

Métodos para Determinar la Configuración Absoluta de una Molécula

Methods for the Assignment of the Absolute Configuration of an Organic Molecule

Juan Carlos Cedrón^{1,2,3}

¹Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González".

²Av. Astrofísico Francisco Sánchez 2, 38206,

La Laguna – Tenerife, España.

Resumen

Determinar la configuración absoluta de las moléculas quirales representa un gran reto para los químicos orgánicos. Para conseguir este objetivo existen diversas técnicas, las cuales se describen en el presente trabajo, así como ejemplos de cómo han sido utilizadas para la determinación de la configuración absoluta de productos naturales.

Palabras clave: Configuración absoluta, dicroísmo circular vibracional (DCV), difracción de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN).

Abstract

The assignment of the absolute configuration of chiral molecules represents a great challenge for organic chemists. There are several techniques in order to establish it, and they are described in this work, as well as examples of how they can be applied in the assignment of the absolute configuration of natural products.

Keywords: Absolute configuration, vibrational circular dichroism (VCD), X-Ray diffraction, nuclear magnetic resonance (NMR).

Introducción

Miles y miles de moléculas se conocen desde hace mucho tiempo, las cuales forman parte de nuestra vida diaria como medicinas, alimentos, aromas, sabores, etc. De ellas los químicos necesitamos algo básico para identificarla: su estructura química. Correctamente interpretada, de ella podemos deducir sus propiedades físicas (punto de fusión, solubilidad) o químicas (por ejemplo, su interacción con otras moléculas mediante reacciones, entre otras).

³ jcedron@ull.es

Con el objetivo de conocer la estructura química de una molécula, los químicos disponemos de instrumentos que nos facilitan este proceso. De todos ellos, la resonancia magnética nuclear (RMN) es, quizá, la más poderosa. Con ella se puede deducir la estructura de cualquier compuesto orgánico con mucha precisión, mediante diversos experimentos que, complementándose unos con otros, conllevan a elucidar una determinada sustancia. En este punto y en pleno siglo XXI, resulta impresionante cómo se elucidaban estructuras químicas hace unas décadas: con espectros infrarrojos, ultravioletas, y, claro, mediante reacciones químicas, que confirmaban la presencia o ausencia de grupos funcionales. Un químico en nuestros días complementa todos esos experimentos a la resonancia, pero no los utiliza para establecer una estructura química.

Podemos clasificar los compuestos orgánicos de mil maneras, pero nosotros los agruparemos en dos grandes conjuntos: los quirales y los aquirales. Definimos a un compuesto quiral como aquel que presenta en su estructura al menos un centro estereogénico. Dentro de las moléculas aquirales, podemos destacar una muy conocida por nosotros: la aspirina, ácido acetilsalicílico (Figura 1), sustancia que prácticamente todos hemos consumido alguna vez para tratar dolores corporales. En ella no existen centros asimétricos, por lo que se considera una molécula aquiral.

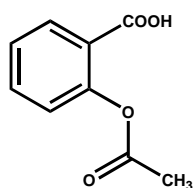


Figura 1: estructura de la aspirina, una molécula aquiral

El otro gran grupo de moléculas lo constituyen aquellas que presentan quiralidad, es decir, aquellas que tienen al menos un centro asimétrico. Consideremos una molécula sencilla, bromoclorofluorometano (Figura 2). Dependiendo de la orientación de sus átomos, podemos tener dos isómeros. Dado que tales isómeros sólo difieren en la disposición de los átomos alrededor de un centro estereogénico, tales isómeros reciben el nombre de enantiómeros. *Un enantiómero es la imagen en el espejo de una molécula quiral.*



Figura 2: los enantiómeros del bromoclorofluorometano

Cada persona tiene el mejor ejemplo de unos enantiómeros en su cuerpo. Las manos son casos perfectos de un par de enantiómeros: ambas son iguales, tienen el mismo número de

dedos y la orientación de los mismos es idéntica. Sin embargo, una es la imagen en el espejo de la otra, o lo que es lo mismo, no se pueden superponer.

Los enantiómeros tienen idénticas propiedades físicas, como punto de fusión o densidad. Sin embargo, sus propiedades químicas no necesariamente son iguales. Encontramos un ejemplo en el limoneno, un monoterpeneo que se encuentra en el limón y que es el responsable del olor de esa fruta. La Figura 3 muestra la estructura de los dos enantiómeros que posee, dependiendo de la configuración de su único centro estereogénico, el cual da el nombre a cada enantiómero dependiendo de si es "R" o "S". Mientras el enantiómero (R) tiene olor a limón, pero el (S) huele a naranja.

