



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Marcelo Muñoz F.
INSTITUTO: Ciencias Químicas
FACULTAD: Ciencias

“ASIGNACIÓN DE LA CONFIGURACIÓN ABSOLUTA EN MEZCLAS RACÉMICAS MEDIANTE HPLC-DCE-RO QUIRAL Y CÁLCULOS DFT. UN ESTUDIO A CUATRO COMPUESTOS DE INTERÉS FARMACOLÓGICO”

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
Título de Químico Farmacéutico.

JUAN PABLO CASTILLO GONZÁLEZ

VALDIVIA-CHILE

2014

“La vida es una obra de teatro que no permite ensayos. Por eso, canta, ríe, baila, llora y vive intensamente cada momento de tu vida antes que el telón baje y la obra termine sin aplausos.”(Charles Chaplin)

AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo fue realizado bajo la tutela del Dr. Marcelo Muñoz, a quien quiero agradecer por aceptarme y permitir formar parte de su laboratorio. Además quisiera recalcar su buena disposición y comprensión constante al momento de resolver inquietudes en cuanto al tema desarrollado, siendo una instancia de gran aprendizaje y enriquecimiento intelectual para el desarrollo óptimo de esta tesis.

A los profesores Gabriel Vallejos e Ignacio Moreno por formar parte del desarrollo de mi tesis como comisión evaluadora.

A mi madre Luzmila por enseñarme y entregarme las herramientas necesarias para ser la persona que soy, también el acompañarme y muchas veces guiarme en las decisiones que se me enfrentan a diario, y por el ánimo incondicional para no rendirme en el largo camino dentro de la Universidad.

A mi hermano José Francisco por estar siempre apoyándome y dándome las fuerzas incondicionales para no rendirme.

A Yosselyn quien formó parte integra en todo mi proceso dentro de la Universidad siendo mi constante compañía, logrando juntos superar diversos obstáculos y de entregarme a diario un apoyo incondicional.

A mis amigos Francisco, Pablo, Rodrigo y mis amigas Soledad, Claudia, Fernanda, Muriel por la amistad que se formó y que hicieron de la Universidad un lugar de buenas experiencias y anécdotas que perduraran por un largo tiempo y por formar un grupo de amistad que nunca voy a olvidar.

Agradezco a Dios y mi abuelo que desde arriba me protegen y acompañan día a día.

INDICE GENERAL.

1. RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Estereoquímica e isomería óptica.....	3
2.2 Importancia de la estereoisomería en la actividad biológica.....	5
2.3 Resolución enantiomérica y determinación de la Configuración Absoluta	8
3. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.1 Materiales	20
4.1.1 Reactivos.....	20
4.1.2 Equipos	21
4.1.2.1 Equipamiento general	21
4.2 Métodos	21
4.2.1 Análisis Cromatográficos	21
4.2.2 Determinación del valor de la rotación óptica específica $[\alpha]$ en base al cromatograma de RO experimental	22
4.2.3 Cálculo de las propiedades quiroópticas de cada uno de los enantiómeros de una mezcla racémica.....	25
5. RESULTADOS	28
5.1 (\pm)-óxido <i>trans</i> -estilbeno	28
5.1.1 Resolución cromatográfica enantioselectiva de (\pm)-óxido <i>trans</i> -estilbeno	28
5.1.2 Determinación cromatográfica experimental de las propiedades quiroópticas de los enantiómeros de (\pm)-1.....	29

5.1.3 Cálculo de las propiedades quiroópticas teóricas de (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-1	31
5.2 (±)-5-metil-5-fenil-hidantoína	33
5.2.1 Resolución cromatográfica enantioselectiva de (±)-5-metil-5-fenil-hidantoína.....	33
5.2.2 Determinación cromatográfica experimental de las propiedades quiroópticas de los enantiómeros de (±)-2.....	34
5.2.3 Cálculo de las propiedades quiroópticas teóricas de (5 <i>R</i>)-2.....	36
5.3 (±)-6β-hidroxi-tropinona	38
5.3.1 Resolución cromatográfica enantioselectiva de (±)-6β-hidroxi-tropinona.....	38
5.3.2 Determinación cromatográfica experimental de las propiedades quiroópticas de los enantiómeros de (±)-3.....	39
5.3.3 Cálculo de las propiedades quiroópticas teóricas de (1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3.....	43
5.4 (±)-1-(2-(5-metilisoxazol-3-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)pirrolidin-2-ona	45
5.4.1 Resolución cromatográfica enantioselectiva de (±)- <i>cis</i> -4.....	48
5.4.2 Determinación cromatográfica experimental de las propiedades quiroópticas de los enantiómeros de (±)- <i>cis</i> -4.....	49
5.4.3 Cálculo de las propiedades quiroópticas teóricas de (±)- <i>cis</i> -4	52
6. CONCLUSIONES.....	54
7. ESPECTROS	56
8. BIBLIOGRAFÍA	57

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1:	Representación del proceso óptico en un polarímetro	4
Figura 2:	Ilustración del modelo de acoplamiento de tres puntos para la enantioselectividad en las interacciones intermoleculares	6
Figura 3:	Estructura de los enantiómeros de talidomida	7
Figura 4:	Representación de los componentes de un detector de DC.	11
Figura 5:	Representación de dicroísmo circular	12
Figura 6:	Esquema gráfico del sistema HPLC-DCE. (a) Obtención de los perfiles cromatográficos por detección en línea de absorbancia, DCE a una sola longitud de onda. (b) Medición simultánea de los espectros de DCE y UV por la técnica de <i>stopped-flow</i>	13
Figura 7:	Representación de la metodología HPLC-DCE-RO/DFT quiral para la determinación de la configuración absoluta de una mezcla racémica	14
Figura 8:	Representación de los enantiómeros de 1	16
Figura 9:	Representación de los enantiómeros de 2	16
Figura 10:	Representación de los enantiómeros de 3	17
Figura 11:	Representación de los isómeros de 4	18
Figura 12:	Representación general de la reacción de Diels-Alder en la formación de (\pm)- 4 ..	20
Figura 13:	Distribución Gaussiana caracterizada por el ancho de la mitad de la altura ($W_{0,5}$) igual a $2,345\sigma$; h corresponde al valor máximo de la distribución.....	23
Figura 14:	Resolución cromatográfica enantioselectiva tras una inyección de 5,4 μg de (\pm)- 1 conseguida mediante detección UV-vis a 254 nm	28
Figura 15:	Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 5,4 μg de (\pm)- 1 conseguida mediante detección DC a 254 nm.....	29
Figura 16:	Comparación de espectros de DCE calculado y experimentales de los enantiómeros ($1R,2R$)- 1 y ($1S,2S$)- 1	30
Figura 17:	Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 5,4 μg de (\pm)- 1 conseguida mediante detección RO a 670 nm	31
Figura 18:	Conformación optimizada de geometría más estable de ($1R,2R$)- 1	32

Figura 19: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 25,5 µg de (±)- 2 conseguida mediante determinación UV-vis a 254 nm.....	33
Figura 20: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 25,5 µg de (±)- 2 conseguida mediante determinación DC a 254 nm.	34
Figura 21: Comparación de espectros de DCE calculado y experimental de los enantiómeros (5 <i>S</i>)- 2 y (5 <i>R</i>)- 2	35
Figura 22: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 25,5 µg de (±)- 2 conseguida mediante determinación RO a 670 nm.	36
Figura 23: Conformación optimizada de geometría más estable de (5 <i>R</i>)- 2	37
Figura 24: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 48 µg de (±)- 3 conseguida mediante determinación UV-vis a 254 nm.	39
Figura 25: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 48 µg de (±)- 3 conseguida mediante determinación DC a 254 nm	40
Figura 26: Comparación de espectros de DCE calculado y experimental de los enantiómeros (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)- 3 y (1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,6 <i>S</i>)- 3	41
Figura 27: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 96 µg de (±)- 3 conseguida mediante determinación RO a 670 nm	42
Figura 28: Conformación con optimización de geometría de menor energía (82,23% en la distribución de Boltzmann) de (1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)- 3	43
Figura 29: Espectros de DCE teóricos a un nivel B3LYP/TZVP de las tres conformaciones más estables de (1 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)- 3 y con un corrimiento de 30 nm.....	44
Figura 30: Representación general de una reacción de Diels-Alder	45
Figura 31: Representación de la conformación con optimización de geometría de menor energía (74,31% en la distribución de Boltzmann) de (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)- 4	47
Figura 32: Representación de los enantiómeros de (±)- 4	47
Figura 33: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 6,6 µg de (±)- <i>cis</i> - 4 conseguida mediante determinación UV-vis a 254 nm	48
Figura 34: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 6,6 µg de (±)- <i>cis</i> - 4 conseguida mediante determinación DC a 254 nm	49
Figura 35: Comparación de los espectros de DCE experimental y el calculado teóricamente de los enantiómeros(2 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)- 4 y (2 <i>S</i> ,4 <i>S</i>)- 4	50

- Figura 36:** Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 96 μg de (\pm)-*cis*-**4** conseguida mediante determinación RO láser a 670 nm51
- Figura 37:** Espectros de DCE teóricos a un nivel B3LYP/aug-cc-pVDZ de las dos conformaciones más estables de (2*S*,4*S*)-**4** y el espectro final ponderado52

ABREVIACIONES.

