



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

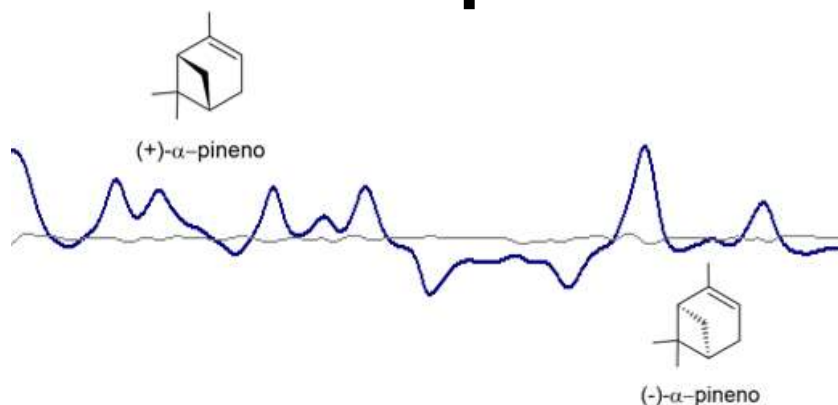
**Establecimiento de una
estrategia para la
determinación del exceso
enantiomérico de una
disolución problema**

Alumno/a: Quesada Rascón, Antonio

Octubre, 2021

Trabajo Fin de Grado

Establecimiento de una estrategia para la determinación del exceso enantiomérico de una disolución problema



Quesada
Rascón

Alumno: Quesada Rascón, Antonio

Jaén, Octubre, 2021

ÍNDICE:

1. RESUMEN/ABSTRACT

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Definición del término quiralidad

2.2. Conceptos básicos

2.3. Importancia de la quiralidad

2.4. Dicroísmo circular vibracional (VCD)

2.4.1. Fundamentos

2.4.2. Ventajas de la espectroscopía VCD

2.4.3. Instrumentación

2.4.4. Espectros VCD

2.4.5. Usos de la espectroscopía VCD

3. OBJETIVOS

4. DETALLES EXPERIMENTALES

4.1. Muestras y disolventes

4.2. Instrumental, equipo y software.

5. RESULTADOS

5.1. Muestra problema e hipótesis de campo

5.2. Espectros experimentales obtenidos

6. DISCUSIÓN

7. CONCLUSIÓN

8. BIBLIOGRAFÍA

1. RESUMEN

La espectroscopía de dicroísmo circular vibracional, VCD, es una técnica utilizada en fases tempranas del desarrollo de fármacos que se emplea para la determinación de la configuración absoluta y el exceso enantiomérico de productos finales e intermedios de reacción. En este estudio, se ha establecido una estrategia que implica el uso del VCD y permite determinar el exceso enantiomérico de una mezcla problema de los dos enantiómeros del α -pineno. Para este fin, se ha explorado el uso de las variaciones de ciertas propiedades (altura, área y anchura a media altura) de distintas bandas experimentales observadas en los espectros de mezclas de la misma especie de composición perfectamente conocida, como indicadoras del cambio en las proporciones relativas de ambos enantiómeros. Se concluye que tanto la altura de pico como el área resultan parámetros convenientes, arrojando valores similares para el exceso enantiomérico.

ABSTRACT

Vibrational circular dichroism spectroscopy, VCD, is a technique used in the early stages of drug development to determine the absolute configuration and enantiomeric excess of final and intermediate products. In this study, a strategy based in the use of VCD spectroscopy, has been established to determine the enantiomeric excess in a problem mixture containing the two enantiomers of α -pinene. For this task, we have explored the potential use of the variations in certain properties (height, area and width at half height) of selected experimental bands observed in the spectra of mixtures of known composition, as indicators of the change in the proportion of both enantiomers. It is concluded that both the peak height and the area are convenient indicators, yielding similar values for the enantiomeric excess.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Definición del término quiralidad

El término quiral se deriva del griego $\kappaείρ$ (kheir), que significa “mano”. Fue construyéndose y puliéndose a partir de los años y de las investigaciones de científicos notables. Aunque el filósofo Immanuel Kant fue quien puso la primera piedra con sus disertaciones sobre objetos idénticos, pero no superponibles. Y años después con los estudios del químico Louis Pasteur (1822-1895) sobre la actividad óptica de cristales de tartrato y la acuñación del término disimetría molecular, no será hasta años posteriores que se abordaría la quiralidad desde la visión estructural de las moléculas que componen las sustancias.

Los primeros estudios relevantes que encontramos sobre este tema son por parte de los químicos Joseph-Achilles Le Bel (1847-1930) y Jacobus Henricus Van't Hoff (1852–1911) siendo los de este último los que adquirirían más relevancia debido al enfoque realista de su en contraposición con la de su compañero que tenía un punto de vista más abstracto. Ambos desarrollaron sus trabajos de forma separada, pero basándose en los datos recogidos años antes por el químico Johannes Wislicenus (1835-1902) el cual había descubierto durante sus estudios del ácido láctico lo que él llamaría: “isómeros geométricos”, es decir, dos sustancias con propiedades físicas diferentes, pero con idéntica estructura química. (Mauskopf *et al.*, 2006)

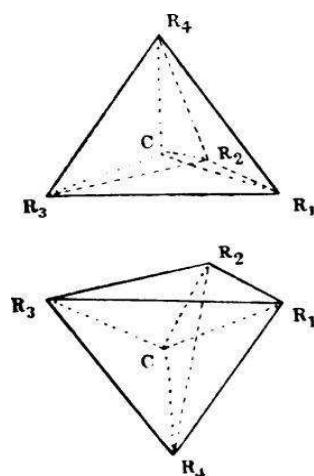


Figura 2.1 Dibujo de Van't Hoff de dos enantiómeros. (Mauskopf *et al.*, 2006)

Van't Hoff postuló un modelo estructural para los isómeros. El químico neerlandés propuso que un carbono con cuatro sustituyentes univalentes diferentes presentaría una forma tetraédrica en el espacio, y solo habría dos formas tetraédricas posibles para la disposición de los sustituyentes de ese carbono.

Además de detallar su visión de enantiómeros en carbonos asimétricos también estableció las estructuras de carbonos insaturados con dobles y triples enlaces.

Luego se concluiría que la quiralidad no es exclusiva de los compuestos cuyo centro es un carbono, atribuyéndose estos descubrimientos a los estudios en química de la coordinación sobre amidas metálicas de la mano de Alfred Werner. (Mauskopf *et al.*, 2006)

La definición de quiralidad más próxima a la de nuestros días será establecida por el Premio Nobel de Química, Vladimir Prelog y estará fundamentada en los elementos de simetría que presentan ciertas moléculas. En palabras del propio Prelog:

“Un objeto es quiral si no puede ponerse en congruencia con su imagen en el espejo mediante traslación y rotación. Tales objetos carecen de elementos de simetría que incluyen reflejo: planos especulares, centros de inversión o ejes de ejes de rotación”. (Prelog, 1975)

Prelog puso en la mesa que una molécula quiral o aquiral no solo se rige por la presencia de un carbono asimétrico como defendía Van't Hoff, si no que la presencia de ciertos elementos de simetría puede llegar a definir si una molécula presenta quiralidad. Prelog defendía que para ser quiral un compuesto no debe presentar ejes impropios entre sus operaciones de simetría, siendo un eje impropio una operación de simetría que consiste en la rotación de $360^\circ/n$ alrededor de un eje, seguida de una reflexión en un plano perpendicular a dicho eje, dejando a la molécula indistinguible. Prelog sentó la idea de que la simetría de toda la molécula es lo que definía su quiralidad, por ello y sus trabajos en estereoquímica sería galardonado con Premio Nobel de Química en 1975.

Como resultado de años de investigaciones y trabajos, la quiralidad quedó definida como la cualidad de un objeto de no ser superponible con su imagen especular. Por

el contrario que un objeto sea aquiral significara que es superponible e indistinguible de su imagen especular. El ejemplo más sencillo para ilustrar este concepto, son las manos. Nuestra mano izquierda tiene como imagen especular nuestra mano derecha, si juntamos ambas, una encima de la otra, vemos que no son superponibles. En cambio, si las enfrentamos palma con palma vemos, desde nuestra vista, que coinciden, es decir que una es el reflejo de la otra y viceversa, pero siguen siendo manos diferentes.

La quiralidad puede darse en moléculas de diferente tamaño, desde moléculas tan pequeñas como un carbono tetraédrico hasta moléculas de mayor tamaño y cierta complejidad como pueden ser proteínas. Por ello podemos hablar de tres tipos de quiralidad:

- Aquella causada por centros quirales. El termino centro quiral se usa para designar un carbono asimétrico, es decir, un carbono con cuatro sustituyentes diferentes y que presenta una hibridación sp^3 . Pero no solo el átomo de carbono puede ser un estereocentro, elementos muy similares como el Si o Ge también pueden serlo, aunque son casos menos frecuentes en la naturaleza.
- Atropoisomería. Se produce cuando una molécula presenta sustituyentes voluminosos que originan un impedimento estérico. Este impedimento por parte de los sustituyentes imposibilita que enlaces sigma específicos de la molécula puedan rotar impidiendo la interconversión entre confórmeros, lo cual produce un par de enantiómeros. Esta isomería da origen a los ejes quirales. Para ilustrar el ejemplo tenemos la **Figura 2.2**. Lo que vemos es que esta isomería no tiene por qué tener presentes centros quirales, pero lo que si origina son ejes quirales.