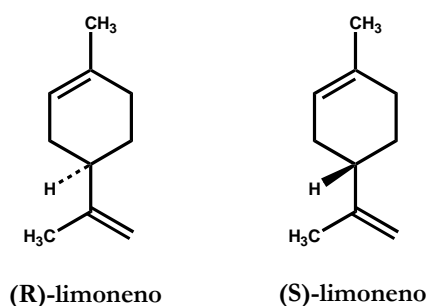


Figura 3: los dos enantiómeros del limoneno

Existe un ejemplo histórico de diferencias en las propiedades de cada enantiómero de una sustancia. Se trata de la talidomida, un fármaco que fue comercializado entre los años 1958 y 1963 como sedante y calmante de las náuseas durante los tres primeros meses de embarazo. La compañía que lo preparaba, la alemana Chemie Grünenthal, sintetizaba el fármaco y lo obtenía como una mezcla racémica, es decir, como una mezcla 1:1 de ambos enantiómeros. El problema es que el enantiómero (R) era el que tenía las propiedades sedantes, pero el (S) resultaba severamente tóxico. Esta toxicidad se manifestaba causando problemas al feto, y provocó el nacimiento de miles de bebés afectados de focomelia, una anomalía congénita caracterizada por la carencia o excesiva cortedad de las extremidades. Desde ese entonces, ningún fármaco puede ser comercializado como una mezcla racémica, a no ser que se demuestre por separado que, si uno de los enantiómeros es el activo, el otro no represente ningún riesgo para la salud.

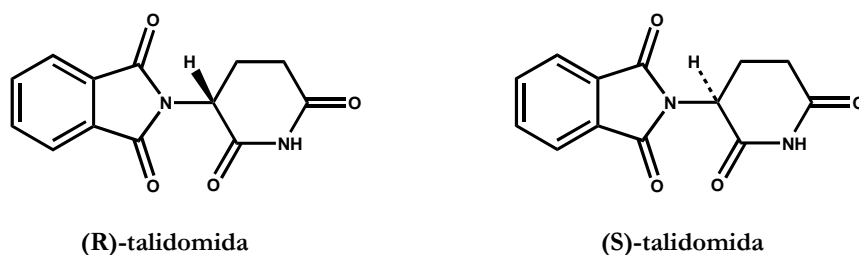


Figura 4: enantiómeros de la talidomida

Cuando uno elucida una molécula por RMN, uno puede determinar los grupos funcionales presentes en la molécula y la disposición que tienen uno respecto al otro. Esto se conoce como la **configuración relativa**. Cuando uno determina qué enantiómero es el que se ha preparado o aislado, entonces se dice que se ha determinado la **configuración absoluta**. Estos conceptos se pueden entender mejor con el siguiente ejemplo no químico. Suponga que cuatro personas van a viajar en un coche: Ana (A), Braulio (B), César (C) y David (D). Si establecemos que Ana será el conductor, Braulio el copiloto y César se sentará detrás del conductor, tendremos una situación similar a la representada en la Figura 5 izquierda.

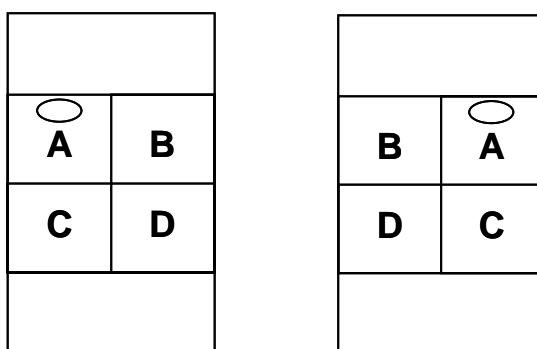


Figura 5: representación de la disposición en el coche de cuatro personas A, B, C y D

Pero, ¿quién ha dicho que ellos viajan en Lima? ¿y si lo hacen en Londres? Si el coche que ellos tuviesen fuese inglés, entonces la situación sería la mostrada en la Figura 5 derecha.

Determinar la **configuración relativa** es conocer cómo se sentarán los pasajeros en el coche: quién es el conductor, quién irá detrás de él, etc. Determinar la **configuración absoluta** consiste en saber de dónde es el coche que usarán y, por lo tanto, cómo estarán ubicados los pasajeros inequívocamente.

La RMN nos permite determinar la configuración relativa de una molécula. Los espectros de protón y carbono, así como los experimentos heteronucleares son suficientes herramientas para conocer los grupos funcionales de un compuesto y ubicarlos correctamente alrededor de una estructura. Sin embargo, los espectros de RMN de enantiómeros son idénticos: no nos sirven para distinguir uno de otro. Por ello, los químicos requieren otras técnicas para determinar la configuración absoluta de una molécula. A continuación describiremos algunas de estas técnicas para conseguir este objetivo.

