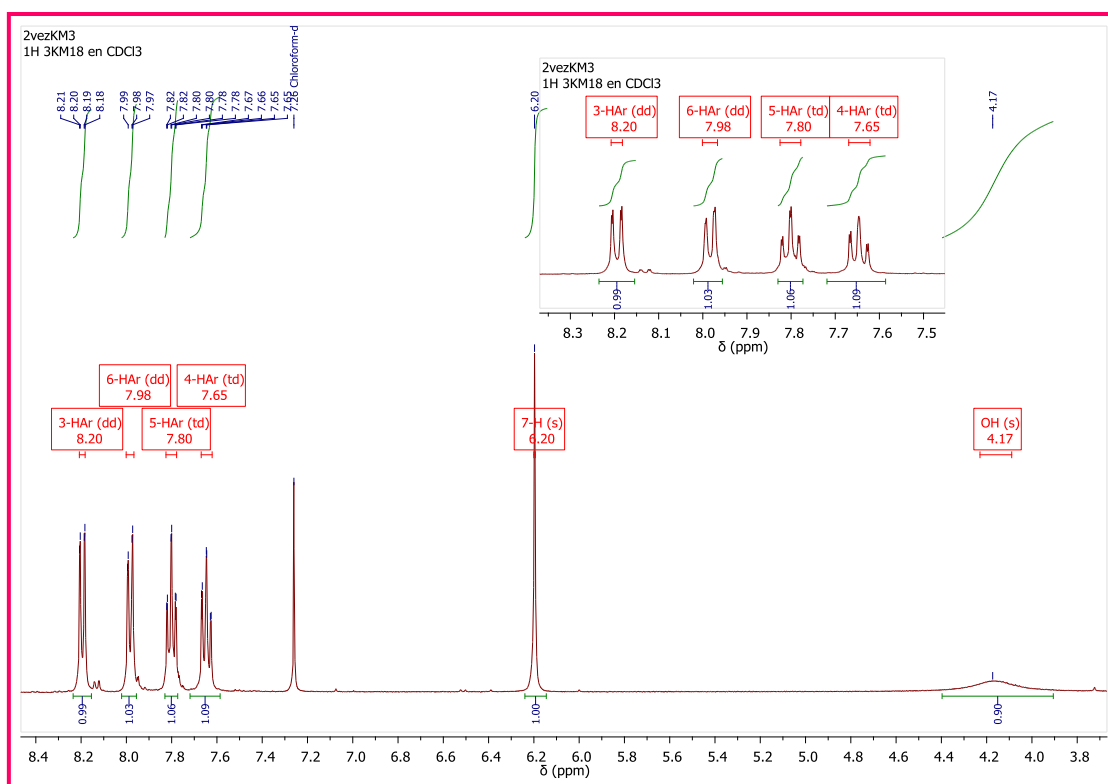
### ANEXO VI B Cromatograma del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (*10b*)



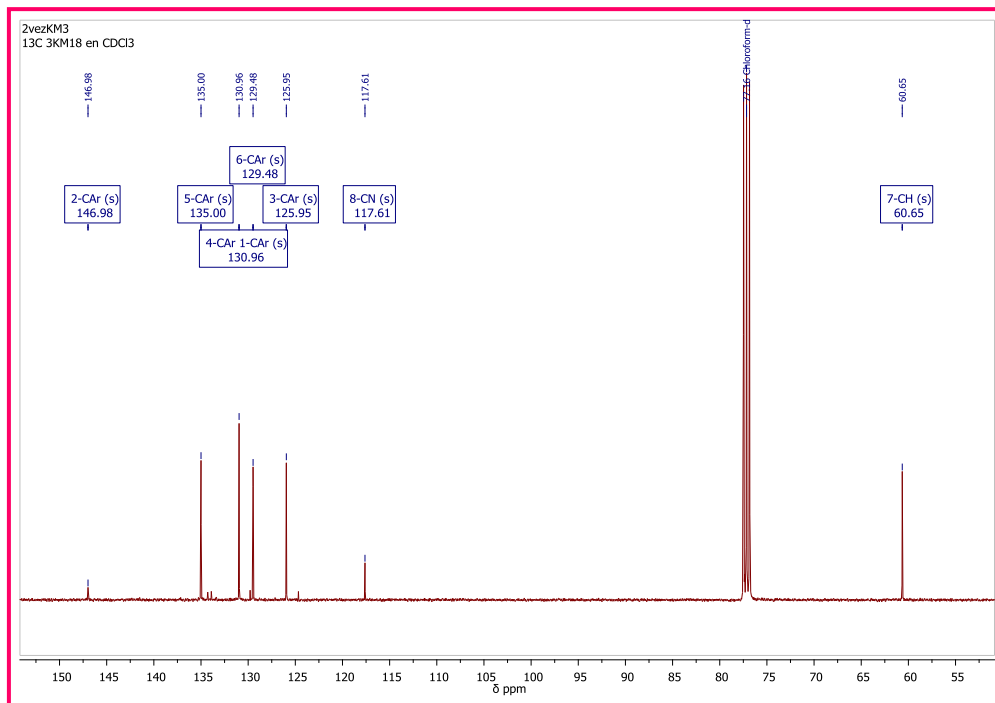
### ANEXO VI C Fragmentograma del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (10b)