AU: Unidades de Absorbancia.

DC: Dicroísmo Circular.

DCE: Dicroísmo Circular Electrónico.

DCV: Dicroísmo Circular Vibracional.

DFT¹: Teoría Funcionales de la Densidad.

DEA: Dietilamina.

deg²: grados.

EMA³: Agencia Europea de Medicamentos.

FDA⁴: Agencia de Drogas y Alimentos.

FEQs: Fases Estacionarias Quirales.

HPLC⁵: Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento.

¹H-RMN: Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógenos.

ppm: Partes por millón.

PF: Punto de Fusión.

RMN: Resonancia Magnética Nuclear.

RO: Rotación Óptica.

THQ: Tetrahydroquinolina.

ROA⁶: Actividad Óptica Raman

UV-vis: Ultravioleta-Visible.

[α]: Rotación específica.

1: (\pm)-óxido *trans*-estilbeno.

2: (\pm)-5-metil-5-fenil-hidantoína

3: (\pm)-6 β -hidroxi-tropinona.

4: (\pm)-1-(2-(5-metilisoxazol-3-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)pirrolidin-2-ona.

De las siglas en inglés:

¹: Density Functional Theory.

²: Degrees.

³: European Medicines Agency.

⁴: Food and Drug Administration.

⁵: High Performance Liquid Chromatography.

⁶: Raman Optical Activity.

1. RESUMEN.

Un porcentaje importante de los fármacos dentro del mercado son compuestos sintéticos y quirales con uno o más centros asimétricos, generando la posibilidad de dos o más estereoisómeros. Aquellos que son imágenes especulares no superponibles entre sí son conocidos como enantiómeros, los cuales exhiben idénticas propiedades físicas y químicas en ambientes simétricos, y donde una mezcla equimolar de ellos corresponde a una mezcla racémica. Sin embargo sus propiedades biológicas pueden ser diametralmente diferentes, lo que lleva a la necesidad de identificarlas correctamente.

Es por esto que nuevos métodos destinados a asignar la configuración absoluta de enantiómeros más eficientemente son de gran interés para su aplicación sobre antiguas y nuevas moléculas orgánicas quirales. Por consiguiente, en este trabajo se ha propuesto una metodología basada en un análisis cromatográfico quiral mediante HPLC con detección quiroóptica múltiple (HPLC-DCE-RO), con la que es posible obtener espectros de DCE y valores de rotación óptica específica $[\alpha]_{670}$ para cada enantiómero presente en una mezcla racémica. Por otra parte, mediante cálculos teóricos mecánico-cuánticos del modelo de la teoría de las funcionales de la densidad (DFT), es posible predecir estas propiedades quiroópticas para ser comparadas con las obtenidas en forma experimental, con el fin de lograr la asignación final de la configuración absoluta.

De esta manera, esta metodología fue utilizada para asignar la configuración absoluta de cuatro mezclas racémicas de interés farmacológico: (\pm)-óxido *trans*-estilbeno (**1**), (\pm)-5-metil-5-fenil-hidantoína (**2**), (\pm)-6 β -hidroxi-tropinona (**3**) y (\pm)-*cis*-1-(2-(5-metilisoxazol-3-il)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)pirrolidin-2-ona (**4**). En todos los casos fue posible asignar la configuración absoluta de ambos enantiómeros en la mezcla, observándose una buena correlación entre las propiedades quiroópticas experimentales y teóricas. Sin embargo, en términos generales se observó una sobreestimación de los valores absolutos de $[\alpha]$ obtenidos teóricamente, lo que no impidió su uso en la asignación estereoquímica. Finalmente, los resultados obtenidos para los cuatro compuestos estudiados estuvieron en concordancia con las configuraciones absolutas reportadas en la literatura científica.

ABSTRACT.

A large percentage of drugs in the market are synthetic-chiral compounds with one or more asymmetric centers, which raise the possibility of two or more stereoisomers. Those that are non-superimposable mirror images are called enantiomers, exhibiting identical physical and chemical properties in symmetric environments, and often found as equimolar mixtures known as racemic mixtures. Nevertheless, their biological properties can be diametrically different, raising the need for their proper identification.

Accordingly, new methods to efficiently assign the absolute configuration of enantiomers are of great interest for their application over old and new chiral organic molecules. Consequently, this work has proposed a methodology based on a chiral HPLC analysis using multiple chiroptical detection (HPLC-ECD-RO), from which ECD and $[\alpha]_{670}$ values for each enantiomer present in a racemic mixture can be obtained. Moreover, quantum-mechanical calculations using the density functional of theory (DFT) allow prediction of these chiroptical properties for their comparison with those obtained experimentally, from which an assignment of the corresponding absolute configurations can be achieved.

Therefore, this methodology was used to assign the absolute configuration of four racemic mixtures of pharmacological interest: (\pm)-*trans*-stilbene oxide (**1**), (\pm)-5-methyl-5-phenyl-hydantoin (**2**), (\pm)-6 β -hydroxy-tropinone (**3**) and (\pm)-*cis*-1-(2-(5-methylisoxazole-3-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-4-yl)-pyrrolidine-2-one (**4**). In all cases, an assignment of the absolute configuration for each enantiomer in the mixture was achieved, giving the good correlation between both experimental and calculated chiroptical properties. Nevertheless, a general overestimation of the calculated absolute $[\alpha]$ values was observed, which did not prevented their use in the stereochemical assignments. Finally, the results obtained through this methodology were in agreement with the absolute configurations informed in the scientific literature.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 Estereoquímica e isomería óptica.

La estereoquímica es una rama de la química orgánica encargada de estudiar la distribución espacial que presentan los átomos de una molécula. En este aspecto, los compuestos orgánicos se pueden clasificar en dos grandes grupos: los quirales y los aquirales. Los compuestos quirales se definen como aquellos que presentan imágenes especulares no superponibles, lo que comúnmente se debe a la presencia de centros estereogénicos o asimétricos, es decir, átomos de carbono tetraédricos con hibridación sp^3 y con cuatro sustituyentes diferentes unidos a él. (Davies & Teng, 2003)

La quiralidad se encuentra presente en cada ser viviente a través de las macromoléculas esenciales que conforman a las células, como los aminoácidos, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Es por esto que, dependiendo de la orientación que se disponen estos átomos unidos al centro estereogénico de un compuesto quiral, podemos obtener dos o más isómeros, los que reciben el nombre de estereoisómeros, y en el caso particular de aquellos que son imágenes especulares entre sí, son llamados enantiómeros o isómeros ópticos. Los enantiómeros además de presentar una misma fórmula molecular, poseen idénticas propiedades físicas (punto de fusión o densidad) y químicas (en estado sólido, líquido y/o gaseoso) en ambientes simétricos.

La principal característica física que presentan los enantiómeros es que son capaces de rotar el plano de la luz polarizada plana, y dependiendo de la dirección que toma esta rotación, uno es llamado dextrorrotatorio y designado con los símbolos (d) ó (+), con una rotación hacia la derecha del plano de la luz polarizada plana, mientras que si rota el plano hacia la izquierda es llamado levorrotatorio y designado con los símbolos (l) ó (-). Cabe destacar que una mezcla racémica no desvía la luz polarizada, debido a que ambos enantiómeros desvían la luz en direcciones opuestas y con igual intensidad, por lo tanto, anulándose entre sí, no observándose algún cambio en cuanto a la orientación del plano de luz polarizada plana. A esta propiedad se le conoce como actividad óptica.

La determinación de la actividad óptica de una muestra quiral, se realiza mediante el uso de un instrumento llamado polarímetro, el cual está constituido por una fuente de luz (que

generalmente corresponde a una lámpara de sodio), un filtro polarizador, un tubo o celda en donde se deposita la muestra ópticamente activa y un filtro analizador (**Fig.1**). Generalmente la longitud de onda que más se utiliza es de 589 nm correspondiente a la Línea D del sodio. (*Kott, et al., 2007*)

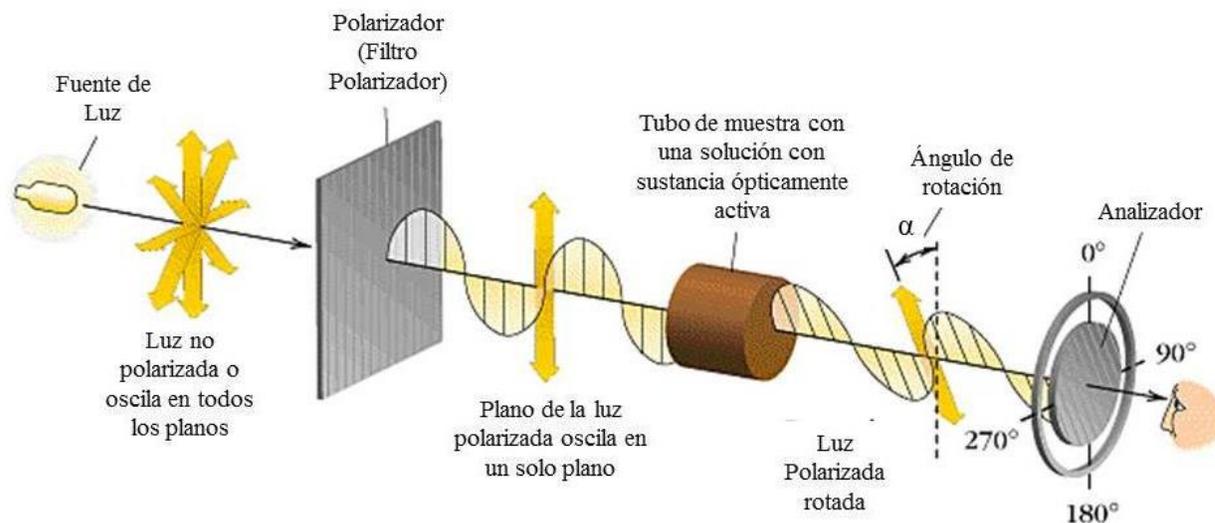


Figura 1: Representación del proceso óptico en un polarímetro.