Casos Generales

Mencionaremos un par de casos generales en los que se puede determinar la configuración absoluta de una molécula en función de su origen o de comparación con datos publicados previamente.

El primer caso consiste en considerar **la biogénesis** de una sustancia natural. La naturaleza es muy sabia y es una fábrica perfecta de moléculas orgánicas. Además, trabaja con una peculiaridad: fabrica un único enantiómero de cada molécula, sin importar la cantidad de centros estereogénicos que puedan haber. En un laboratorio, trabajar con esa eficiencia es imposible, al menos en nuestros días.

Cuando trabajamos con productos naturales sabemos que encontraremos un único enantiómero y allí radica el problema a resolver. Sin embargo, es importante conocer qué tipo de sustancia estamos analizando, porque la configuración absoluta de algunas familias de compuestos se puede conocer a partir de su origen. Tal es el caso de los triterpenos: moléculas con 30 átomos de carbono derivadas del isopreno. La naturaleza sólo fabrica una única serie y, por lo tanto, si establecemos la configuración relativa de un compuesto, tendremos la absoluta. Un ejemplo de un triterpeno se muestra en la Figura 6, con la estructura de la tingenona¹. La disposición de los metilos entre anillos es única por la biogénesis propia de estas sustancias.

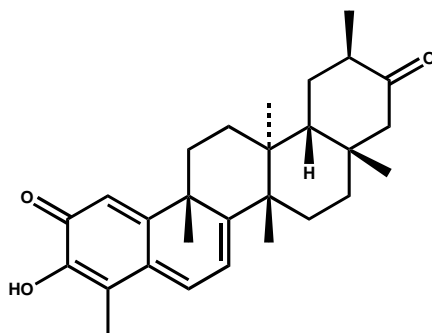


Figura 6: estructura de tingenona

Sin embargo, cuando se aísla una molécula conocida que no sea un triterpeno, se puede tener dos posibilidades: que sea la estructura que proponemos por RMN o que sea su imagen especular (enantiómero). Si se conocen los datos físicos de ambos enantiómeros, la medición de **la rotación óptica** será suficiente para discriminar uno del otro. Este método consiste en medir la desviación que produce una disolución de una muestra quiral en la luz polarizada linealmente. Dependiendo del enantiómero, desviará la luz en una cierta dirección, la cual se asociará con un signo: positivo cuando es desviada hacia la derecha y negativo cuando es desviada hacia la izquierda. El signo y la magnitud dependen de la molécula que se analiza. Normalmente las muestras se analizan en disoluciones de cloroformo o metanol.

Un ejemplo de este caso lo podemos encontrar en los alcaloides aislados de la familia Amaryllidaceae: macowina² y 8-demetilmaritidina³ poseen idéntica configuración relativa, pero son entre sí enantiómeros. La diferencia entre ellos la encontramos en el valor de rotación óptica, denotada por $[\alpha]_D$, tal como se muestra en la Figura 7. Si al elucidar una molécula llegamos a establecer dicha configuración relativa, la medición de la rotación óptica y la comparación con los datos nos dirá de qué alcaloide se trata nuestra muestra.

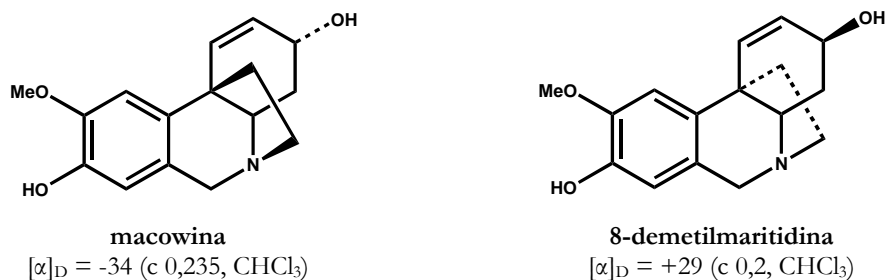


Figura 7: estructura de crinina y vittatina, alcaloides de la familia Amaryllidaceae

Difracción de Rayos X

Esta técnica consiste en hacer pasar un haz de rayos X a través de un cristal de la sustancia sujeta a estudio. El haz escinde en varias direcciones debido a la simetría de la agrupación de átomos y, por difracción, da lugar a un patrón de intensidades que puede interpretarse según la ubicación de los átomos en el cristal. Dentro de la química orgánica es, quizá, la técnica más prestigiosa para determinar la configuración absoluta, porque cuando uno presenta los rayos X de una molécula nadie puede discutir sobre esa estructura, dado que es la representación exacta de la molécula.