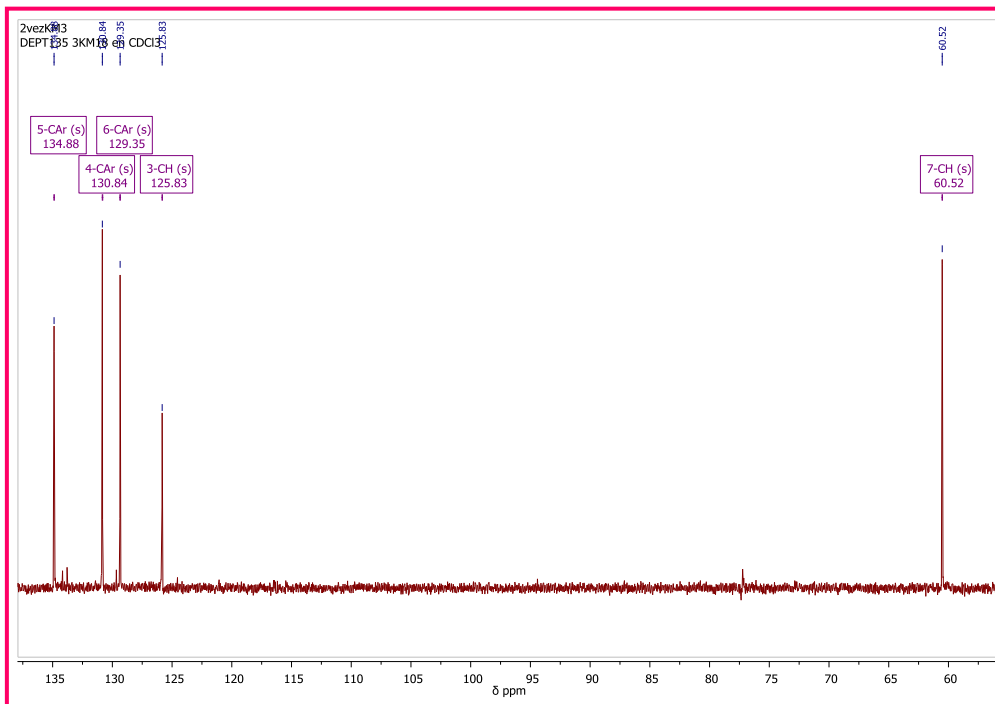
### ANEXO VI D Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (10b)