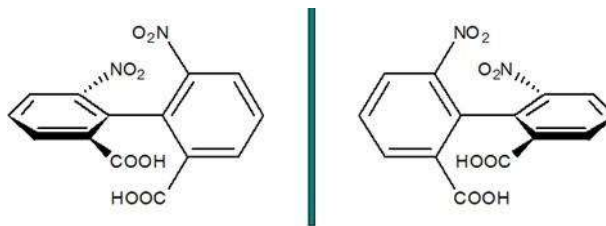


Figura 2.2 Conformaciones de un derivado del bifenilo.

- Quiralidad supramolecular. Es propia de moléculas de un tamaño considerable que son el resultado de la unión de estructuras más básicas, originando una estructura supramolecular que puede presentar su propia imagen especular y actividad óptica. Como ejemplo tenemos la quiralidad helicoidal que presentan ciertos polímeros, estos poseen lo que se denomina como, hélices P, que expresan su giro hacia la derecha y en contraposición se encuentra, las hélices M, que el sentido de su giro es hacia la izquierda.

2.2. Conceptos básicos

La IUPAC define a los **enantiómeros** como “*un par de entidades moleculares que son imágenes especulares entre sí y no superponibles entre sí*”. (IUPAC, 2019)

Los enantiómeros presentan las mismas propiedades físicas, a excepción de la interacción de cada isómero con la luz polarizada en un plano. Si una molécula desvía el plano de la luz hacia la izquierda se la conoce como **levógira** mientras que su enantiómero, que desviará el plano de la luz polarizada hacia la derecha, será **dextrógira**. A esta propiedad se le denomina **actividad óptica**. Los enantiómeros también presentan las mismas propiedades químicas, excepto en la forma de interactuar con moléculas que presentan, a su vez, quiralidad. (Rielh, 2010)

Centrando la discusión en el caso de la quiralidad molecular causado por la presencia de carbonos asimétricos, establecemos que la forma más común en química de nombrar a un carbono asimétrico es usando las denominaciones R (*rectus*) y S (*sinister*) que hace referencia a como se realiza el giro, si a favor de las agujas del reloj o en sentido contrario, respectivamente, a la hora de conectar los grupos o átomos unidos al carbono asimétrico por orden de prioridad según las reglas de Cahn-Ingold-Prelog. Siendo el de mayor prioridad el átomo con mayor número atómico y

siendo siempre el más bajo el hidrógeno. Para ilustrar esta nomenclatura tenemos la siguiente imagen.

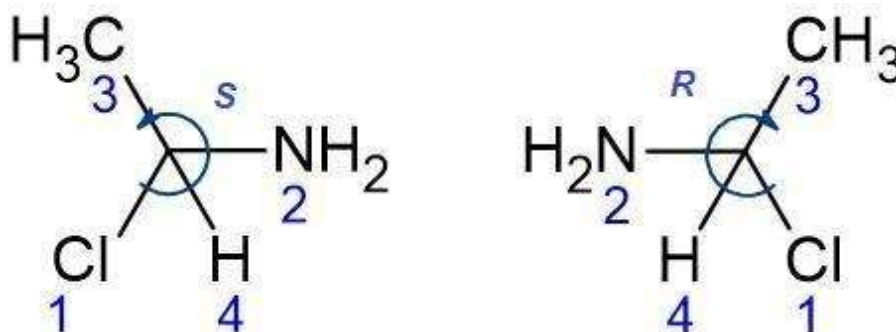


Figura 2.3 Esquema de nomenclatura R y S para una molécula tetraédrica y su enantiómero.

Se dice que un carbono asimétrico dado tiene, por tanto, **configuración R** o **S**. Por su parte, se habla de **diasterómeros** cuando nos referimos entidades moleculares que tampoco son imágenes superponibles entre sí, pero que no son imágenes especulares. Los diasterómeros ocurren en moléculas con más de un centro quiral en las que cabe más de una posible combinación entre las configuraciones de cada uno de los mismos. Así, una molécula con dos centros quirales con la misma configuración, por ejemplo, SS, tendrá en la molécula RR a su enantiómero, mientras que la molécula RS será otro diasterómero de la misma (y existirá otro denominado SR imagen especular de este último). Por tanto, caben 2^n diasterómeros posibles para una molécula con “n” centros quirales. Se conoce la **configuración absoluta** de una especie cuando se conoce la configuración R o S de todos sus centros quirales.

Cabe mencionar que no existe relación a priori entre el carácter dextrógiro o levógiro de una muestra y la configuración R o S de sus centros quirales.

Una mezcla que presenta a partes iguales (50:50), los dos isómeros ópticos de un compuesto, recibe el nombre de **mezcla racémica** (o racemato). Cada uno de los enantiómeros de la mezcla provocará la rotación del plano de polarización de la luz en sentido opuesto, por lo que, al ser una mezcla de igual proporción de ambos enantiómeros la rotación se anulará y la mezcla será **ópticamente inactiva**.

Si en una mezcla alguno de los dos enantiómeros se encuentra en una proporción mayor que su contrario diremos que existe un **exceso enantiomérico**. El exceso enantiomérico se calcula mediante:

$$\%EE = \frac{(C_A - C_B)}{(C_A + C_B)} \times 100$$

Donde C_A y C_B son las concentraciones molares de ambos enantiómeros. Si trabajamos con valores en porcentaje la ecuación se reduce a una resta.

$$\%EE = C_A(\%) - C_B(\%)$$

2.3. Importancia de la quiralidad

Si bien sabemos que dos enantiómeros presentan las mismas propiedades físicas salvo su capacidad de interacción con la luz polarizada, lo que cabe destacar son las diferencias entre ambos en lo que a su actividad biológica, toxicológica o incluso metabólica se refiere. Estas diferencias se deben al distinto comportamiento químico que dos enantiómeros presentaran al interactuar ante una determinada diana biológica (que generalmente son quirales). La estereoespecificidad de estas interacciones puede verse reflejada en propiedades organolépticas de determinadas especies. Por ejemplo, en la carvona, su enantiómero R emite un olor a hojas de menta verde mientras que su forma S huele a semillas de alcaravea. Igualmente, el glutamato de sodio, que es usado en cocina, es la sal sódica del ácido L-glutámico, mientras que la forma D no presenta sabor. (Rielh, 2010)

Especialmente relevante es el caso de los fármacos y su actividad biológica. Por ejemplo, el ibuprofeno es un conocido antiinflamatorio no esteroideo cuya forma comercial es una mezcla racémica aun cuando solo el enantiómero S presenta actividad antiinflamatoria, siendo el enantiómero R inocuo. (Rielh, 2010)

Este no es siempre el caso, hay fármacos quirales en los que uno de sus enantiómeros no solo no presenta la actividad biológica deseada.

Este es el caso de la talidomida, que se comercializó a mediados de los años 50 del siglo pasado como inhibidor de náuseas para mujeres en estado de gestación. El fármaco fue comercializado como una mezcla racémica conteniendo sus dos isómeros ópticos, pero, mientras que la R-talidomida produce un efecto sedante y calma las náuseas, la S-talidomida tenía efectos teratogénicos. Su distribución sin ningún tipo

de control produjo un elevado número de defectos congénitos en recién nacidos cuyas madres consumieron el fármaco. (Rielh, 2010)

La talidomida fue el precedente que llevo a las agencias de salud y farmacéuticas a replantearse la comercialización de mezclas racémicas como fármacos sin que presentaran ni ningún control de la actividad de los isómeros que la componen. Aunque es verdad que hoy en día se siguen comercializando mezclas racémicas en fármacos, como es el caso que hemos hablado antes el del ibuprofeno, desde hace más de 20 años la FDA (acrónimo de Food and Drugs Administration, entidad de los Estados Unidos encargada de las regulaciones concernientes a alimentos y fármacos) requiere, antes de autorizar la comercialización de un fármaco quiral, el aislamiento y completa caracterización de las propiedades farmacológicas de los dos enantiómeros. (Nguyen *et al*, 2006)

Por este motivo, en los últimos años se ha puesto mucho esfuerzo en el desarrollo de técnicas experimentales que permitieran determinar de forma precisa tanto la configuración absoluta como la posible concurrencia de excesos enantioméricos y en último caso su cuantificación y la resolución de los mismos. Entre las técnicas más ampliamente extendidas para este fin destacan: la cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) con columnas de selección quiral, o técnicas híbridas; HPLC junto con dicroísmo circular electrónico (HPLC-CD), entre otras. (Leung *et al.*, 2011)

También se han utilizado cristales líquidos nemáticos y colestéticos, usando mediciones espectroscópicas, para la determinación del exceso enantiomérico de forma visual. Las fases nemáticas están compuestas de moléculas aquirales. Cuando a esta se le añade un dopador quiral, se genera una fase colestérica, que es una fase nemática quiral en sí misma. Las propiedades ópticas de los cristales líquidos dependen del exceso enantiomérico del dopador quiral, entonces si se miden estas propiedades se podrá determinar el exceso enantiomérico. (Leung *et al.*, 2011)