Sin embargo, el ángulo de rotación α (deg) que se produce cuando el haz de luz polarizada lineal pasa por sobre la muestra ópticamente activa, depende de la concentración de moléculas que se encuentran en el trayecto de la luz polarizada, de la longitud de la trayectoria que esta recorra en el tubo o celda, de la temperatura (t) y también de la longitud de onda de la radiación (λ). Por lo tanto la rotación específica $[\alpha]_{\lambda}^t$ (deg/[dm(gr/cm⁻³)]) debe ser calculada e informada utilizando la siguiente ecuación, en donde “ t ” se encuentra en la escala de grados Celsius, “ c ” corresponde a la concentración en g/cm⁻³ y “ l ” es la longitud de la celda expresado en dm.

$$[\alpha]_{\lambda}^t = \frac{\alpha}{cl}$$

La capacidad de rotar la luz polarizada dependerá de la estructura molecular de cada compuesto y por lo tanto, corresponde a una propiedad física de un determinado enantiómero. (*Bertucci & Tedesco, 2012*)

Otra clase de estereoisómeros son los diastereoisómeros, isómeros que no son superponibles pero tampoco son imágenes especulares entre sí. Entre ellos se incluyen los compuestos *meso*, los isómeros *cis-trans* (E-Z), y los isómeros ópticos no enantioméricos y presentando diferentes propiedades físicas en ambientes aquirales, tales como el punto de ebullición, fusión y solubilidad, además de presentar propiedades químicas similares pero no idénticas.

Por otro parte, el método estándar y más utilizado para denotar a los estereoisómeros es en base a las reglas de Cahn-Ingold-Prelog, en donde los cuatro sustituyentes del carbono asimétrico son jerarquizados de acuerdo a un conjunto de reglas, esto con el fin de explicitar su distribución espacial, es decir, su configuración absoluta. De esta forma, cada centro estereogénico o asimétrico puede ser designado como “*R*”, del latín *rectus* (derecha), o “*S*”, del latín *sinister* (izquierda). Finalmente, la configuración absoluta de un compuesto corresponderá al arreglo espacial tridimensional exacto que presentan los sustituyentes de cada uno de los centro quirales o asimétricos que contenga la molécula quiral. (Mohan, *et al.*, 2009)

2.2 Importancia de la estereoisomería en la actividad biológica.

De lo anterior, se deduce que los enantiómeros presentan entre sí una distribución espacial diferente de sus átomos, y por lo tanto, su interacción en un ambiente quiral o asimétrico y como en el caso de receptores fisiológicos, son potencialmente diferentes. Es por esto, que Easson y Stedman, en el año 1933, propusieron un “modelo de acoplamiento de tres puntos” (Easson & Stedman, 1933), en donde cada uno de los dos enantiómeros que componen una mezcla racémica pueden interactuar en tres sitios complementarios con un receptor biológico, pero sólo aquel enantiómero que presente una quiralidad equivalente al receptor inducirá una determinada actividad farmacológica. Por el contrario, el segundo enantiómero al cambiar su distribución espacial, no podrá interactuar en los mismos tres puntos anteriores, y por ende no tendrá una actividad farmacológica igual que el enantiómero anterior (**Fig. 2**).

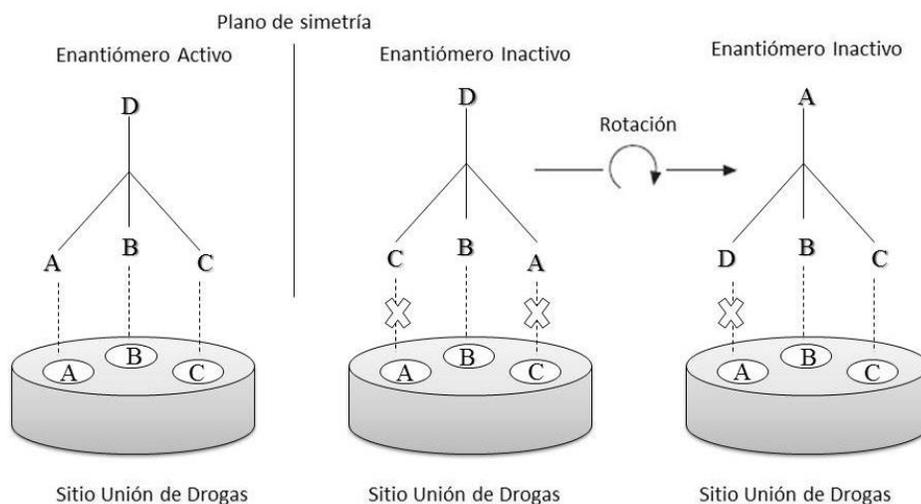


Figura 2: Ilustración del modelo de acoplamiento de tres puntos para la enantioselectividad en las interacciones intermoleculares. (McConathy & Owens, 2003)

Los actuales candidatos a ser fármacos comerciales, y aquellos que ya se encuentran presentes dentro del mercado farmacéutico, son principalmente quirales y sintéticos. Hace un tiempo atrás, este mercado contaba con una gran cantidad de fármacos comercializados como mezclas racémicas; sin embargo, hoy en día los fármacos enantioméricamente puros están surgiendo y tomando gran prioridad a nivel mundial (Debie, *et al.*, 2011), como ocurre con el fármaco Montelukast (ácido 2-[1[[*(1R)*]-1-[3-[2-(7-cloroquinolin-2-yl)etenil]fenil]-3-[2-(2-hidroxiropa-2-yl)fenil]propil]sulfanilmetil] ciclopropil]acético), broncodilatador utilizado en crisis de asma bronquial aguda (Maddala, *et al.*, 2013). Esto ha derivado en un gran interés por la quiralidad, lo que a su vez ha llevado a requerir métodos más confiables y rápidos para la determinación de la configuración absoluta de los nuevos fármacos enantioméricamente puros.

Sin embargo, el administrar solo un enantiómero al organismo no necesariamente va a prevenir o evitar los efectos adversos o posibles daños a órganos o tejidos. Esto debido a que dentro de nuestro organismo se pueden generar metabolitos dañinos o tóxicos tras el proceso de metabolización que sufre cualquier compuesto administrado. Así también puede suceder una inversión quiral o racemización del enantiómero administrado puro conllevando a la formación de un posible enantiómero dañino o tóxico.

En este aspecto, un ejemplo importante dentro de la historia de la estequimica, fue lo sucedido con la talidomida (α -N-[ftalimido]glutarimida). Este fármaco, que presenta una estructura similar a los barbitúricos, fue sintetizado en 1954 por el Dr. Wilhem Kunz, mostrando una acción sedante y antiemética, y por lo tanto fue prescrita en mujeres gestantes que presentaban náuseas o vómitos durante el primer trimestre del embarazo. Sin embargo, la compaa farmacéutica alemana Chemie Grünenthal al sintetizarlo obtena una mezcla racémica, es decir iguales cantidades de ambos enantiómeros (**Fig. 3**).

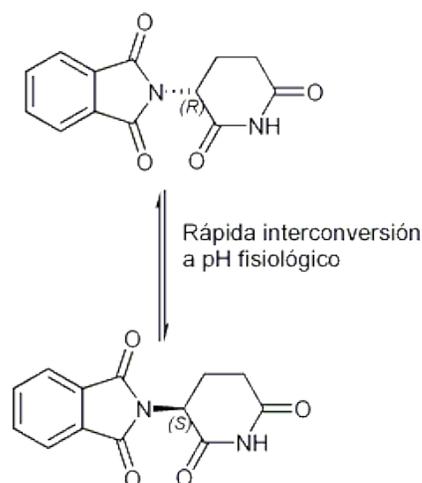


Figura 3: Estructura de los enantiómeros de talidomida. (Franks, *et al.*, 2004)

Lo que se desconocía hasta ese momento es que el enantiómero (+)-(R)-talidomida presenta las propiedades sedantes, mientras que el enantiómero (-)-(S)-talidomida es tóxico y teratogénico, causante de malformaciones congénitas en fetos, expresándose como una carencia o acortamiento de las extremidades superiores e inferiores. En reacción a lo anterior, en el año 1962 el congreso de los Estados Unidos promulgó diversas leyes que estipulaban el requerimiento de pruebas más rigurosas, en cuanto a la seguridad del uso de drogas durante el embarazo, con el fin de poder recibir la aprobación para su posterior venta dentro del país. (Franks, *et al.*, 2004) (Bosch, *et al.*, 2008) Sin embargo, posteriormente se descubrió que ambos enantiómeros se interconvierten entre sí producto de una hidrólisis espontánea a pH fisiológico (**Fig. 3**), por lo que probablemente no hubiese sido posible ser utilizado en mujeres embarazadas igualmente.