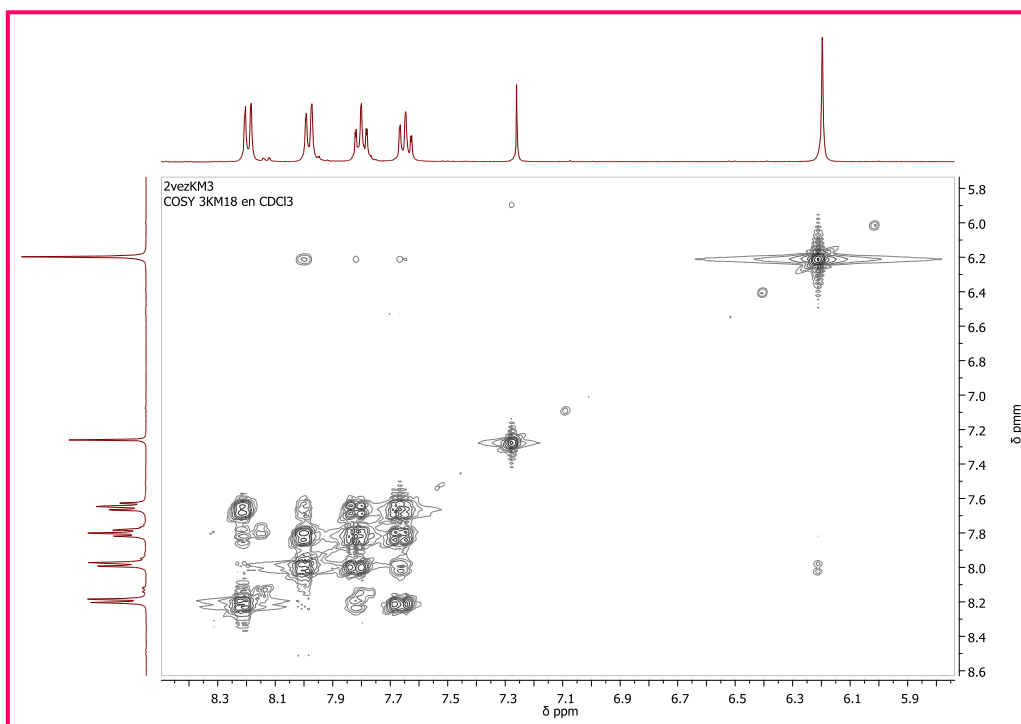
**ANEXO VI E** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (10b)



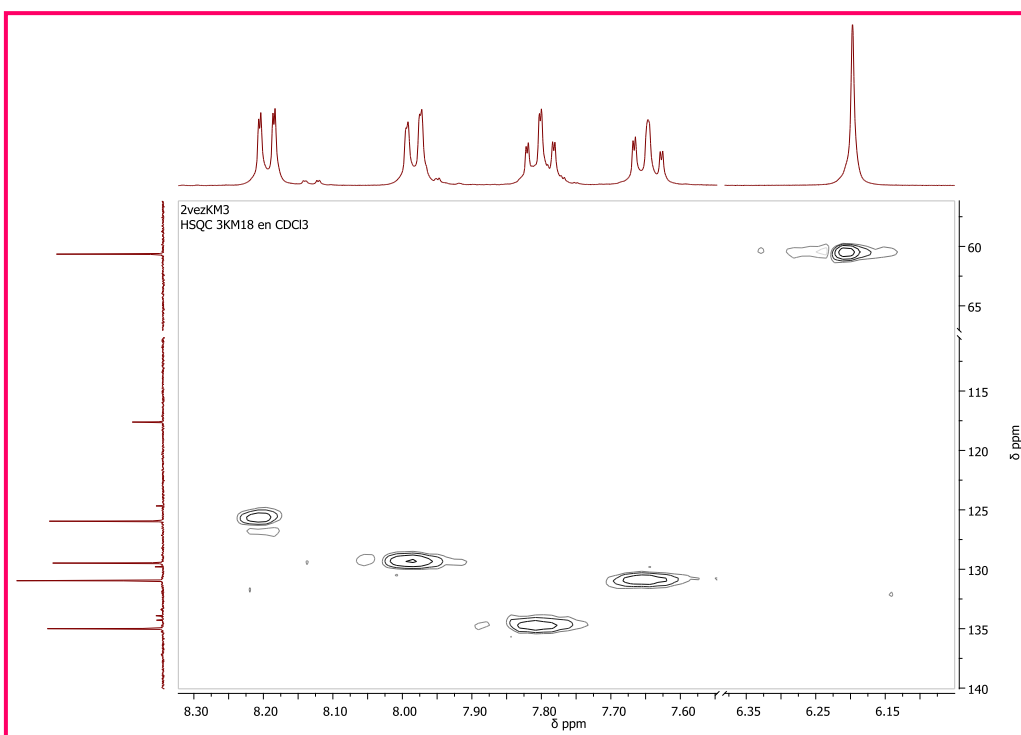
**ANEXO VI F** Espectro de DEPT-135 del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (10b)