El principal problema que presenta esta técnica es que se requiere un cristal de la sustancia a analizar. Por ello, se debe intentar la cristalización de la sustancia y esto, a menudo, no es fácil, más aún cuando se dispone de poca cantidad de producto. Además, esta técnica no se puede aplicar a disoluciones, sistemas biológicos *in vivo*, sistemas amorfos (que son la gran mayoría dentro de los productos sólidos) o a gases.

Existen nuevos equipos para trabajar con sólidos amorfos, sin embargo, los resultados no son tan fiables como los que se obtienen de un cristal. Un ejemplo del resultado de un análisis de rayos X se muestra en la Figura 8: un nuevo alcaloide, Pancratina B, aislado de *Pancretium canariense*, planta de la familia Amaryllidaceae⁴. En ella se puede apreciar la configuración absoluta de la molécula, la cual no era fácil de determinar debido a la presencia de un alcohol terciario.

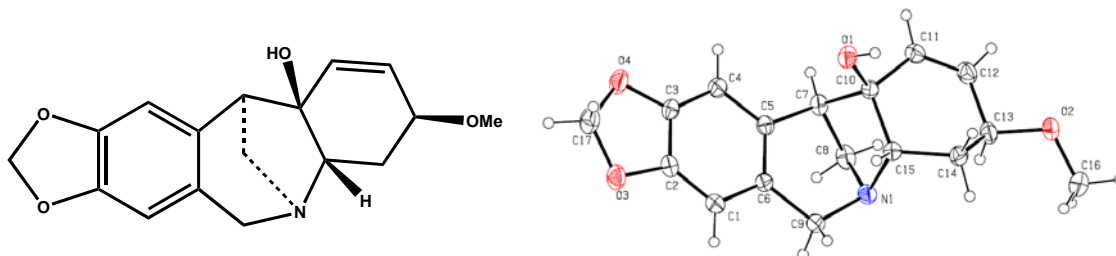


Figura 8: estructura de pancratina B, determinada mediante difracción de rayos X

Resonancia Magnética Nuclear

Hemos mencionado las virtudes de la RMN para determinar la configuración relativa, pero su inutilidad para asignar la absoluta. Sin embargo, en ciertos casos se puede asignar por RMN la configuración absoluta, sólo que dependerá de los grupos funcionales presentes en la sustancia a estudiar. Riguera ha publicado un método muy sencillo y eficaz para determinar la configuración absoluta de alcoholes secundarios⁵. El método consiste en esterificar el alcohol con un ácido carboxílico quiral. Luego, se mide el espectro de ¹H-RMN del éster antes y después de añadir al tubo de resonancia 100 mg de una sal de bario. Las variaciones entre un espectro y otro nos darán información del alcohol, permitiéndonos establecer la configuración absoluta del mismo.

El ácido a utilizar es ácido fenilmetoxiacético (MPA), y puede utilizarse cualquiera de los dos enantiómeros (R ó S). Al añadir iones Ba²⁺ al éster del ácido fenilmetoxiacético, el metal forma un complejo con el oxígeno del carbonilo y el oxígeno del metoxilo, originando una especie con conformación rígida, en la que el hidrógeno y el fenilo del éster quedan hacia lados opuestos, tal como se representa en la Figura 9. Esta disposición originará cambios en el espectro de ¹H-RMN dependiendo de los grupos del resto de la molécula que queden enfrentados al hidrógeno o al fenilo.

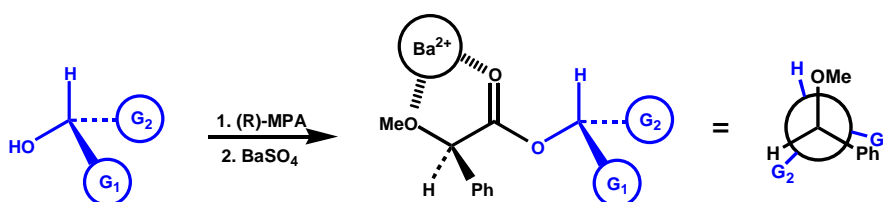


Figura 9: formación del éster del ácido (R)-MPA y acomplejamiento con iones bario.

El desplazamiento de las señales en el espectro ¹H-RMN de los hidrógenos de G₁ y G₂ indicarán cual de ellos está enfrentado al fenilo. Aquel sustituyente enfrentado al fenilo (G₁ en el ejemplo) tendrá sus hidrógenos a campo más bajo, mientras que el sustituyente enfrentado al hidrógeno (G₂ en el ejemplo) tendrá sus hidrógenos a campo más alto. En caso de observarse lo contrario, la otra disposición será la correcta.