No obstante, tras varios años desde el retiro de la talidomida del mercado, la FDA ha vuelto a aprobar su uso en el año 1998, pero en el tratamiento de los síntomas de la lepra, a la vez

que otros estudios indican que puede ayudar en el tratamiento de los síntomas asociados al SIDA, Lupus, Síndrome de Sjögren, Artritis Reumatoide, Enfermedad Inflamatoria Intestinal, y algunos tipos de cáncer. (Pannikar, 2003)

Ya desde el año 1992 hasta hoy en día, las importantes autoridades mundiales que regulan la aprobación del ingreso de nuevos fármacos al mercado farmacéutico, como la FDA y la EMA, exigen controles y estudios aún más rigurosos, con el fin de poder conocer con precisión la seguridad y efectividad que presentan estos nuevos fármacos quirales y aquirales, evaluando tanto su acción farmacológica como también los posibles efectos adversos que puedan presentar cada uno de los enantiómeros en forma individual. Por lo tanto, la industria farmacéutica ha aumentado el gasto en generar nuevas y mejores investigaciones en relación a la seguridad de los futuros fármacos.

2.3 Resolución enantiomérica y determinación de la configuración absoluta.

Debido a la gran relevancia que han presentado los estereoisómeros dentro del área de la estereoquímica, es que se han desarrollado diferentes técnicas con la finalidad de separar los enantiómeros que forman parte de una mezcla racémica, siendo de vital importancia dentro del área farmacéutica para su posterior evaluación individual, principalmente toxicológica. Actualmente, existen diversas técnicas para separar enantiómeros, como por ejemplo la cristalización fraccionada, la degradación enzimática, la electroforesis capilar y también métodos cromatográficos con el uso de fases estacionarias quirales.

Este último se ha preferido ampliamente en la industria farmacéutica y se basa principalmente en el uso de la cromatografía líquida de alto rendimiento (proveniente del inglés: High Performance Liquid Chromatography, HPLC), una importante y poderosa herramienta utilizada en el campo del análisis químico. El HPLC, es una cromatografía en columna de fase líquida, en donde se aplican altas presiones producidas por una o más bombas con el fin de acelerar el proceso de separación y así disminuir notablemente el tiempo de espera para un análisis cromatográfico. A su vez, la fase móvil está compuesta por uno o más eluyentes que circulan dentro de este sistema, entrando en contacto con la fase estacionaria que se encuentra en el interior de la columna. Cuando se inyecta una muestra que contiene varios analitos, estos

eluyen a través de la fase móvil interaccionando de diferente forma con la fase estacionaria, determinando así el orden de elución de cada uno de ellos.

En cuanto a la instrumentación utilizada esta entrega muchas ventajas, tales como alta velocidad, columnas reutilizables, adición continua y automática de la fase móvil, gradientes programados y reproducibles de eluyentes, y por último una monitorización continua de las muestras eluidas. (Shriner, *et al.*, 2003)

En el actual mercado existe una gran variedad de fases estacionarias y por ende, una gran cantidad de compuestos que pueden ser analizados, desde compuestos iónicos, productos lábiles de origen natural, materiales poliméricos o compuestos de gran peso molecular, que pueden ser separados con gran éxito. Dentro de esta gran variedad de fases estacionarias, las que presentan mayor interés y utilidad dentro del campo de la estereoquímica corresponden a las fases estacionarias quirales (FEQs), las que han demostrado un gran éxito en la separación de enantiómeros.

Las columnas con FEQs están formadas por un soporte poroso, recubierto o enlazado químicamente a los diferentes tipos de selectores quirales. En el mercado hay diferentes tipos de FEQs, entre las que se encuentran: carbohidratos modificados (ChiralPak IA, IB y IC), ciclodextrinas (Cyclobond I y II), antibióticos macrólidos (Chirobiotic V, T, TAG y R), entre otros. (Tang, *et al.*, 2012)

En este contexto, posterior a una exitosa enantioseparación, otro punto de vital importancia dentro de la estereoquímica consiste en poder asignar o determinar la configuración absoluta de cada uno de los enantiómeros. De esta manera, existen dos grupos de métodos para elucidar la configuración absoluta: las técnicas quiroópticas y las no quiroópticas. Entre estas últimas se encuentra la **difracción de rayos X**, una técnica cristalográfica que consiste en hacer pasar un haz de rayos x a través de un monocristal del compuesto a analizar, el que difracta dando lugar a un patrón de intensidades que posteriormente son interpretadas de acuerdo a la posición que presenta cada átomo en la molécula. La difracción de rayos X es la técnica más segura para la determinación de la configuración absoluta de compuestos orgánicos, debido a que entrega la representación exacta de la molécula en estudio. Dentro de las métodos utilizados para hacer esta

determinación se encuentra la de dispersión anómala, la que puede ser aplicada en moléculas quirales que presentan dentro de su estructura un átomo pesado ($Z > 15$), el que permite diferenciar ambos enantiómeros. Sin embargo, si en su estructura el compuesto no presenta un átomo pesado, aún es posible utilizar métodos alternativos como el parámetro de Flack o el de Hooft, los que luego de una diferenciación rigurosa pueden determinar la configuración absoluta de los enantiómeros. No obstante, la gran desventaja que presenta esta técnica es la obtención de un monocristal perfecto para el análisis, un procedimiento no trivial, más aún si se dispone de una pequeña cantidad de la sustancia. (Allenmark & Gawronski, 2008) (Roussel, *et al.*, 2004)

Alternativamente, la **resonancia magnética nuclear** (RMN) es una técnica que en general permite determinar la configuración relativa de un compuesto, pero también puede ser utilizada en la determinación de la configuración absoluta, dependiendo de los grupos funcionales que componen a la molécula quiral analizada. En estos casos, la formación de diastereoisómeros por enlaces covalentes o complejos diastereómeros lábiles en el caso de agentes de solvatación quiral, permite una asignación isomérica basada en la diferencia de anisotropía de los sustituyentes sobre las formas diastereoisómeras. El ejemplo más común es la formación de esteres de Mosher en el caso de alcoholes. (Roussel, *et al.*, 2004)

Por otra parte, existen los métodos quiroópticos, los que se basan en la interacción de un compuesto ópticamente activo con una luz polarizada. El método quiroóptico más utilizado es el **dicroísmo circular electrónico** (DCE), en donde se mide la diferencia de absorción de la luz circularmente polarizada hacia la derecha con respecto a la luz circularmente polarizada hacia la izquierda. Al pasar este haz de luz circularmente polarizada a través de un medio ópticamente activo, ésta muestra absorberá mayormente una de estas dos luces polarizadas generando una diferencia de absorción, mientras que en el caso de una mezcla racémica, no se observarán cambios en la diferencia de absorción. Por lo tanto, el DCE corresponde a un monitoreo constante del diferencial de absorción de luz polarizada hacia la derecha y hacia la izquierda ($\Delta A = A_D - A_I$) a una longitud de onda fija, donde una selección apropiada de ésta conlleva a una correcta determinación del signo de DC (**Fig. 4**). Sin embargo, uno de los requisitos esenciales y más importantes para realizar un correcto análisis, es que la molécula debe contener dentro de su

estructura un cromóforo que absorba dentro del rango UV-vis de los 200 a los 420 nm, para conseguir una fuerte y clara señal. (Kott, *et al.*, 2007).

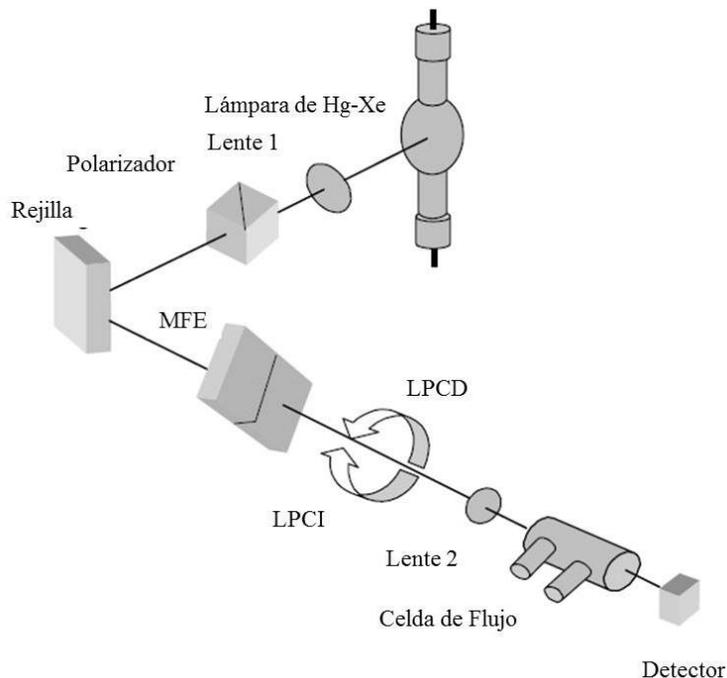


Figura 4: Representación de los componentes de un detector de DC. (MFE: Modulador Fotoelástico, LPCD: Luz Polarizada Circular hacia la Derecha, LPCI: Luz Polarizada Circular hacia la Izquierda)

Como se observa en la parte derecha de la siguiente imagen (**Fig. 5**), se representa a una muestra que contiene un compuesto ópticamente activo que absorbe mayoritariamente la luz circularmente polarizada hacia la derecha con respecto a la luz circularmente polarizada hacia la izquierda, por ende su magnitud ya no es la misma y la posición del vector formado cambia, generando una elipse.