La termografía infrarroja ha sido de ayuda para la determinación del exceso enantiomérico mediante el uso de cámaras fotorvoltaicas de infrarrojos con detectores de matriz de plano focal. Estas máquinas producen imágenes donde se puede observar el calor emitido durante las reacciones y en donde la radiación infrarroja se

representa mediante un color. Las muestras se someten a reacciones exotérmicas. Para controlar, se toman como valores de referencia las mezclas individuales enantiomericamente puras y racémicas de los analitos, a los que se le añade un selector quirral. Este selector quirral se usará para controlar la reactividad que nos dé con la muestra problema a la que le calcularemos su pureza enantiomérica. (Leung *et al.*, 2011)

Unos de los métodos también utilizados ha sido el MIP (acrónimo en inglés de Polímeros Impresos Molecularmente). Este método es altamente selectivo para un enantiómero ya que se da un mecanismo de llave-cerradura entre los polímeros que presentan una estructura tridimensional y las cavidades de las moléculas objetivo. (Leunget *al.*, 2011)

Debido a su quiralidad inherente y su alta selectividad, las enzimas y anticuerpos también se usan para el cálculo del exceso enantiomérico. El proceso en el que se utilizan consiste en elegir dos enzimas o anticuerpos, uno presenta una predilección por uno de los enantiómeros por lo que se podrá calcular la concentración del enantiómero al que se une, mientras que la otra enzima o anticuerpo se une a ambos enantiómeros por lo que podremos calcular la concentración total. (Leung *et al.*, 2011)

Los métodos comentados han sido de gran ayuda para la determinación del exceso enantiomérico, pero presentan limitaciones. Desde los tiempos de elución de las técnicas cromatográficas, la derivación de analitos o sustratos que requieren los métodos con cristales líquidos, el método de polímeros impresos molecularmente requiere conocimientos previos en síntesis de polímeros y analitos cromogénicos y las técnicas de enzimas y anticuerpos pecan de ser específicas para un solo analito. Los protocolos que siguen estas técnicas suelen estar compuestos de varios pasos de derivación.

Debido a todos estos inconvenientes, cada vez es más frecuente el uso para estos fines de la espectroscopía de dicroísmo circular vibracional (VCD por su acrónimo en inglés, Vibrational Circular Dichroism), cuyas características serán descritas a continuación.

2.4. Dicroísmo circular vibracional (VCD)

2.4.1. Fundamentos

El fundamento de la técnica VCD reside en la diferencia de absorbancia entre la luz IR polarizada circularmente en sentido horario y en sentido antihorario, que presentará una muestra quiral mientras experimenta una vibración molecular.

$$\Delta A = A_L(\nu) - A_R(\nu)$$

En muestras que no presentan quiralidad las componentes de la luz circularmente polarizada en sentido horario y antihorario se absorberán por igual, por lo que la diferencia entre ellas será cero. En cualquier otro caso, la delta de absorbancia mostrada en la ecuación anterior tendrá valores distintos de cero, pudiendo estos ser positivos o negativos dependiendo de la vibración en cuestión y, por tanto, de la zona de la región IR en la que nos encontremos.

Así, mientras que si observamos los espectros infrarrojos (IR) de dos enantiómeros vemos que son idénticos y superponibles, sus respectivos espectros VCD (que estarán formados por bandas con valores de ΔA positivas o negativas distribuidas por todo el rango de medida) serán imágenes especulares.

2.4.2. Ventajas de la espectroscopía VCD

La técnica VCD suma a la estereo-sensibilidad de otras técnicas análogas como el ECD (de su acrónimo en inglés Electronic Circular Dichroism, es decir, Dicroísmo Circular Electrónico) la especificidad estructural de la espectroscopia IR características que la convierten una herramienta potente para llevar a cabo la determinación de la configuración absoluta de muestras quirales, así como la elucidación del exceso enantiomérico en productos de reacción.

Entre sus ventajas destaca el hecho de que las muestras no requieran de derivación química para poder hacer mediciones. Tampoco es necesario la presencia de cromóforos (a diferencia de la anteriormente mencionada ECD), ya que está basada en la espectroscopia IR, todas las moléculas serán activas en el rango de trabajo.

Permite trabajar con compuestos en estado líquido (disolución) y, también, aunque con ciertas dificultades, en estado sólido. Además, supera a otras técnicas para la

caracterización de la configuración absoluta de sólidos, como la SC-XRD (acrónimo en inglés de Single Crystal X-Ray Diffraction, Difracción de Rayos X de Monocristales) en el hecho de que no es necesario la obtención de monocristales, no siempre asequibles a la experimentación.

Requiere de concentraciones entre 10 y 100 mM para mediciones, lo que se traduciría en 2-5 mg de muestra para medidas en disoluciones de volúmenes entre 100 y 200 microlitros. Es posible la recuperación de la muestra después de la medición.

Los disolventes que se requieren no deben establecer interacciones fuertes con la muestra y tampoco deben presentar una absorción intensa en rango de interés de la región media del espectro infrarrojo. Ejemplos de este tipo de disolventes lo constituyen el cloroformo- d_1 ($CDCl_3$), el tetracloruro de carbono (CCl_4), el acetronitrilo- d_3 ($ACN-d_3$), el dimetilsulfoxido- d_6 y mezclas de estos disolventes. (Merten *et al.*, 2019)

2.4.3. Instrumentación

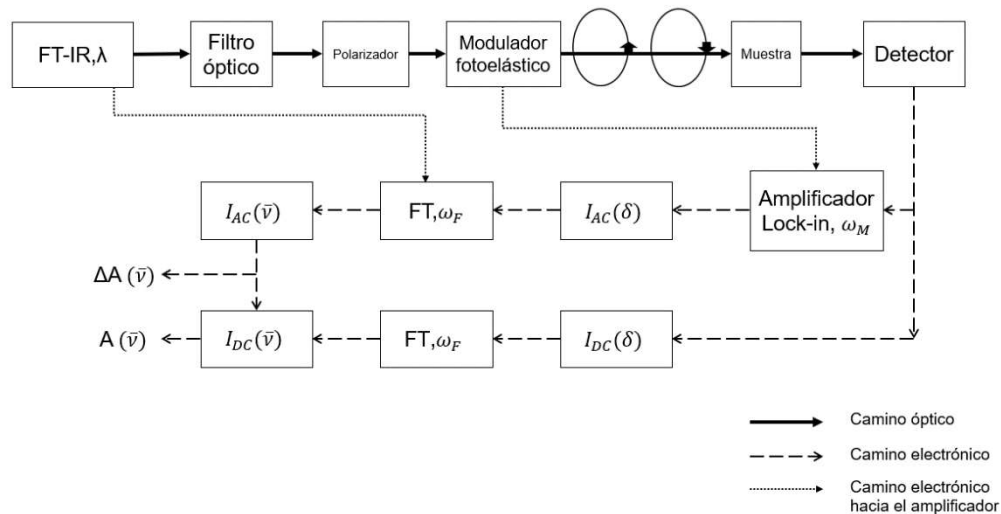


Figura 2.4 Esquema de un espectrofotómetro VCD con transformada de Fourier. (Nafie *et al.*, 2011)

La fuente de equipos de los espectrofotómetros infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR) pueden ser de cerámica, como las Globar que permiten trabajar en el IR medio y lejano, o del tipo lámpara de tungsteno que dan acceso al IR cercano y al visible.

La luz IR que arroja la fuente pasa por un interferómetro que modula su potencia radiante a frecuencia, ω_F . La luz IR es policromática por lo que es necesario utilizar un filtro óptico para eliminar la luz con una longitud de onda (λ) fuera del rango de

interés.

El polarizador lineal se configura para que el plano de polarización de la luz adopte un ángulo de 45° con respecto al eje del, siguiente elemento, el modulador fotoelástico (PEM, acrónimo en inglés de Photo-Elastic Modulator). Los polarizadores más usados en VCD están formados de BaF_2 y los de KRS-5 (bromoyoduro de talio).

El PEM suelen estas formados por materiales como el ZnSe o CaF_2 que presentan propiedades fotoelásticas. Cuando se aplica un voltaje en ellos se provoca un estrés mecánico que produce la deformación del material comprimiéndolo o extendiéndolo. El PEM oscila sinusoidalmente con un ángulo de fase α_M y con una frecuencia ω_M , en el rango de los kilohercios (kHz). Las dos componentes perpendiculares del vector campo eléctrico de la radiación polarizada atraviesan el material a distinta velocidad dependiendo del estado de deformación en el que se encuentre lo que dará lugar, alternativamente a radiación circularmente polarizada a izquierdas o derechas.

La muestra se coloca después del PEM y el haz de luz polarizada (doblemente modulada) que la atraviesa se dirige directamente al detector. La composición del detector la determinara él rango de trabajo, siendo habitual el uso de InSb para la región de $4000\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$ y de telururo de cadmio y mercurio (MCT) para el rango de trabajo entre 2000 y 800 cm^{-1} . El haz de la luz que llega al detector es separado electrónicamente dependiendo de su intensidad. Utilizando como criterio el rango de frecuencia, se separa en dos vías, alta (I_{AC}) y baja (I_{DC}), dando lugar a dos interferogramas.