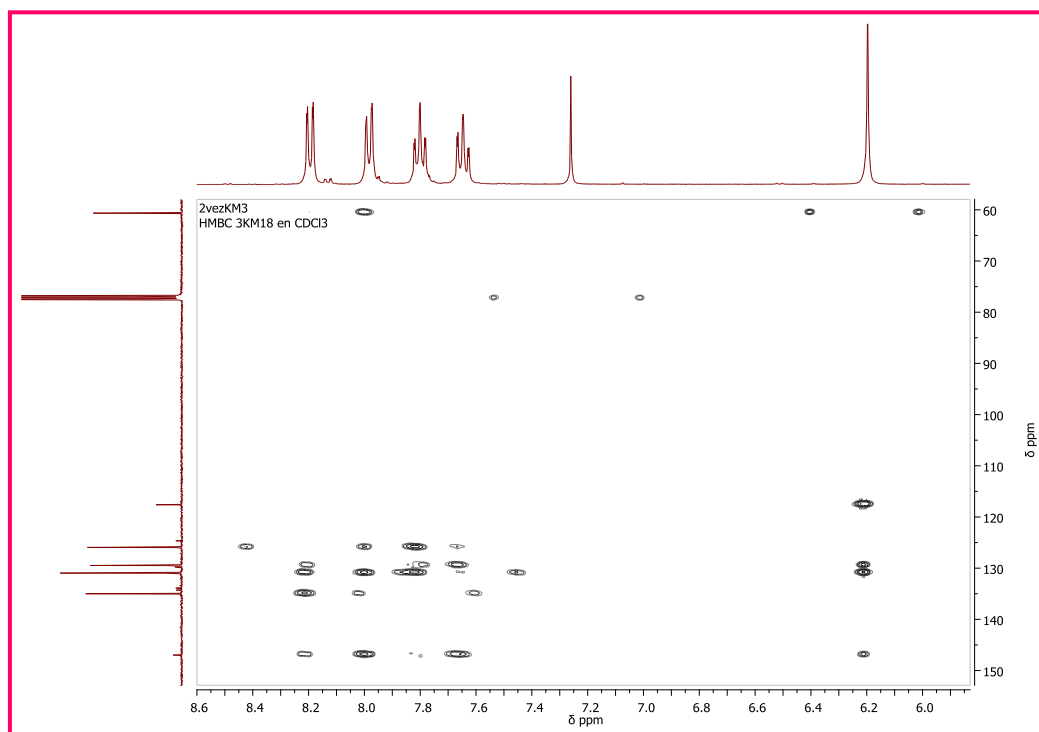
**ANEXO VI G** Espectro de COSY del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (*10b*)



**ANEXO VI H** Espectro de HSQC del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (*10b*)



ANEXO VI I Espectro de HMBC del 2-hidroxi-2-(2-nitrofenil) acetonitrilo (*10b*)

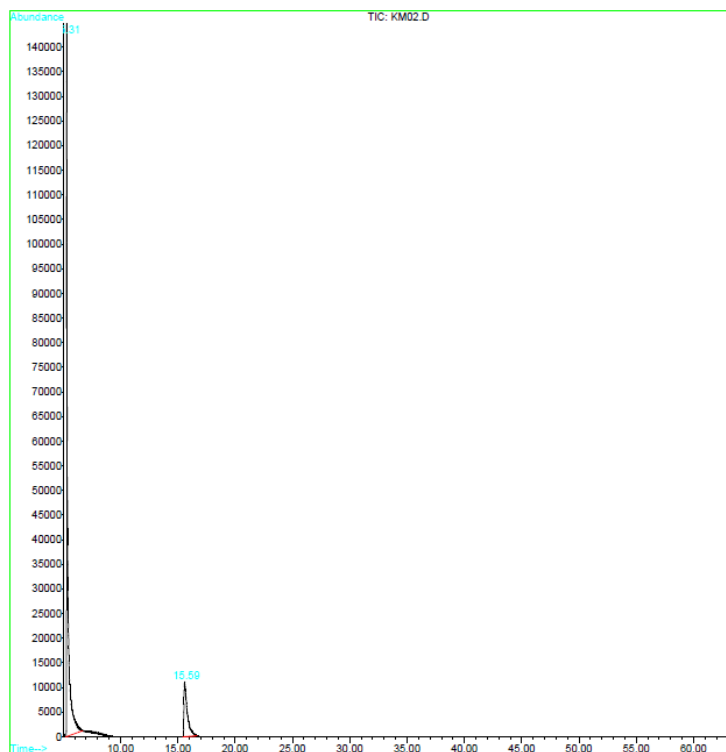


## ANEXOS VII

### Información espectral relacionada a la $\alpha$ -piridoína 10d

#### Anexo VII. Espectros relacionados al compuesto 10d

##### ANEXO VII A Cromatograma de la $\alpha$ -piridoína (10d)



##### ANEXO VII B Fragmentograma de la $\alpha$ -piridoína (10d)