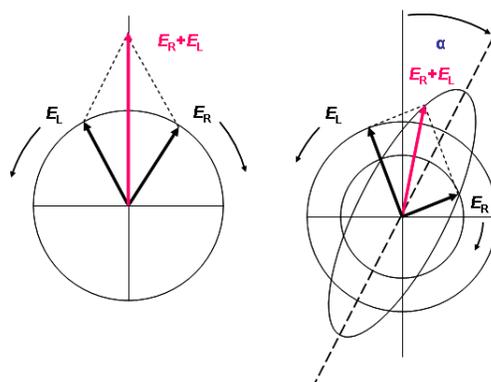


Figura 5: Representación de dicroísmo circular. (E_L : Luz circularmente polarizada hacia la izquierda, E_R : Luz circularmente polarizada hacia la derecha)

A través del sistema de detección de DCE se puede utilizar la técnica denominada *stopped-flow*, en donde la fracción enantiomérica del compuesto analizado, posterior a la separación a través del HPLC quiral, es atrapada al interior de la celda del detector, permitiendo la medición del espectro total de DCE (**Fig. 6**). La técnica de *stopped-flow* es llevada a cabo apagando en forma manual las bombas del equipo de HPLC, con el fin de detener el flujo y mantener la fracción enantiomérica correspondiente dentro de la celda para la medición del espectro de DCE, y por lo tanto, esta técnica es extremadamente útil cuando ambos enantiómeros no se encuentran aislados y no disponibles para un análisis por separado. (Bertucci & Tedesco, 2012)

El fenómeno de DC puede suceder en otras longitudes de onda de la luz, como en el caso del **dicroísmo circular vibracional** (DCV), donde las mediciones se realizan en la región infrarroja provocando en las moléculas transiciones vibracionales, al contrario del **dicroísmo circular electrónico** (DCE), en donde la luz en la región ultravioleta y visible produce transiciones electrónicas en las moléculas analizadas. (Tranter, 2010)

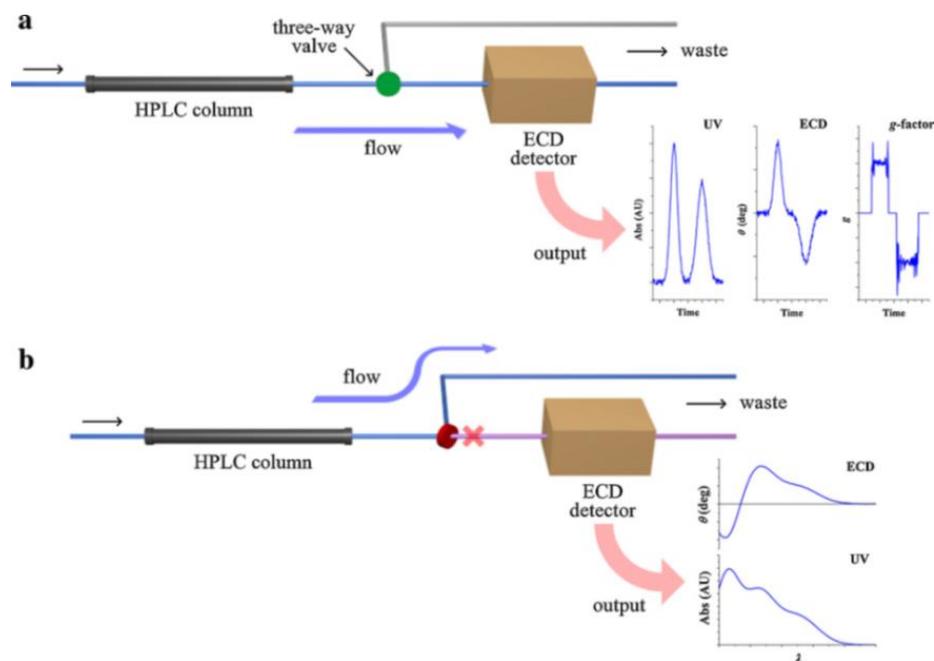


Figura 6: Esquema gráfico del sistema HPLC-DCE. (a) Obtención de los perfiles cromatográficos por detección en línea de absorbancia, DCE a una sola longitud de onda. (b) Medición simultánea de los espectros de DCE y UV por la técnica de *stopped-flow*. (Bertucci & Tedesco, 2012)

Por lo anterior, desde su aparición el DCV se ha convertido en una poderosa técnica, ya que presenta un gran número de bandas útiles para su análisis, las que además pueden ser calculadas mediante métodos mecánico-cuánticos de bajo costo computacional, siendo estas dos ventajas por sobre el DCE (Allenmark & Gawronski, 2008). Adicionalmente, ya que las mediciones de DCV se realizan dentro de la región infrarroja es posible analizar a prácticamente todas las moléculas orgánicas, al contrario del DCE, en donde solo se pueden analizar compuestos que solo presenten en su estructura un cromóforo que absorba dentro del rango instrumental. No obstante, esta técnica presenta algunas desventajas como el extenso tiempo en realizar un análisis y de ser un instrumento más costoso en comparación con el espectrofotómetro de DCE.

Un significativo avance para la caracterización estereoquímica de compuestos orgánicos quirales, como también para la industria farmacéutica dentro del área de la detección de nuevas drogas y control de calidad, fue conseguido al acoplar el equipo de HPLC junto a un sistema de

detección basado en las propiedades quirópticas en línea, como la rotación óptica (RO) y el dicroísmo circular electrónico (DCE). (Salvadori, *et al.*, 1984) (Bertucci, *et al.*, 1994)

Una importante ventaja que presenta esta técnica es el poder medir las propiedades quirópticas de drogas quirales posterior a la separación conseguida por el equipo de HPLC quiral, en particular cuando se desconoce la configuración absoluta de los enantiómeros. De esta forma, con solo una pequeña cantidad de muestra, es posible determinar el valor y signo de ambas propiedades quirópticas para cada uno de los enantiómeros, mediante el acoplamiento en línea de los detectores de DCE y de RO, metodología que ha sido mencionada como HPLC-DCE-RO (Muñoz, *et al.*, 2013). Posteriormente, tras la separación de los enantiómeros y de la determinación de sus propiedades quirópticas experimentales, es necesario tener un punto de comparación para poder elucidar y asignar la configuración absoluta de cada uno de los enantiómeros. Es por esto que además, se deben realizar cálculos mecánico-cuánticos a través de métodos computacionales para la determinación teórica de las propiedades quiroópticas y así poder realizar una comparación con los respectivos espectros de DCE y RO experimentales. (Fig. 7)

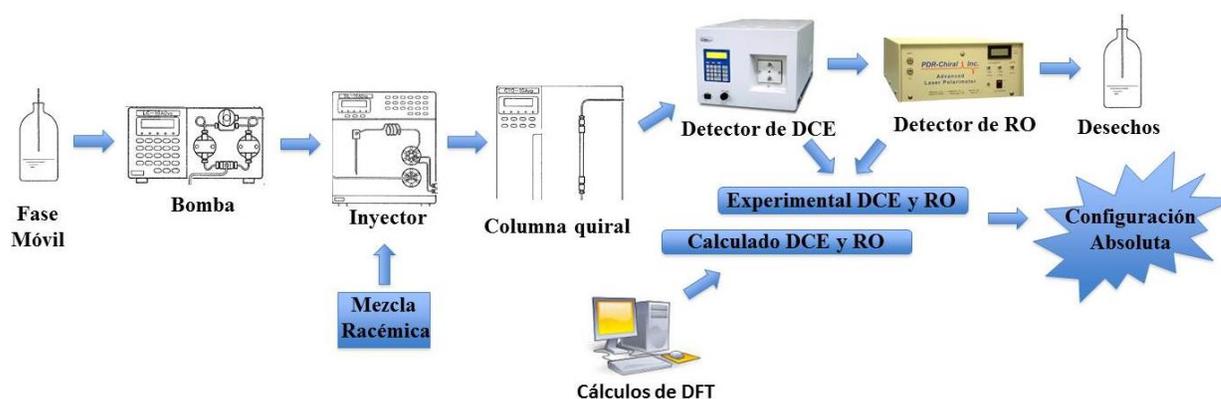


Figura 7: Representación de la metodología HPLC-DCE-RO/DFT quiral para la determinación de la configuración absoluta de una mezcla racémica.