La ruta de baja intensidad (DC) transporta el interferograma, $I_{DC}(\delta)$, que solo se encuentra modulado por la frecuencia del interferómetro, ω_F . Una vez que se le aplique la transformada de Fourier el interferograma resultante, $I_{DC}(\bar{\nu})$, dará lugar al espectro IR, $A(\bar{\nu})$. En la ruta de alta intensidad (AC) el interferograma que sale del detector se encuentra doblemente modulado por la frecuencia del interferómetro, ω_F y la del PEM, ω_M . Este interferograma pasa a través de un LIA (amplificador *Lock-in*), un componente electrónico que tiene como función detectar y medir señales muy débiles en entornos de mucho ruido. Selecciona la componente de la señal a una fase y frecuencia específica y rechazan todas las demás señales de ruido a diferentes

frecuencias. El interferograma saliente del LIA, $I_{AC}(\delta)$, estará únicamente modulado por la frecuencia del PEM. Al aplicar la transformada de Fourier al interferograma será resultante, $I_{DC}(\bar{\nu})$. Al dividir las intensidades transmitidas en ambas rutas obtenemos el espectro VCD. (Nafie *et al.*, 2011)

$$\Delta A(\bar{\nu}) = \frac{I_{AC}(\bar{\nu})}{I_{DC}(\bar{\nu})}$$

2.4.4. Espectros VCD. Características y construcción.

Las bandas que observamos en el espectro VCD, al igual que en el espectro IR, corresponden a los movimientos vibracionales de los diferentes grupos funcionales que presenta una molécula y que absorberán radiación a diferente longitud de onda.

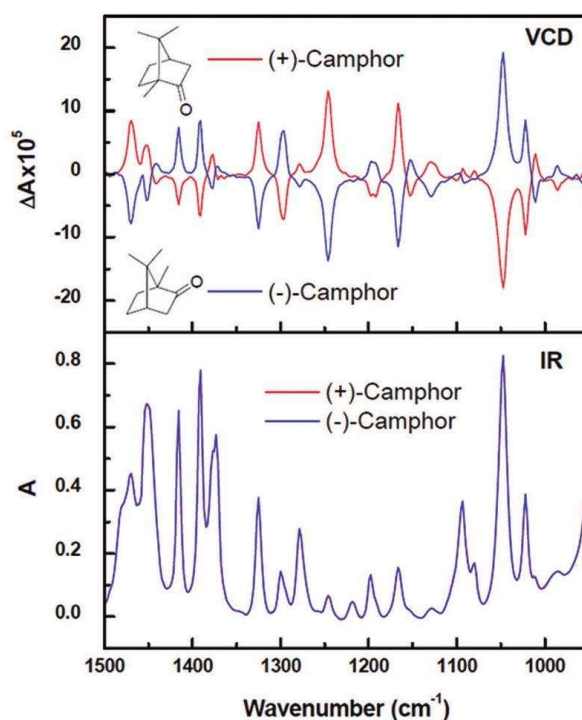


Figura 2.5 Espectros VCD (cuadro superior) e IR (cuadro inferior) observados de (+)-y (-)- alcanfor en CCl_4 (0,8 M); célula de 98 lm de longitud de recorrido con ventanas de BaF₂; 20 min de recogida para ambos enantiómeros; instrumento optimizado a 1400 cm^{-1} con 4 cm^{-1} de resolución. Se muestran los espectros IR sustraídos por el disolvente y VCD sustraídos por el enantiómero. (He *et al.*, 2011)

Los espectros VCD a diferencia de del IR presenta tanto bandas positivas como negativas que van asociados al enantiómero R o S de la molécula de estudio.

Si observamos los espectros de los enantiómeros del alcanfor (**Figura 1.5**) apreciamos bandas que presentan igual intensidad, pero signo opuesto. Debido a

ello el espectro VCD de un enantiómero será la imagen especular de su opuesto, y su suma daría como resultado cero. Las intensidades del VCD son aproximadamente 4 órdenes de magnitud más pequeñas que el IR.

2.4.5. Usos de la espectroscopía VCD

La espectroscopía VCD juega un papel importante en las fases tempranas del desarrollo de fármacos. Debido al gran número de configuraciones en la disposición de los átomos una molécula presentará un gran número de conformeros y aquí es donde el VCD actúa como una herramienta de cribado donde nos permite reducir el número de conformeros a una cantidad aceptable lo que facilita los esfuerzos en el estudio e investigación de estas en fases más avanzadas del desarrollo del futuro fármaco.

Adicionalmente, hace pocos años se ha estandarizado el uso de la espectroscopía VCD en la industria farmacéutica a raíz de que la Farmacopea de Estados Unidos declarara, en 2016, la espectroscopía VCD como método estándar para la determinación de configuraciones absolutas, por lo que su uso pasó de opcional a obligatorio. (Merten *et al.*, 2019)

3. OBJETIVOS

El objetivo de este proyecto es establecer un procedimiento para determinar con exactitud el exceso enantiomérico en una mezcla problema de los dos enantiómeros del α -pineno mediante el uso de la espectroscopía de dicroísmo circular vibracional.

4. DETALLES EXPERIMENTALES

4.1. Muestras y disolventes

Las muestras de (+)- α -pineno y (-)- α -pineno fueron adquiridas a la casa comercial TCI. La pureza de las mismas es $\geq 97\%$ y fueron empleadas sin llevar a cabo ningún tipo de purificación adicional. En el proceso de adquisición de espectros se empleó también tetracloruro de carbono (ABCR, 99%) (ver explicación debajo).

4.2. Instrumental, equipos y software.

Para el registro de los espectros VCD se utilizó un espectropolarímetro de dicroísmo circular vibracional modelo FVS-6000 de la casa comercial JASCO, perteneciente al Centro de Instrumentación Científico Técnica (CICT) de la Universidad de Jaén. Su rango de medida estándar es de $3200\sim 850\text{ cm}^{-1}$, en la que cuenta con una resolución de 4 cm^{-1} . Está equipado con: (i) una fuente cerámica de alta intensidad; (ii) detector para la región de trabajo en este estudio de telururo de mercurio y cadmio (MCT-V) (aprox. $1700\text{ a }950\text{ cm}^{-1}$); (iii) polarizador es de KRS-5(bromuro de talio); (iv) modulador fotoelástico de ZnSe PEM-100 de la casa comercial Hinds centrado a 1250 cm^{-1} .

Se promediaron 4000 espectros (acumulaciones) para obtener los espectros IR y VCD con una buena relación señal/ruido. Adicionalmente, a todos los espectros VCD que se recogen en la memoria se les corrigió la línea base mediante la sustracción de la señal producida en el equipo por una muestra aquiral, en este caso tetracloruro de carbono de acuerdo con lo descrito en la bibliografía (Stephens *et al.*, 2012). La manipulación espectral fue llevada a cabo con el software del fabricante del equipo Spectral Manager II.

5. RESULTADOS

5.1. Muestra problema e hipótesis de trabajo

Se conoce que la disolución problema está formada por una mezcla de los dos enantiómeros de α -pineno en proporción desconocida. De este modo, el exceso enantiomérico puede ser debido a la presencia de una mayor concentración de (+)- α -pineno o (-)- α -pineno.

El procedimiento que se plantea se basa en el estudio de la intensidad de la señal VCD para ciertas bandas seleccionadas dentro de todas las observadas en el espectro de una mezcla problema de dos enantiómeros como indicador del exceso enantiomérico de uno de ellos. (Leung *et al.*, 2011; Quesada *et al.*, 2018). Como indicador se trabajará considerando de forma separada la altura de las bandas, sus áreas y sus anchuras a media altura y se comparará el resultado obtenido con cada procedimiento.

Para llevar a cabo esta tarea de una forma sistematizada se planteó la preparación de una serie de mezclas de los dos enantiómeros en las que sus concentraciones son perfectamente conocidas y varían secuencialmente. Específicamente, se prepararon 5 disoluciones de 100 μ L de volumen en las que se fue incrementando gradualmente la concentración de (+)- α -pineno. Los porcentajes en volumen de estas mezclas se recogen en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1 Mezclas empleadas de (+)- α -pineno y (-)- α -pineno.

	% vol.	% vol.
Punto 1	100	0
Punto 2	90	10
Punto 3	80	20
Punto 4	70	30
Punto 5	60	40

Se seleccionarán una serie de bandas que se puedan considerar de interés y se construirán rectas de calibrado con sus propiedades (como hemos mencionado, alturas, áreas y anchuras a media altura) en las que, por interpolación, al introducir los valores para las mismas observadas para el problema se podrá estimar su composición.

5.2. Espectros experimentales obtenidos

En las figuras que se presentan en las siguientes páginas, se representa la región comprendida entre 1300-950 cm^{-1} de los espectros IR y VCD de todas las mezclas preparadas (**Figuras 5.1 a 5.6**) y de la muestra problema (**Figura 5.7**) junto con el nivel de ruido del espectro VCD. Al tratarse de una técnica diferencial y del orden de 10^{-4} veces menos intensa que el IR, es recomendable mostrar la curva de ruido como muestra de la fiabilidad de la medida y de la ausencia de artefactos. En nuestro caso, observamos que el ruido es siempre un orden de magnitud más bajo que las señales, indicando la fiabilidad de las mismas.