Un ejemplo de la aplicación de este método es la determinación de la configuración absoluta de los cuatro lignanos mostrados en la Figura 10⁶. Mediante RMN se determinó que el hidroxilo y el éter adyacente tienen disposición eritro, es decir, se encuentran hacia lados opuestos. El método fue aplicado y permitió la identificación de la configuración absoluta de dichas moléculas como la mostrada en la Figura.

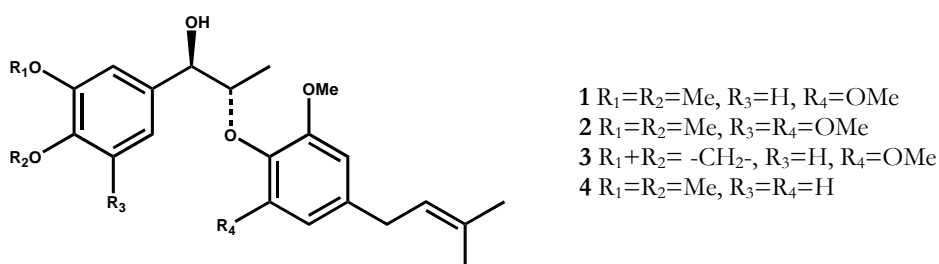


Figura 10: configuración absoluta de 4 lignanos, determinada por el método de Riguera

Dicroísmo Circular

El dicroísmo circular (DC) es una forma de espectroscopia basada en la diferencia entre la absorción de la luz polarizada circularmente. Habíamos mencionado la luz polarizada lineal en el caso de la rotación óptica. En el caso del DC lo que se utiliza es luz polarizada circularmente, es decir, el campo eléctrico tiene una longitud constante pero rota según la dirección de propagación, formando una especie de hélice en el espacio. Dependiendo de la forma de la hélice podemos tener luz polarizada hacia la izquierda (levógira) o hacia la derecha (dextrógira). En el caso de emitir los dos tipos de luz, el resultado de ambas energías no es nulo, sino que producen un vector resultante en un plano. Sin embargo, si nosotros irradiamos luz polarizada circularmente, tanto dextrógira como levógira, sobre una disolución de una sustancia quiral, la muestra absorberá más sólo una de ellas, dando lugar a una desviación del plano del vector resultante. La **Figura 11** muestra ambos casos. La figura de la izquierda muestra los dos tipos de luz polarizadas circularmente, dextrógira y levógira, con igual magnitud pero con rotación diferente, que al sumarse generan un único vector en un solo plano. La figura de la derecha muestra el resultado de irradiar esa luz sobre una muestra quiral que absorbe luz dextrógira: ahora las magnitudes de los dos tipos de luz no son iguales, dando lugar a un vector resultante que ya no está en un plano, sino que gira formando una elipse. Esta diferencia se conoce como Dicroísmo Circular.

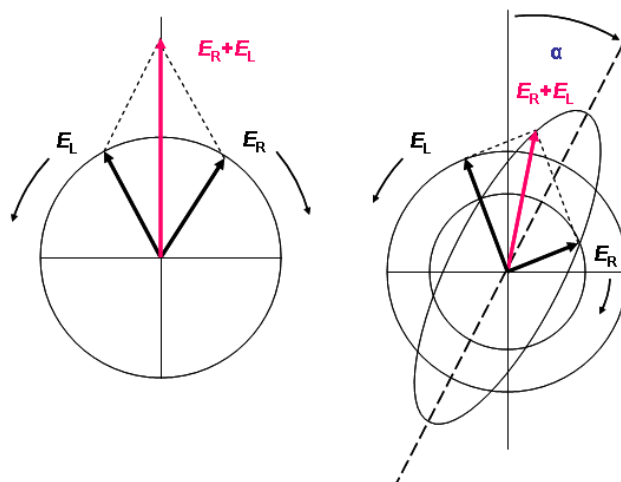


Figura 11: luz polarizada circularmente. E_L : levógira; E_R : dextrógira.

Al irradiar una disolución de una sustancia quiral con este tipo de luz polarizada, un tipo de luz será absorbida con mayor intensidad que la otra, dando lugar a un espectro de forma bisignado (Figura 12). Esta luz normalmente se mide en la región ultravioleta (180-350 nm), y la curva obtenida a mayor longitud de onda se denomina "Efecto Cotton".