Las comparaciones entre los diversos tipos de espectros experimentales y teóricos, pueden ser realizadas en forma visual o matemática. Sin embargo, en cuanto a los espectros de DCE, en donde se puede observar la presencia de una o más bandas, estos son en general fácilmente comparables en forma visual, sin la necesidad de utilizar comparaciones matemáticas. Por otra

parte, en el caso de los espectros de DCV y ROA, en donde se obtiene una mayor cantidad de bandas con respecto al de DCE, la comparación visual es bastante dificultosa y engorrosa, y por lo tanto, es necesaria la utilización de comparaciones matemáticas como el *factor de similitud*, el cual ayuda a cuantificar el grado de similitud que presenta el espectro calculado teóricamente con el obtenido experimentalmente. La determinación del *factor de similitud* es conseguida más fácilmente mediante el software comercial llamado *SpecDis*. (Bruhn, *et al.*, 2013) (Debie, *et al.*, 2011)

Estos métodos computacionales se basan en la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT), métodos que en principio son aplicables a prácticamente cualquier molécula, pero que tienden a ser muy exigentes computacionalmente, lo que en la práctica limita su aplicación a sistemas moleculares medianos y pequeños. Sin embargo, estos cálculos pueden conducir a predicciones de alta precisión y a un costo relativamente razonable. Para realizar estos cálculos mecánico-cuánticos deben utilizar una funcional y un conjunto de bases. Dentro de las funcionales con mejores resultados son las llamadas híbridas, como B3LYP, BH&HLYP, MPW1PW91, PBE0, mientras que el conjunto de bases comúnmente empleados son del tipo *split-valence* e incluyen funciones del tipo *polarizada* y *difusas*, por ejemplo, en orden de menor a mayor tamaño, 6-31G+(d,p), TZVP, 6-311G++(2df,2pd), aug-cc-pVDZ y aug-cc-pVTZ. Mientras mayor sea el conjunto de bases más preciso son los resultados obtenidos, pero mayor es el tiempo del cálculo. (Berova, *et al.*, 2007)

En consideración a lo anterior, dentro del desarrollo de la presente tesis se realizó un estudio a través de la metodología de HPLC-DCE-RO/DFT quiral, de cuatro mezclas racémicas de interés farmacológico, con la finalidad de elucidar y asignar la configuración absoluta de cada uno de los enantiómeros que las componen.

Dentro de los compuestos estudiados, en primer lugar se encuentra el (\pm)-**óxido *trans*-estilbeno (1)**, comercializado como mezcla racémica de los enantiómeros (*1R,2R*)-**1** y (*1S,2S*)-**1** (**Fig. 8**). Este es un compuesto sintético con actividad pro-estrogénica, usado experimentalmente como inductor de enzimas metabolizadoras de fármacos en hígados de ratas y ratones, y por lo tanto, calificado como un compuesto tipo-fenobarbital, debido a que induce la expresión de mRNA de la enzima Cyp2B en hígado de las ratas. (Slitt, *et al.*, 2006) A su vez, es un importante

reactivo intermediario para la síntesis de compuestos quirales, tales como fármacos, pesticidas y selectores quirales. (Wang, *et al.*, 2009)

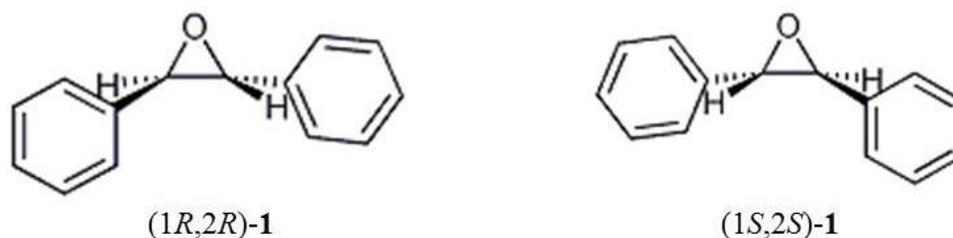


Figura 8: Representación de los enantiómeros de **1**.

El segundo compuesto estudiado es la (\pm)-**5-metil-5-fenil-hidantoína (2)**, comercializado como mezcla racémica de los enantiómeros (*5S*)-**2** y (*5R*)-**2** (**Fig. 9**). Es una droga que presenta acción antiepiléptica y además, es una importante droga intermediaria en la síntesis de penicilinas y cefalotina (cefalosporina de primera generación). Exhibe dentro de su estructura uno de los heterociclos más importante y clave dentro de la química medicinal, correspondiente a la hidantoína (imidazolidina-2,4-diona), estructura que forma parte de diversos compuestos biológicamente activos, como los agentes antibacteriales, antifúngicos y como se mencionó anteriormente antiepilépticos. (Hmuda, *et al.*, 2013)

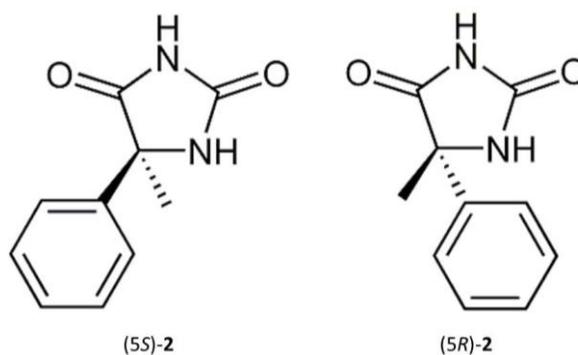


Figura 9: Representación de los enantiómeros de **2**.

En tercer lugar, se encuentra la (\pm)-**6 β -hidroxi-tropinona (6-hidroxi-8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3-ona) (3)**, un bicyclico sintético comercializado como una mezcla racémica de dos enantiómeros, el (*1R,5R,6S*)-**3** y el (*1S,5S,6R*)-**3** (**Fig. 10**). Este compuesto forma parte del grupo de los alcaloides derivado de la estructura del tropano, presentando la estructura 8-

azabicyclo-[3.2.1]-octano como elemento estructural clave. (Pollini, *et al.*, 2005) En cuanto a sus propiedades farmacológicas, se clasifican como antagonistas muscarínicos, inhibiendo en forma competitiva los receptores colinérgicos muscarínicos, pero a dosis elevadas pueden bloquear a los receptores nicotínicos. (Florez, 2008)

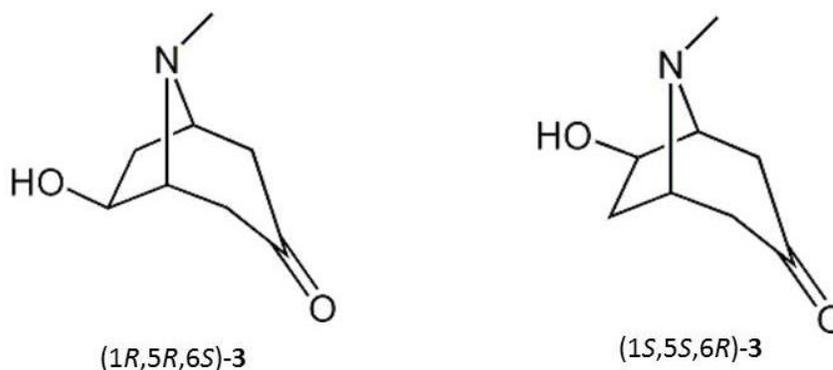


Figura 10: Representación de los enantiómeros de 3.

Como cuarta y última molécula estudiada, se encuentra (\pm)-1-(2-(5-metilisoxazol-3-il)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)pirrolidin-2-ona (4), compuesto orgánico sintético que según recientes estudios presenta una actividad antifúngica, con un gran potencial comercial dentro de la industria agroalimentaria. Dentro de su estructura química se encuentra un grupo llamado tetrahydroquinolina (THQ), al cual se le atribuyen diversas actividades biológicas como ser antimalárico, antibacterial, antiviral, antitumoral, entre otras. (Gutierrez, *et al.*, 2011) El compuesto 4 presenta dos centros asimétricos, por lo que teóricamente existe la posibilidad de presentar cuatro diferentes isómeros (**Fig. 11**). Dos de ellos, el par de enantiómeros (2R,4R)-4 y (2S,4S)-4, presentan una disposición *cis* de los dos sustituyentes enlazados al grupo THQ en las posiciones de los carbonos 2 y 4, mientras que el par de enantiómeros (2R,4S)-4 y (2S,4R)-4, presentan una disposición *trans* de éstos mismos sustituyentes.