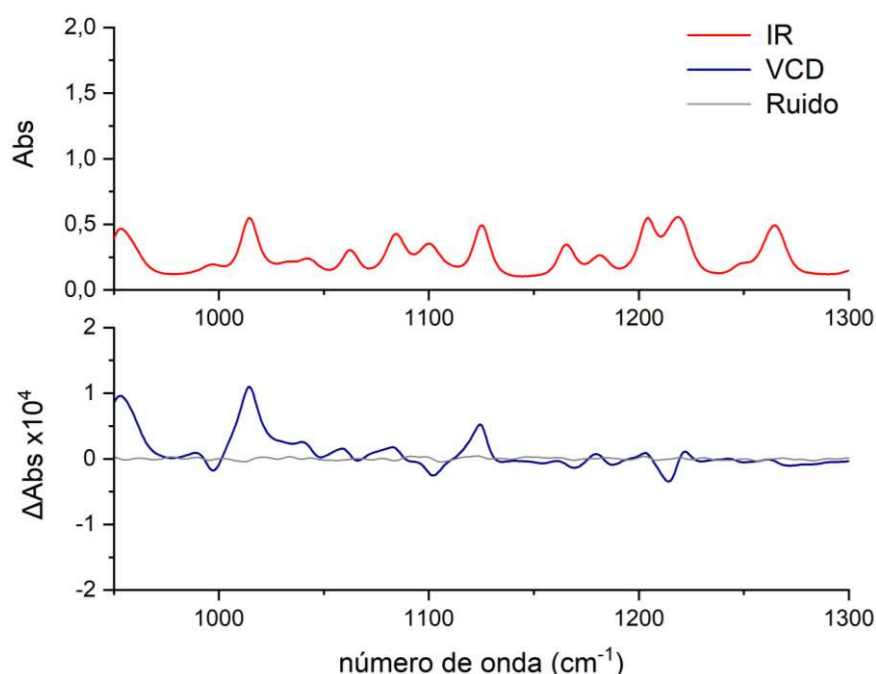


Figura 5.1 Espectros IR y VCD de una disolución con una composición de 60% de (+)- α -pineno y 40% de (-)- α -pineno correspondiente al punto 5 de la recta de calibrado.

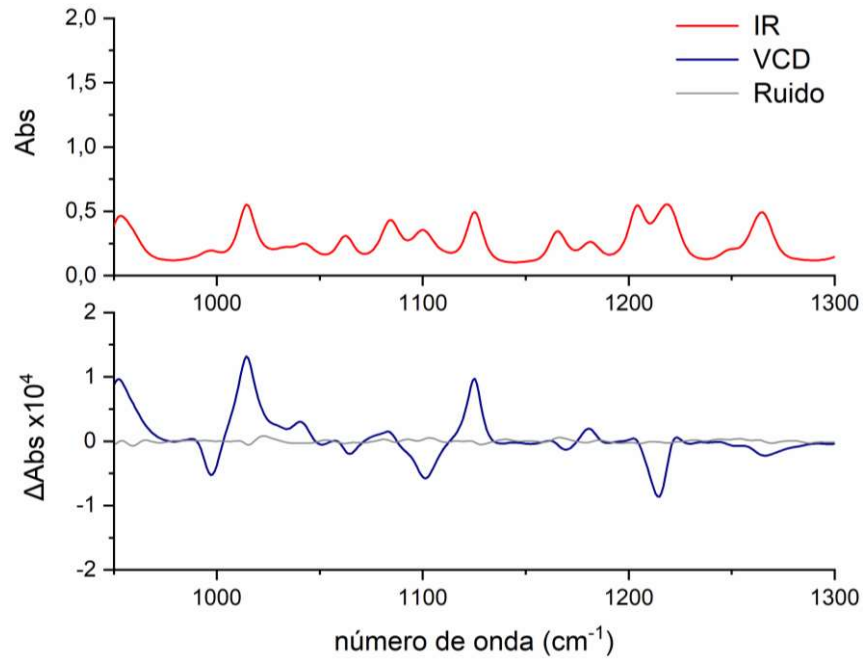


Figura 5.2 Espectros IR y VCD de una disolución con una composición de 70% de (+)- α -pineno y 30% de (-)- α -pineno correspondiente al punto 4 de la recta de calibrado.

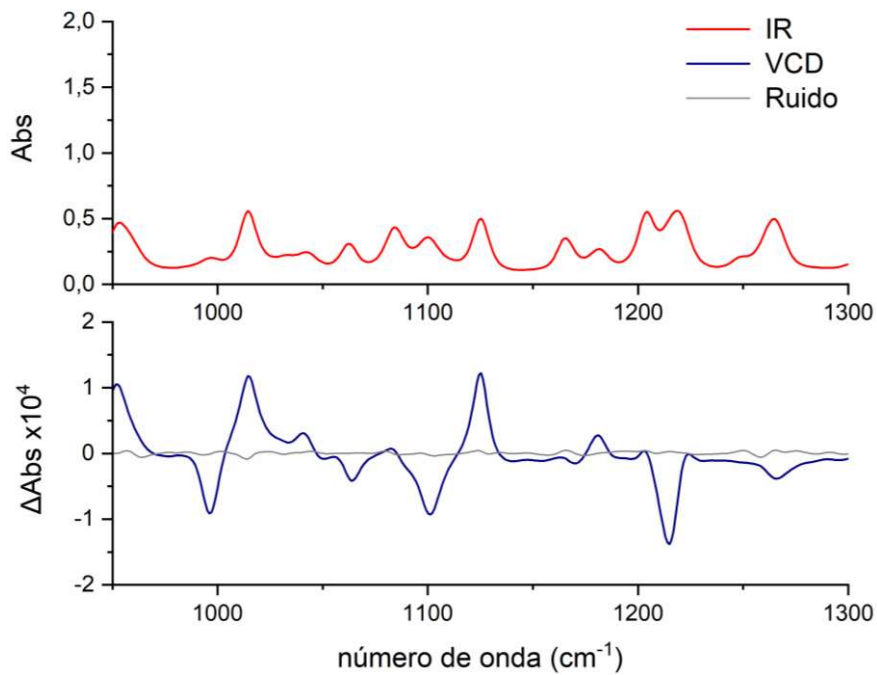


Figura 5.3 Espectros IR y VCD de una disolución con una composición de 80% de (+)- α -pineno y 20% de (-)- α -pineno correspondiente al punto 3 de la recta de calibrado.

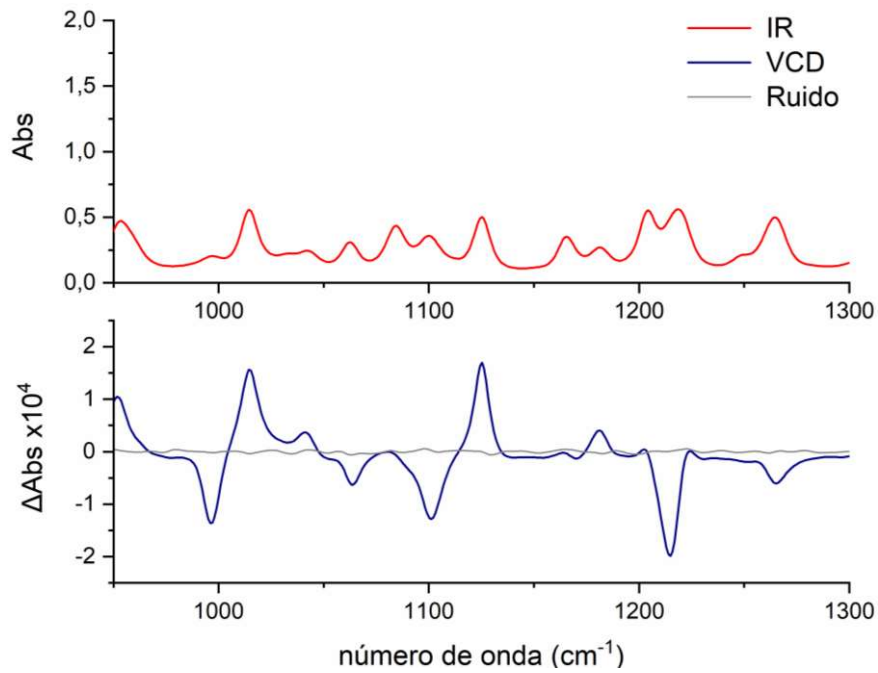


Figura 5.4 Espectros IR y VCD de una disolución con una composición de 90% de (+)- α -pineno y 10% de (-)- α -pineno correspondiente al punto 2 de la recta de calibrado.

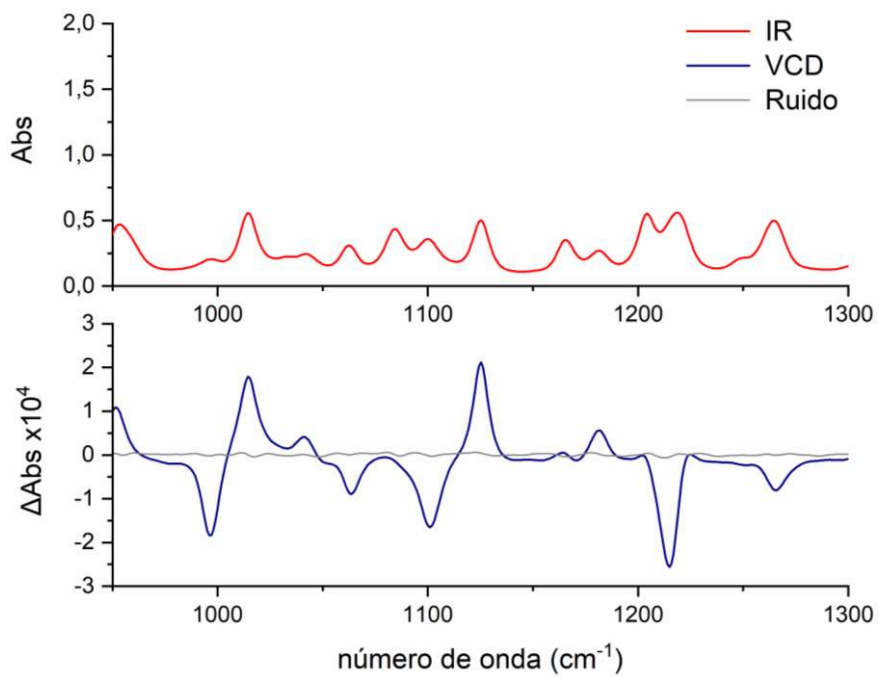


Figura 5.5 Espectros IR y VCD de una disolución con una composición de 100% de (+)- α -pineno y 0% de (-)- α -pineno correspondiente al punto 1 de la recta de calibrado.