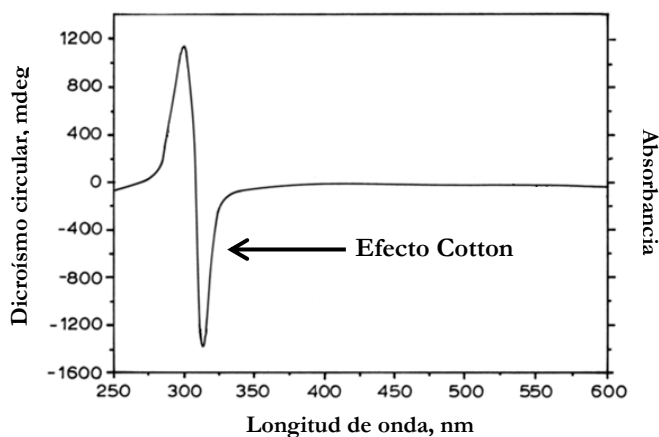


Figura 12: ejemplo de un espectro obtenido por DC.

Uno de los métodos más utilizados para realizar la medición por DC es el de quiralidad del excitón. Para esto, se requiere que la molécula que vamos a analizar presente al menos dos grupos con alto coeficiente de extinción molar, es decir, grupos que absorban intensamente energía en la región ultravioleta. Ejemplos de estos grupos son los benzoatos sustituidos. Dependiendo de la forma del efecto Cotton que se obtenga (si está hacia arriba, positivo, o si está hacia abajo, negativo) se puede determinar la disposición que tienen estos dos grupos dentro de la molécula. Un ejemplo de este método se presenta en la Figura 13, al aplicar el DC para determinar la configuración absoluta de una dihidrofurancumarina, de interés por presentar actividad citotóxica e inhibitoria de acetilcolinoesterasa⁷. Aprovechando los dos grupos fenilos de su estructura (tienen coeficiente de extinción molar altos) se midió el espectro de DC obteniéndose una efecto Cotton positivo.

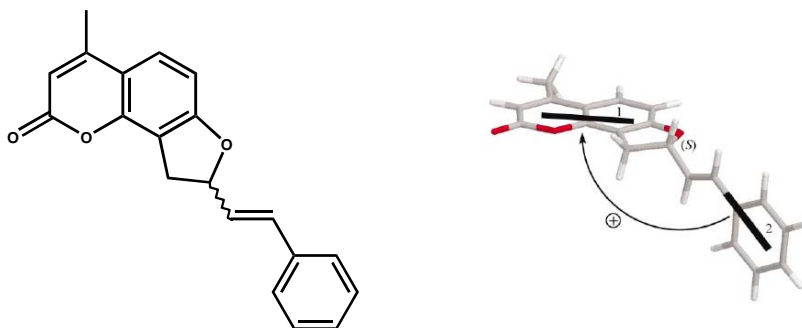


Figura 13: dihidrofurancumarina analizada por DC utilizando el método de quiralidad del excitón.

El obtener un efecto Cotton positivo debe interpretarse de la siguiente manera: analizando el modelo molecular, se establecen dos planos, de manera que cada uno atraviese a cada cromóforo responsable del DC. Observando ambos planos, se coloca horizontal aquel plano que quede más cerca del espectador respecto del centro asimétrico que se analiza. Luego, se debe llegar del otro plano hacia el que está horizontal realizando un giro recorriendo la menor distancia. Eso es lo que se observa en el ejemplo de la Figura 13: el efecto Cotton positivo hace llegar de uno a otro siguiendo un sentido horario, y la única posibilidad es que la molécula tenga la disposición mostrada. De esta forma, se estableció inequívocamente que el centro asimétrico tiene configuración (S).

Otro ejemplo del uso de esta técnica lo encontramos en la determinación de la configuración absoluta de gimnocina-B, un políéter de origen marino con muchos centros asimétricos⁸. Para determinar la configuración absoluta se utilizó DC: aprovechando la presencia de los hidroxilos libres en las posiciones 10 y 37, se introdujeron grupos con coeficientes de extinción molar altos. Los elegidos fueron derivados de porfirinas. Al utilizar el método de quiralidad del excitón, se obtuvo un espectro con efecto Cotton positivo, lo cual llevó a proponer la configuración absoluta de este metabolito secundario como la mostrada en la Figura 14, es decir, aquella con configuración (S) tanto en la posición 10 como 37.