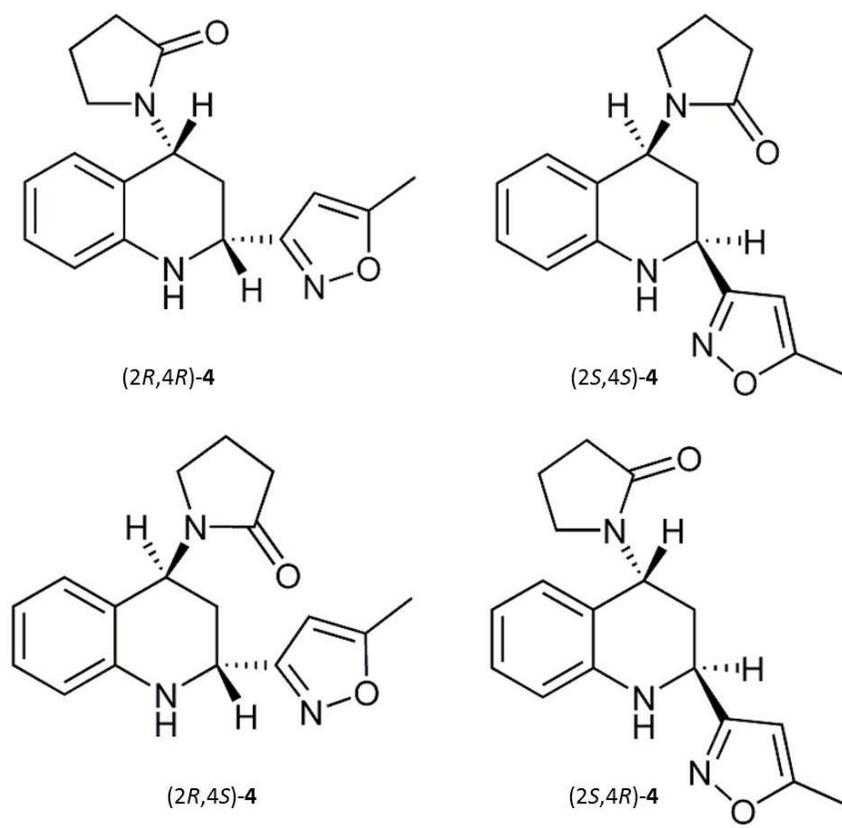


Figura 11: Representación de los isómeros de 4.

3. OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Hipótesis:

Mediante la metodología de HPLC-DCE-RO/DFT quiral se consigue asignar la configuración absoluta de los enantiómeros que componen a las mezclas racémicas de (\pm)-óxido *trans*-estilbeno, (\pm)-6 β -hidroxi-tropinona, (\pm)-5-metil-5-fenil-hidantoína y (\pm)-*cis*-1-(2-(5-metilisoxazol-3-il)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)pirrolidin-2-ona.

Objetivo general:

El objetivo general es la asignación de la configuración absoluta de las cuatro mezclas racémicas en estudio mediante la metodología de HPLC-DCE-RO/DFT quiral.

Objetivos específicos:

- Obtención de las condiciones cromatográficas adecuadas para el estudio quiroóptico de las mezclas racémicas de (\pm)-óxido *trans*-estilbeno, (\pm)-6 β -hidroxi-tropinona, (\pm)-5-metil-5-fenil-hidantoína y (\pm)-*cis*-1-(2-(5-metilisoxazol-3-il)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)pirrolidin-2-ona.
- Medición de las propiedades quiroópticas (DCE y RO) experimentales para cada uno de los enantiómeros de (\pm)-óxido *trans*-estilbeno, (\pm)-6 β -hidroxi-tropinona, (\pm)-5-metil-5-fenil-hidantoína y (\pm)-*cis*-1-(2-(5-metilisoxazol-3-il)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)pirrolidin-2-ona.
- Determinación de las propiedades quiroópticas teóricas (DCE y RO) de los enantiómeros mediante el uso de cálculos mecánico-cuánticos de DFT en las siguientes mezclas racémicas; (\pm)-óxido *trans*-estilbeno, (\pm)-6 β -hidroxi-tropinona, (\pm)-5-metil-5-fenil-hidantoína y (\pm)-*cis*-1-(2-(5-metilisoxazol-3-il)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-il)pirrolidin-2-ona.

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1 MATERIALES.

4.1.1. Reactivos.

Tres de los cuatro compuestos utilizados para los análisis son mezclas racémicas sintéticas comerciales de (\pm)-óxido *trans*-estilbeno con un 98% de pureza, (\pm)-6 β -hidroxi-tropinona con un 99% de pureza y (\pm)-5-metil-5-fenil-hidantoína con un 99% de pureza, que fueron obtenidos de la empresa Sigma Aldrich.

Sin embargo, el cuarto compuesto estudiado corresponde al (\pm)-1-(2-(5-metilisoxazol-3-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)pirrolidin-2-ona (**4**), compuesto que fue sintetizado en el Laboratorio de Bio-orgánica de la Universidad Austral de Chile. Esta síntesis química fue realizada mediante la adición en un balón de destilación de 16 mL de acetonitrilo, los reactivos anilina (0,30 mL; 3,23 mmol) y 5-metilisoxazol-3-carboxaldehído (0.323 g; 2,90 mmol), bajo agitación magnética a temperatura ambiente por 30 minutos. Enseguida, se añadió 20 mol% de BiCl₃. Por otra parte, en un balón de destilación que contenía 11,5 mL de acetonitrilo se agregó una solución de N-vinil-2-pirrolidona (3,23 mmol) agregándose gota a gota por 20 minutos al primer balón y la mezcla resultante se agitó por 24 horas, obteniéndose un sólido incoloro con un rendimiento del 35 % y cristalizado en metanol. PF: 157 °C. (**Fig. 12**).

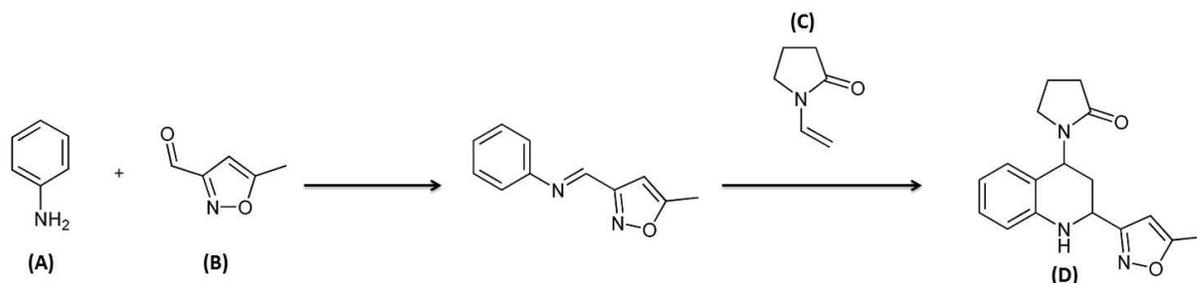


Figura 12: Representación general de la reacción de Diels-Alder en la formación de (\pm)-**4**. (**A**): Anilina; (**B**): 5-metilisoxazol-3-carboxaldehído; (**C**): N-vinil-2-pirrolidona; (**D**): (\pm)-1-(2-(5-metilisoxazol-3-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)pirrolidin-2-ona (**4**).

Por otra parte, los disolventes cromatográficos utilizados en los diferentes análisis fueron; n-hexano, 2-propanol, metanol y dietilamina (DEA), todos fueron obtenidos del laboratorio

Merck, los que previos a ser usados en el equipo de HPLC son desgasificados por 5 minutos en un sonicador de ultrasonido.

4.1.2 Equipos.

4.1.2.1 Equipamiento general.

Los análisis cromatográficos fueron realizados en un equipo de HPLC marca Shimadzu, compuesto por un desgasificador DGU-14A, bombas LC-20AT y LC-10AD, un inyector automático SIL-10AD, un horno para la columna CTO-10AC y un detector UV-vis SPD-20A, conectados a un computador que posee el software *LC Solutions*, con el cual se controla y monitoriza el equipo de HPLC y además de recopilar los datos obtenidos en cada uno de los análisis cromatográficos realizados.

Conjuntamente, el equipo de HPLC se encuentra acoplado en línea con dos detectores diferentes, el primero de ellos corresponde al detector de DC Jasco modelo CD-2095 Plus y el segundo corresponde a un detector polarimétrico Advanced Laser Polarimeter (ALP). En ambos los datos experimentales obtenidos son almacenados y controlados a través del mismo computador mencionado anteriormente, pero con otro software llamado *JASCO Chrompass*.

En cuanto a las columnas quirales utilizadas para los diferentes análisis cromatográficos fueron la ChiralPak AD-H (4.6 μm de diámetro interno por 250 mm de longitud y 5 μm de diámetro de partícula) de Daicel Chemical Industries, LTD. y la Chirobiotic V (4.6 mm de diámetro interno por 150 mm de longitud y 5 μm de diámetro de partícula) de Astec's Chirobiotic™.

El pesaje de las muestras estudiadas, se llevó a cabo sobre una balanza analítica Precisa modelo XB 220A, mientras que para desgasificar los disolventes utilizados como fases móviles, se utilizó un Desgasificador Branson 2510.

4.2 MÉTODOS.

4.2.1 Análisis Cromatográficos.

Para cada una de las muestras estudiadas se pesaron 5 mg que luego fueron diluidas de acuerdo a la fase móvil utilizada en cada análisis cromatográficos. Las condiciones de separación

cromatográficas para cada una de estas mezclas racémicas se encuentran detalladas en la siguiente tabla (**Tabla 1**). La temperatura con la que se realizaron los análisis cromatográficos fue a los 25°C.

Compuesto analizado	Columna quiral	Fase Móvil	Flujo	Detección UV-Vis (λ)
(±)-1	Chiralpak AD-H	n-hexano/2-propanol (90:10)	1 ml/min	254 nm
(±)-2	Chirobiotic V	Metanol (100)	1 ml/min	254 nm
(±)-3	Chiralpak AD-H	n-hexano/2-propanol/DEA (90:10:0,1)	1 ml/min	254 nm
(±)-4	Chiralpak AD-H	n-hexano/2-propanol/DEA (70:30:0,1)	1 ml/min	254 nm

Tabla 1: Condiciones dispuestas en el equipo de HPLC en los análisis realizados.