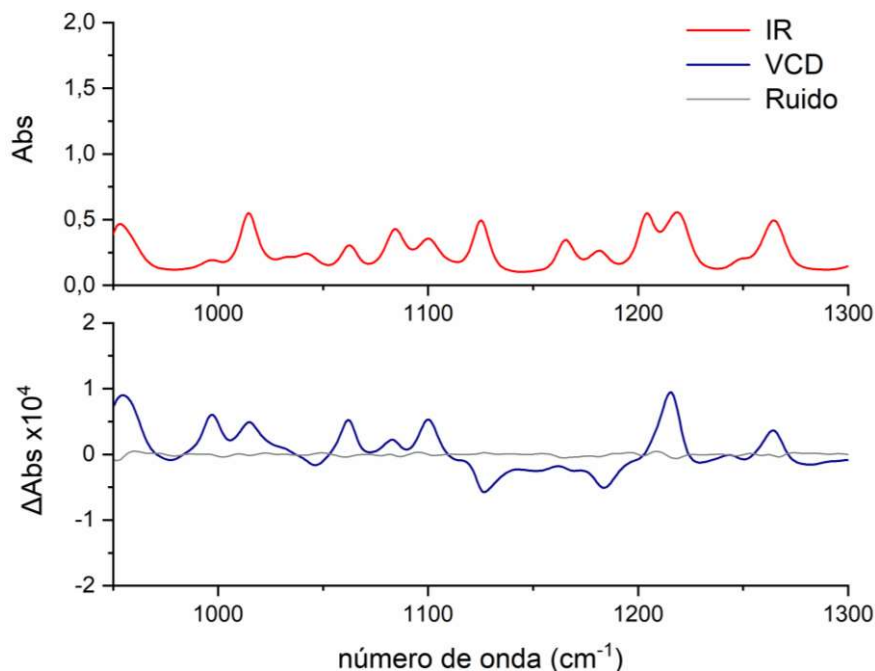


Figura 5.6 Espectros IR y VCD de una disolución problema con una composición desconocida de (+)- α -pineno y de (-)- α -pineno.

Con respecto al espectro de la muestra problema, al representarlo en conjunto con los espectros anteriores, por comparación, podemos deducir que la mezcla de concentraciones desconocidas de (+)- α -pineno y de (-)- α -pineno es más rica en este último enantiómero, debido a que las bandas en su espectro VCD son de signo opuesto a aquellas observadas en los espectros de las disoluciones preparadas de concentración conocida, más ricas en (+)- α -pineno. Esto queda evidenciado en la **Figura 5.7** donde se representan superpuestos todos los espectros.

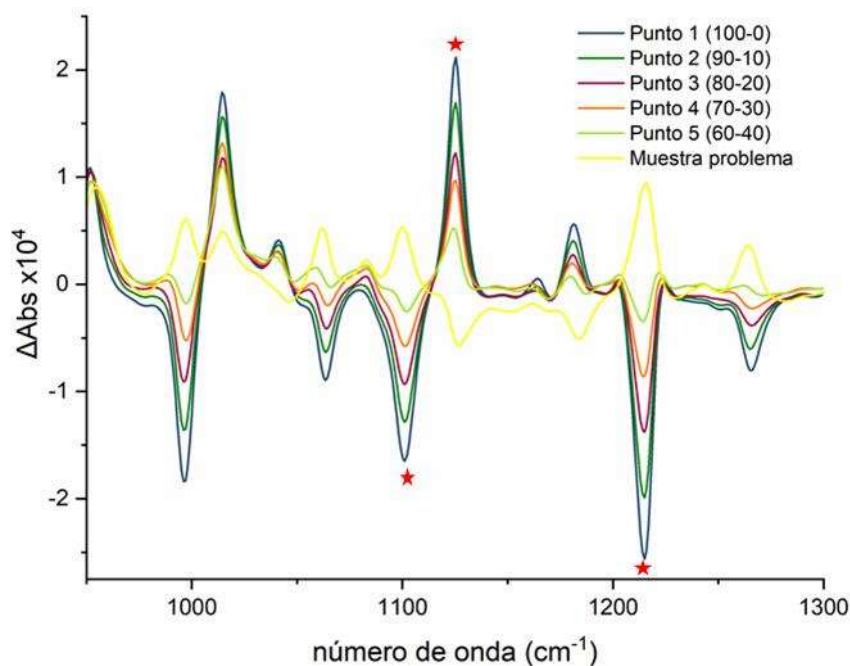


Figura 5.7 Presentación conjunta de todos los espectros VCD de la recta de calibrado y el espectro VCD de la muestra problema. Las bandas marcadas son las que se utilizarán en este trabajo: 1101 cm^{-1} , 1125 cm^{-1} y 1214

cm⁻¹

La mera comparación nos aporta muy poca información cuantitativa, aunque si nos da información cualitativa de gran importancia: conocer cuál es el enantiómero mayoritario.

Nuestro objetivo final es calcular el porcentaje de exceso enantiomérico del (+)- α -pineno y de (-)- α -pineno de nuestra muestra problema, pero para seleccionar las bandas a estudiar se nos abre un abanico de posibilidades. El primer criterio seguido para la selección de aquellas que puedan resultar útiles es la posición de línea base, que debe delimitar una banda a la misma altura en los espectros de todas las mezclas para proporcionar unos resultados comparables en lo que se refiere al valor de su área tras la integración. La línea base de integración se plantea como un criterio de selección porque no todas las bandas tendrán la misma en todos los espectros para las distintas mezclas. Por ejemplo, vemos que el principio de una banda presenta un valor de delta de absorptividad en torno a 0.5×10^4 y establecemos la línea base en este valor. La banda que cortaba en esta altura quedará bien representada, pero habrá bandas que la línea base corte más arriba de su inicio o más abajo.

Tras la integración, como parte del proceso, se obtienen valores de diferentes parámetros: área, altura de pico, la anchura a media altura, etc. En este proyecto se trabajará con los tres, para comparar los resultados. Como se ha dicho, si se trabaja con las áreas hay que ser preciso a la hora de elegir la línea base para cada banda ya que esta repercutirá en el valor del área alterando su exactitud. En cambio, la altura de picos o la anchura a media altura abreviada FWHM (del inglés Full Width at Half Maximum), no son dependientes de la línea base por lo que el valor de esta será 0 para cualquier banda que se elija.

De este modo, con la información obtenida al comparar los espectros, se decide trabajar sobre cuatro bandas localizadas a: 1101 cm^{-1} , 1125 cm^{-1} y 1214 cm^{-1} .

Los resultados para los distintos parámetros seleccionados para las bandas escogidas, en diferentes condiciones, están recogidos en la **Tabla 5.2**.

Tabla 5.2 Valores de área, altura de pico y anchura a mitad de altura (FWHM) para diferentes picos a una línea base (LB) específica para cada espectro integrado.

Pico a 1101 cm ⁻¹				
LB (Abs)	Espectro	Área (u.a.)	Altura de pico (Abs)	FWHM (cm ⁻¹)
5,30E-06	Punto 1 (100% (+)- α -pineno)	-2,12E-03	-1,65E-04	12,07
5,30E-06	Punto 2 (90% (+)- α -pineno)	-1,60E-03	-1,29E-04	11,95
5,30E-06	Punto 3 (80% (+)- α -pineno)	-1,11E-03	-9,33E-05	12,06
5,30E-06	Punto 4 (70% (+)- α -pineno)	-6,12E-04	-5,79E-05	11,75
5,30E-06	Punto 5 (60% (+)- α -pineno)	-1,50E-04	-2,55E-05	8,76
5,30E-06	Muestra problema	4,40E-04	5,33E-05	9,62

Pico a 1125 cm ⁻¹				
LB (Abs)	Espectro	Área (u.a.)	Altura de pico (Abs)	FWHM (cm ⁻¹)
-1,17E-05	Punto 1 (100% (+)- α -pineno)	2,14E-03	2,12E-04	7,98
-1,17E-05	Punto 2 (90% (+)- α -pineno)	1,72E-03	1,70E-04	7,81
-1,17E-05	Punto 3 (80% (+)- α -pineno)	1,32E-03	1,22E-04	8,00
-3,56E-06	Punto 4 (70% (+)- α -pineno)	9,38E-04	9,73E-05	7,96
-4,52E-06	Punto 5 (60% (+)- α -pineno)	5,86E-04	5,25E-05	8,76
-2,30E-05	Muestra problema	-3,34E-04	-5,73E-05	15,12

Pico a 1214 cm ⁻¹				
LB (Abs)	Espectro	Área (u.a.)	Altura de pico (Abs)	FWHM (cm ⁻¹)
0,00	Punto 1 (100% (+)- α -pineno)	-2,55E-03	-2,56E-04	9,67
0,00	Punto 2 (90% (+)- α -pineno)	-1,95E-03	-1,99E-04	9,66
0,00	Punto 3 (80% (+)- α -pineno)	-1,33E-03	-1,38E-04	9,50
0,00	Punto 4 (70% (+)- α -pineno)	-8,00E-04	-8,60E-05	9,25
0,00	Punto 5 (60% (+)- α -pineno)	-2,70E-04	-3,47E-05	7,95
0,00	Muestra problema	1,01E-03	9,43E-05	10,40

Con estos valores de área, altura de pico y anchura a media altura podemos construir rectas de calibrado que enfrenten los valores de estos parámetros frente a la composición (referida la % de (+)- α -pineno) en cada disolución. El fin último será interpolar los valores de estos parámetros para la muestra problema con el fin de obtener su composición exacta.