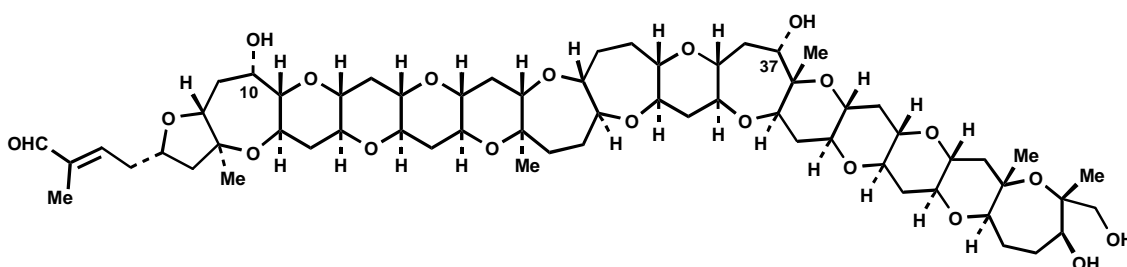


Figura 14: estructura de gimnocina-B

Dicroísmo Circular Vibracional

Esta técnica, conocida desde 1997, es una de las más sencillas debido a que presenta ciertas ventajas respecto a las otras expuestas. Se realiza en disolución, por lo que no se necesitan cristales, como ocurre con la difracción de rayos X. Tampoco se requiere una alta pureza enantiomérica, así como una excesiva purificación del producto (siempre y cuando las posibles impurezas no sean quirales). La técnica es similar a la descrita para el dicroísmo circular, sólo que en este caso se utiliza energía en el rango infrarrojo, por ello el término de vibracional. Esta pequeña diferencia permite analizar prácticamente a todas las moléculas orgánicas, dado que por DC sólo se podían analizar moléculas que presenten cromóforos. Sin embargo, al analizarlas por IR, no es necesaria la presencia de ningún grupo funcional en particular.

El método consiste en comparar el resultado experimental de la medición del dicroísmo circular vibracional (DCV) de una molécula quiral, con los resultados teóricos obtenidos para distintas configuraciones de la misma molécula. Aquel resultado que coincida nos dará la configuración

absoluta de nuestro compuesto. Diversos programas computacionales pueden utilizarse para realizar los cálculos teóricos, siendo el programa Gaussian el más utilizado. Estos cálculos consisten en minimizar la estructura de las posibles conformaciones de la molécula, eligiendo aquellas que poseen la más baja energía. La técnica es más sencilla al trabajar en la región infrarrojo, dado que sólo se consideran vibraciones moleculares. De trabajarse en la región UV, sería necesario considerar todas las posibles transiciones electrónicas, lo cual daría lugar a cálculos teóricos demasiado extensos.

Esta técnica ha sido utilizada para determinar la configuración absoluta de muchos productos naturales, de los que normalmente se posee poca cantidad. A continuación se describen algunos ejemplos.

La alternamina es una cumarina aislada de *Murraya alternans*, y es un antídoto contra el veneno de serpiente⁹. Cuando fue aislada, tres posibles estructuras fueron propuestas por RMN (A, B y C), tal como se muestra en la Figura 15.

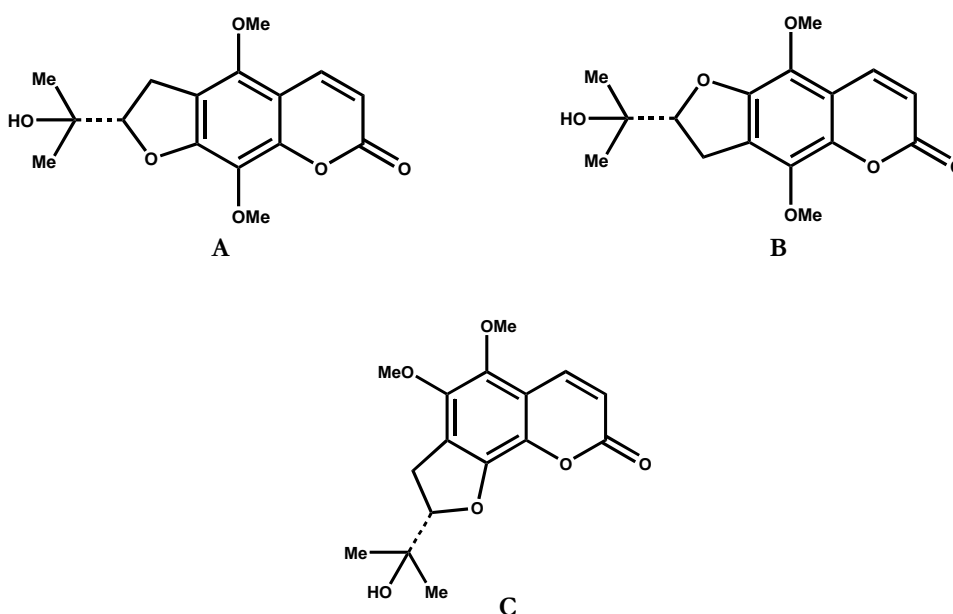
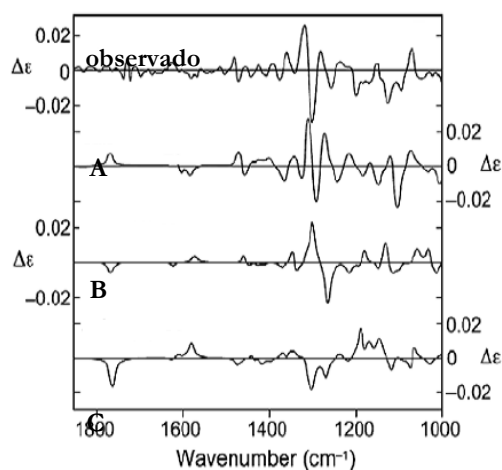