En la **Figura 5.8** se recogen los resultados para el área de las bandas.

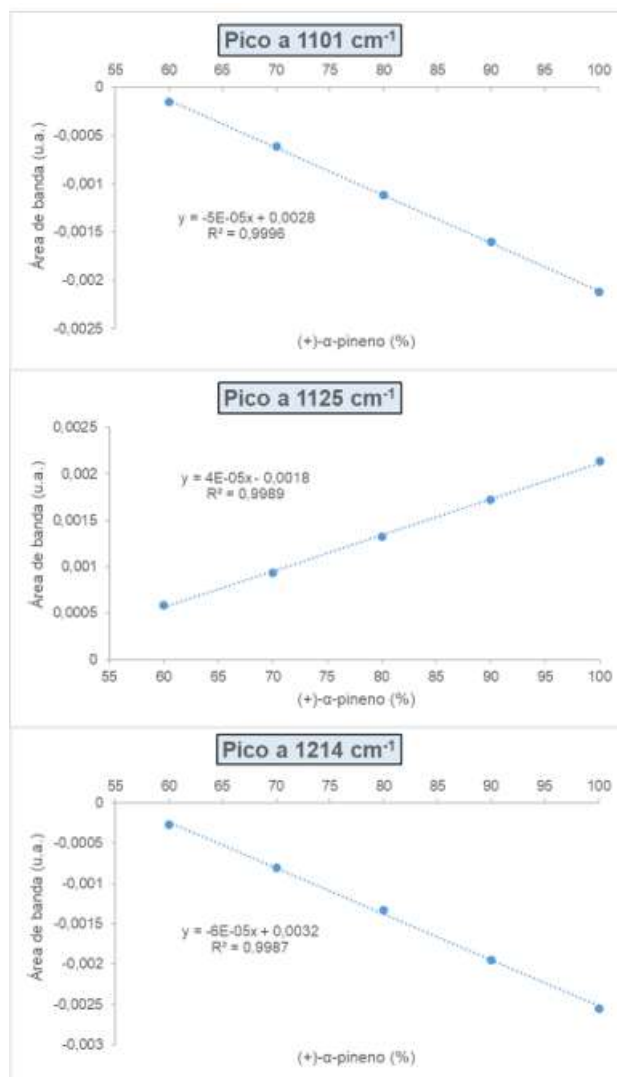


Figura 5.8 Representación de área de pico frente al porcentaje en volumen de (+)-α-pineno.

Los resultados de la interpolación de los valores observados para el área de las distintas bandas en la muestra problema en la recta de calibrado están recogidos en la **Tabla 5.3** justo bajo estas líneas.

Tabla 5.3 Valores de porcentaje en volumen de la disolución problema para cada uno de los enantiómeros del α-pineno obtenidos tras interpolar con valores de área de banda para diferentes bandas.

Pico (cm ⁻¹)	% en vol (+)-α-pineno	% en vol (-)-α-pineno
1101	47	53
1125	37	63
1214	37	63

En la **Figura 5.9** se recogen los resultados para la altura de pico de las bandas.

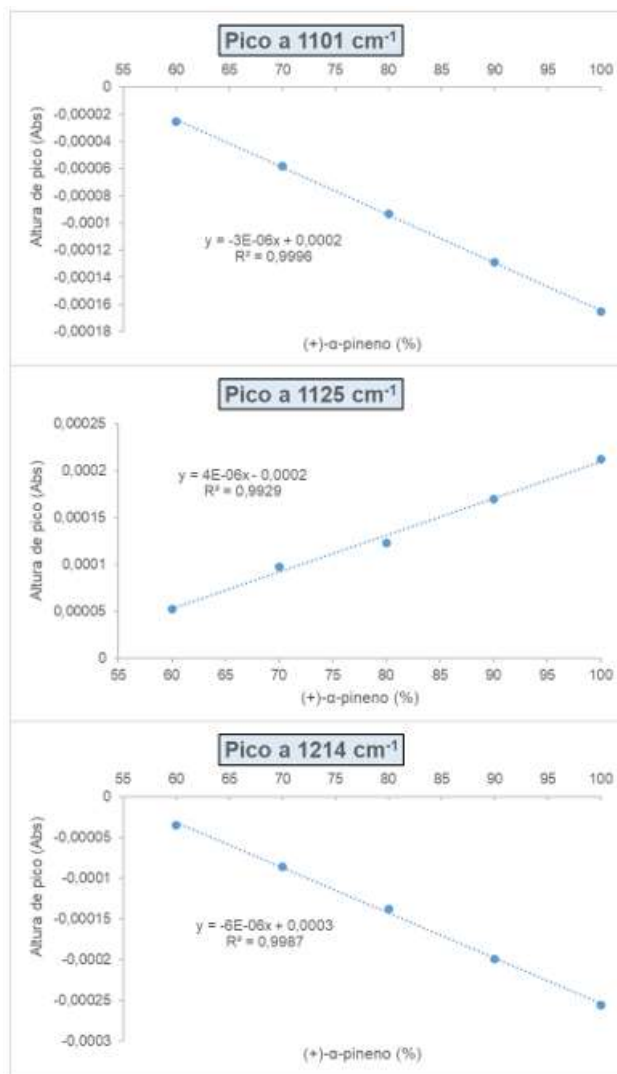


Figura 5.9 Representación de la altura de pico frente a porcentaje en volumen de (+)-α-pineno.

Los resultados de la interpolación de los valores observados para la altura de pico de las distintas bandas en la disolución problema en la recta de calibrado están recogidos en la **Tabla 5.4** justo bajo estas líneas.

Tabla 5.4 Valores de porcentaje en volumen de la disolución problema para cada uno de los enantiómeros del α-pineno obtenidos tras interpolar con valores de altura de pico para diferentes bandas.

Pico (cm ⁻¹)	% en vol (+)-α-pineno	% en vol (-)-α-pineno
1101	49	51
1125	36	64
1214	34	66

Por último, en la **Figura 5.10** se recogen los resultados para la anchura a mitad de altura de las bandas.

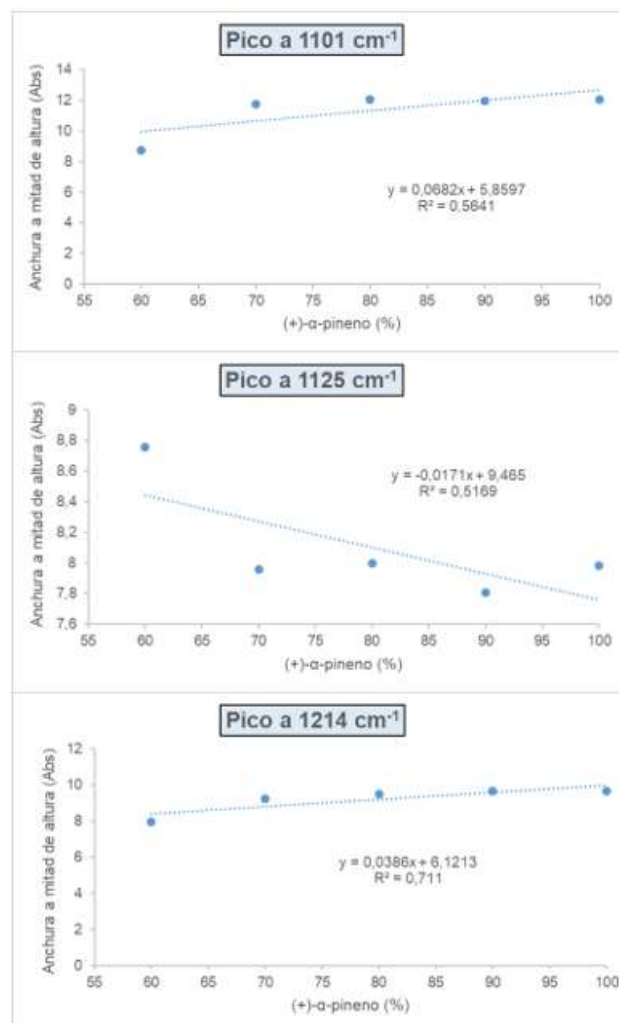


Figura 5.10 Representación de la anchura a mitad de altura frente a porcentaje en volumen de (+)-α-pineno.

Los resultados de la interpolación de los valores observados para la anchura a mitad de altura de las distintas bandas en la disolución problema en la recta de calibrado están recogidos en la **Tabla 5.5** justo bajo estas líneas.

Tabla 5.5 Valores de porcentaje en volumen de la disolución problema para cada uno de los enantiómeros del α-pineno obtenidos tras interpolar con valores de anchura a mitad de altura para diferentes bandas

Pico (cm ⁻¹)	% en vol (+)-α-pineno	% en vol (-)-α-pineno
1101	55	45
1125	-331	431
1214	111	-11

6. DISCUSIÓN

Tras observar los resultados finales de composición de la disolución problema recogidos en la **Tabla 5.3**, **Tabla 5.4** y **Tabla 5.5**, podemos discutir varias cuestiones.

En primer lugar, la elección del parámetro que escojamos para construir los cálculos será un factor importante a tener en cuenta. Si observamos los valores de porcentaje en volumen para ambos enantiómeros tanto en área y altura de pico vemos que son coherentes, es decir, existe una correlación lineal entre el valor del parámetro en cuestión y la concentración relativa de cada enantiómero en la muestra, y, además, hay cierta similitud entre los resultados obtenidos a partir de cada parámetro. En el caso la anchura a media altura, observamos que no existe la mencionada correlación lineal y se obtienen resultados incoherentes, indicando que este parámetro no es conveniente para los fines perseguidos.

Tras descartar la anchura a media altura nos centraremos en el área y la altura de pico. En el caso de dos bandas, ambos parámetros permiten obtener valores muy similares para la composición de la muestra problema: una proporción de aproximadamente 35:65 entre el enantiómero (+) y el (-), como puede verse en las **Tablas 5.3 y 5.4**. Pero el valor obtenido en el caso de las propiedades de la banda a 1101 cm^{-1} difiere considerablemente del obtenido con los otros dos, arrojando una composición de aproximadamente 50:50 de cada uno de los enantiómeros.

Este resultado claramente es erróneo, puesto que en el caso de una mezcla con un exceso enantiomérico bajo o cercana al 50% de composición de cada uno de los enantiómeros, no debería haberse observado señal alguna (las contribuciones de los dos enantiómeros se habrían cancelado). Esta deficiencia puede atribuirse a deficiencias en la estimación del área del pico en la muestra problema derivada de la selección de la línea base. Con la banda a 1125 cm^{-1} se ha seleccionado un valor de línea base distinto en función del espectro con el que se trabajaba (**Tabla 5.2**) y con la banda a 1214 cm^{-1} se ha seleccionado el valor 0, puesto que como puede verse en la **Figura 5.7** esta es una elección acertada en este caso. No obstante, con la banda a 1101 cm^{-1} se ha decidido trabajar con el mismo valor para todos los espectros. Este valor es positivo (5×10^{-6}) lo que puede haber conducido a ligera sobreestimación de las áreas de las bandas en los espectros de la curva de

calibrado (de signo negativo) y subestimación en el área de la banda de la muestra problema (de signo positivo) conduciendo a un resultado erróneo.

Lo anterior refleja que la elección de esta banda y el modo de manipular los espectros no fue acertada para el cálculo de la composición de la disolución problema.

Con los valores que no hemos descartado, el valor medio de porcentaje en volumen es de un 37% de (+)- α -pineno y 63 % (-)- α -pineno en el parámetro del área. Y el exceso enantiomérico tendría un valor del 26 %.

$$\%EE = 63\% - 37\% = 26\%$$

Con respecto al parámetro de altura de pico, el valor medio de porcentaje en volumen es de un 35% de (+)- α -pineno y 65 % (-)- α -pineno. Y el exceso enantiomérico sería del 30%.

$$\%EE = 65\% - 35\% = 30\%$$

Ambos valores de exceso enantiomérico son muy similares, diferenciándose en pocas unidades por lo que podríamos dar como valor de exceso enantiomérico la media de ambos, 28% de exceso enantiomérico en la disolución problema.

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se puso como objetivo la determinación del exceso enantiomérico de una disolución problema que contenía los dos enantiómeros del α -pineno usando la espectroscopia VCD. Para este fin, se obtuvieron los espectros de mezclas con proporciones perfectamente conocidas de los dos enantiómeros del α -pineno y se estudiaron diferentes parámetros de tres bandas presentes en los mismos y consideradas significativas, que pudieran correlacionarse con la composición de las disoluciones. Dichos parámetros fueron: altura de pico, área de la banda y anchura a media altura de la misma.

La construcción de las curvas de calibrado correspondientes y la interpolación en las mismas de los valores de estos parámetros observados para las mismas bandas presentes en el espectro de la muestra problema, permitió obtener conclusiones acerca de la idoneidad de las mismas.

Los parámetros altura de banda y área integrada de la misma parecen mantener una relación lineal con la composición de la disolución, pero el parámetro anchura a media no. De este modo este parámetro quedó descartado para el estudio posterior.

Además, se ha observado que es crucial para obtener buenos resultados elegir correctamente la línea base de las bandas. En este sentido seleccionar como línea base 0, si la banda en cuestión lo permite, da buen resultado. El resultado también es bueno si la línea base se elige individualmente para cada uno de los espectros tratados. Sin embargo, elegir un valor arbitrario usando como referencia uno de los espectros, conduce a la obtención de resultados erróneos.

Finalmente, la concentración de especies presentes en la muestra problema se ha determinado como el valor medio del obtenido por el procedimiento de considerar la altura de pico y el área de la banda, valores semejantes. Concretamente, se propone que la composición de dicha muestra es de 64 % en vol de (-)- α -pineno y 36 % en vol de (+)- α -pineno, lo que se traduce en un 28% de exceso enantiomérico.

8. BIBLIOGRAFÍA

CIRIMINNA, ROSARIA., LOMELI, MONICA., DEMMA CARÀ, PIERA., LOPEZSANCHEZ, JOSE A., PAGLIARO, MARIO. (2014): Limonene: A Versatile Chemical of the Bioeconomy, *Chem. Commun.*, 2014,50, 15288-15296. DOI: <https://doi.org/10.1039/C4CC06147K>

GUO, CHANGNING., SHAH, REKHA D., DUKOR, RINA K., CAO, XIAOLIN., FREEDMAN, TERESA B. AND NAFIE, LAURENCE A. (2004): Determination of Enantiomeric Excess in Samples of Chiral Molecules Using Fourier Transform Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy: Simulation of Real-Time Reaction Monitoring, *Anal. Chem.* 2004, 76, 23, 6956–6966. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac049366a>

HE, YANAN & WANG, BO & DUKOR, RINA & NAFIE, LAURENCE. (2011). Determination of Absolute Configuration of Chiral Molecules Using Vibrational Optical Activity: A Review. *Applied spectroscopy.* 65. 699-723. DOI: <https://doi.org/10.1366/11-06321>

IUPAC. Online version (2019-) created by S. J. Chalk: Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). ISBN 0-9678550-9-8. DOI: <https://doi.org/10.1351/goldbook>.

LEUNG, DIANA., KANG, SUNG OK AND ANSLYN, ERIC V. (2011): Rapid determination of enantiomeric excess: a focus on optical approaches, *Chem. Soc.Rev.*, 2012,41, 448-479. DOI: <https://doi.org/10.1039/C1CS15135E>

MAUSKOPF, SEYMOUR. (2006): Chapter 1- A history of chirality, Editor(s): Kenneth W. Busch, Marianna A. Busch, *Chiral Analysis*, Elsevier, 2006, Pages 3-24, ISBN 9780444516695. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-044451669-5/50001-6>.

MERTEN, CHRISTIAN., GOLUB, TINO P. AND KREIENBORG, NORA M. (2019): Absolute Configurations of Synthetic Molecular Scaffolds from Vibrational CD Spectroscopy, *J. Org. Chem.* 2019, 84, 14, 8797–8814. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b00466>

NAFIE, LAURENCE A. AND NAFIE, LARRY. (2011): *Vibrational Optical Activity: Principles and Applications*. Wiley.

NGUYEN, L. A., HE, H., & PHAM-HUY, C. (2006). Chiral drugs: an overview. *International journal of biomedical science: IJBS*, 2(2), 85–100. PMID: 23674971; PMCID: PMC3614593.

QUESADA MORENO, MARIA DEL MAR., VIRGILI, ALBERT., MONTEAGUDO, EVA., CLARAMUNT, ROSA M., ALVILÉS MORENO, JUAN RAMÓN., LOPÉZ GONZÁLEZ, JUAN JESÚS., ALKORTA, IBON AND ELGUERO, JOSÉ. (2018): A vibrational circular dichroism (VCD) methodology for the measurement of enantiomeric excess in chiral compounds in the solid phase and for the complementary use of NMR and VCD techniques in solution: the camphor case, *Analyst*, 2018,143, 1406-1416. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7AN01855J>

RIEHL, JAMES P. (2010): *Mirror-Image Asymmetry: An Introduction to the Origin and Consequences of Chirality*. John Wiley & Sons Inc.

STEPHENS, PHILIP J., DEVLIN, FRANK J., CHEESEMAN, JAMES R. (2012). *VCD Spectroscopy for Organic Chemists*. CRC Press.

PRELOG, VLADIMIR (1975): CHIRALITY IN CHEMISTRY Nobel Lecture, December 12, 1975. Laboratory of Organic Chemistry, Zürich, Switzerland.