Figura 15: estructuras posibles de alternamina, basadas en RMN

Al realizar los cálculos teóricos, se obtuvieron tres espectros de DCV, correspondientes a cada una de las estructuras propuestas. Luego de medir el espectro de DCV de la muestra, se obtuvo un espectro experimental tal como se muestra en la Figura 16.



Número de onda (cm⁻¹)

Figura 16: comparación de los espectros de DCV calculados con el observado.

Por comparación, vemos que el espectro experimental coincide con aquél calculado para la estructura A, por lo que se establece que esa es la correcta. De esta forma, no sólo se ha establecido la estructura correcta, sino que se ha confirmado la configuración (S) del centro asimétrico.

También se ha utilizado esta técnica para establecer la configuración de estructuras más complejas, como la de schizozygina, un alcaloide aislado de *Schizozygia caffaeoides*¹⁰. Mediante DCV se estableció la configuración de todos sus centros asimétricos, resultando ser (2R, 7S, 20S, 21S)-schizozygina.

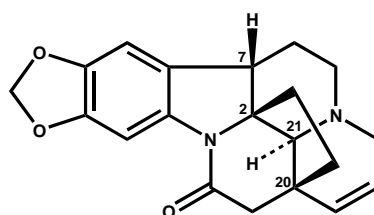


Figura 17: estructura de schizozygina, determinada mediante DCV.

Una excelente revisión sobre esta técnica ha sido publicada recientemente por Nafie¹¹.

Resumen

Los químicos orgánicos tienen diversas técnicas a disposición para determinar la configuración absoluta de una molécula. Establecer cuál es el enantiómero que se ha aislado (si es un producto natural) o preparado (mediante síntesis orgánica) es fundamental si es que tales sustancias se pretenden evaluar como posibles fármacos. La elección de una determinada técnica dependerá del tipo de muestra que se tenga, por ejemplo, para sólidos cristalinos la difracción de rayos X sería la preferida. En cambio, sustancias con grupos funcionales con

coeficientes de extinción molar altos, pueden ser evaluados por dicroísmo circular. Todos estos métodos complementan a la resonancia magnética nuclear, que se presenta como la técnica más fiable para elucidar moléculas orgánicas, pero que no sirve para la determinación de configuraciones absolutas.

Agradecimientos

A los Doctores Ángel Gutiérrez Ravelo y Ana Estévez Braun (Universidad de La Laguna).

Referencias

1. Likhitwitayawuid, K.; Bavovada, R.; Lin, L.; Cordell, G. *Phytochemistry* **1993**, *34*(3), 759-763.
2. Nair, J.; Machocho, A.; Campbell, W.; Brun, R.; Viladomat, F.; Codina, C.; Bastida, J. *Phytochemistry* **2000**, *54* (8), 945-950.
3. Hohmann, J.; Forgo, P.; Molnar, J.; Wolfard, K.; Molnar, A.; Thalhammer, T.; Mathe, I.; Sharples, D. *Planta Med.* **2002**, *68*, 545-457.
4. Cedron, J.C.; Oberti, J.; Estévez-Braun, A.; Ravelo, A.G.; Del Arco-Aguilar, M.; López, M. *Tetrahedron* **2008**, enviado.
5. Seco, J.; Quiñoá, E.; Riguera, R. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 17-117.
6. Kenya, K.; Kurtán, T.; Kiss-Szikszai, A.; Juhász, L.; Antus, S. *ARKIVOC* **2004**, *8*, 72-78.
7. Pescitelli, G.; Berova, N.; Xiao, T.; Rozhkov, R.; Larock, R.; Armstrong, D. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 186-190.
8. Tanaka, K.; Itagaki, Y.; Satake, M.; Naoki, H.; Yasumoto, T.; Nakanishi, K.; Berova, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9561-9570.
9. Min, H.; Aye, M.; Taniguchi, T.; Miura, N.; Monde, K.; Ohzawa, K.; Nikai, T.; Niwa, M.; Takaya, Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 6155-6158.
10. Stephens, P.; Pan, J.; Devlin, F.; Urbanova, M.; Hajicek, J. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2508-2524.
11. Nafie, L. *Nat. Prod. Comm.* **2008**, *3*, 451-466.