La detecciones UV-vis y de DC fueron realizadas simultáneamente a los 254 nm, mientras que la detección polarimétrica se realizó a los 670 nm.

4.2.2 Determinación del valor de la rotación específica $[\alpha]$ en base al cromatograma de RO experimental.

La obtención del valor de la rotación específica $[\alpha]$ experimental en base al cromatograma de RO de ambos enantiómeros, se realizó mediante la metodología propuesta por Patrick D. Rice, *et al.* en la publicación “*Specific rotation measurements from peak height data, with a gaussian peak model*” el año 1989. (Rice, *et al.*, 1989)

De acuerdo a la teoría, la rotación específica $[\alpha]$ se define como la siguiente ecuación:

$$[\alpha]_t^\lambda = \frac{\alpha}{lc}$$

Sin embargo, esta ecuación puede ser aplicada directamente sólo en polarímetros convencionales, en donde la rotación angular del plano de luz polarizada plana que genera una muestra quiral de concentración conocida es medida en un sistema estático. Por lo tanto, la ecuación no puede ser utilizada fácilmente en sistemas dinámicos como sucede con el equipo de HPLC, generando una limitación significativa a este equipo, el que proporciona una manera precisa y reproducible de analizar muestras en cantidades de micro-volúmenes en un sistema polarimétrico dinámico.

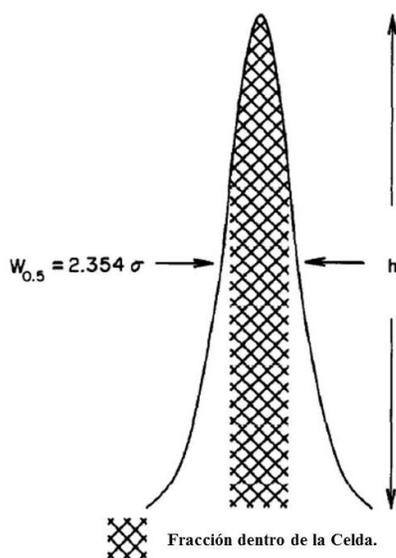


Figura 13: Distribución Gaussiana caracterizada por el ancho de la mitad de la altura ($W_{0.5}$) igual a $2,345\sigma$; h corresponde al valor máximo de la distribución. (Rice, *et al.*, 1989)

El perfil que forma el analito dentro de un sistema de flujo dinámico pueden ser variados y complejos, sin embargo, en ausencia de interferencias se genera un proceso difuso, formando una distribución gaussiana a través de la fase móvil (**Fig. 13**). La ecuación fundamental para el tratamiento matemático de los procesos difusos se encuentra definida en la segunda ley de Fick, generando una ecuación en donde se describe el perfil entre la concentración versus el tiempo o volumen en sistemas de flujos dinámicos.

$$c = \frac{M}{\sigma_v \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{1}{2} \left[\frac{V - V_R}{\sigma_v}\right]^2\right)$$

donde M es la masa inyectada, V_R es el volumen de retención promedio, V es el volumen eluído en el que la concentración c es determinada y σ_v es la desviación estándar de la distribución en unidades de volumen. La conversión de volumen a unidades de tiempo puede llevarse a cabo, si se desea, mediante la división del volumen por el flujo.

Con el valor del dato correspondiente al área del peak, la concentración de la muestra inyectada puede ser substituida por c , ya que toda la masa inyectada (*concentración x volumen de inyección*) debe estar representada en el total del peak. Sin embargo, aprovechar la ventaja de usar la altura del peak como un parámetro analítico es necesario para poder determinar la fracción del total de la masa inyectada que se encuentra dentro de la celda cuando ocurre la máxima señal. Esta fracción de masa dividida por el volumen de la celda nos entrega la concentración en el punto máximo de señal.

Por lo tanto, la ecuación anteriormente señalada debe ser integrada simétricamente sobre el volumen de celda, para determinar la fracción del total de masa inyectada que se encuentra en el interior de la celda.

$$c_{celda}^{m\acute{a}x\ se\tilde{n}al} = \frac{masa\ inyectada\ (gr)}{volumen\ celda\ (mL)} \left\{ \frac{1}{\sigma_v \sqrt{2\pi}} \times \int_0^{V_{celda}} \exp - \frac{1}{2} \left[\frac{(V - V_{celda}/2)}{\sigma_v} \right]^2 dV \right\}$$

Esta última ecuación, demuestra que la integración sobre el volumen de la celda determina la distribución que presenta el analito en la celda cuando se produce la máxima señal. Sin embargo, esta integral no puede ser desarrollada fácilmente, porque no hay una forma analítica para ello. Afortunadamente, esta ecuación puede ser transformada por la sustitución de la variable normal z de acuerdo a la siguiente relación.

$$z = \frac{V - V_{celda}/2}{\sigma_v}$$

Por lo tanto, la ecuación de la concentración en la celda cuando ocurre la máxima señal ($c_{celda}^{m\acute{a}x\ se\tilde{n}al}$) se convierte en la siguiente:

$$c_{celda}^{m\acute{a}x\ se\tilde{n}al} = \frac{masa\ inyectada\ (gr)}{volumen\ celda\ (mL)} \left\{ \frac{1}{\sigma_v \sqrt{2\pi}} \times \int_{z_1}^{z_2} e^{-\left(\frac{z}{2}\right)^2} dz \right\}$$

Esta última ecuación representa una distribución normal transformada y en donde las tablas del área bajo una distribución normal estándar, como una función de z se pueden utilizar para evaluar el término dentro de los corchetes. Para esto, el peak debe ser caracterizado de acuerdo a su desviación estándar, σ_v . Esto es fácilmente logrado por la medición del ancho de la mitad de la altura, $W_{0,5}$ y utilizando la siguiente relación:

$$W_{0,5} = 2,345\sigma$$

Finalmente, la ecuación para la obtención de la rotación específica $[\alpha]_t^\lambda$ en un polarímetro donde ocurre un proceso dinámico es la siguiente:

$$[\alpha]_t^\lambda = \frac{R}{lc_{celda}^{máx. señal}}$$

donde R (deg) corresponde a la rotación evaluada desde la altura máxima del peak cromatográfico calibrado frente a la respuesta de Faraday y la $c_{celda}^{máx. señal}$ a la concentración de la muestra que se encuentra en el interior de la celda cuando ocurre la máxima intensidad de la señal, determinada mediante el uso de la desviación estándar que presenta el peak (σ_v) como se describe anteriormente.

4.2.3 Cálculo de las propiedades quiroópticas de cada uno de los enantiómeros de una mezcla racémica.

La obtención de los espectros de DCE teóricos fueron realizados mediante el uso de cálculos mecánico-cuánticos en el modelo de la teoría funcionales de la densidad (DFT), que son capaces de combinar un grado razonable de precisión en la predicción de las energías de excitación y de las fuerzas rotacionales, todo esto con una relativa baja demanda computacional.

Por lo tanto, en primer lugar se modela a uno de los dos posibles enantiómeros del compuesto estudiado, mediante el software computacional *Spartan*'14. Posteriormente, en el mismo software se lleva a cabo una distribución conformacional del enantiómero modelado realizando una búsqueda sistemática conformacional, con la finalidad de obtener y conocer todas las posibles conformaciones que presenta el enantiómero modelado. A cada una de las conformaciones obtenidas se les realiza una optimización de geometría a un determinado nivel de

teoría con el software *ORCA* (Neese, 2012) (B3LYP/DZVP) para (\pm)-**1**, (\pm)-**2** y (\pm)-**3** y *Gaussian'03* (Revision C.02, *et al.*, 2004) (B3LYP/aug-cc-pVDZ) para (\pm)-**4**, todo esto para lograr obtener las energías libres que presenta cada conformación optimizada de geometría.

Tras la determinación de las energías libres para cada conformación y mediante el uso de la distribución de Boltzmann se determinó la abundancia relativa que presenta cada una de las conformaciones con respecto a sus energías. Las conformaciones que presentan una menor energía tienen una mayor abundancia y son consideradas para los pasos posteriores, descartándose aquellas que presentan una menor incidencia dentro de la distribución (< 1 %).

La precisión de estos cálculos mecánico-cuánticos dentro del modelo de DFT dependen del nivel de teoría al que son realizados, es decir, de la combinación de funcionales y bases utilizadas. En este trabajo, se realizaron los cálculos con un nivel de teoría B3LYP/aug-cc-pVDZ y B3LYP/TZVP; ambos han demostrado ser eficientes en la predicción de las propiedades quiroópticas en varios sistemas con anterioridad. (Berova, *et al.*, 2007) (Srebro, *et al.*, 2011)

Por lo tanto, sobre las conformaciones de menores energías seleccionadas anteriormente, se efectuaron los respectivos cálculos teóricos para obtener el espectro de DCE y la RO específica. En el caso del espectro de DCE, se calcularon las diez primeras transiciones electrónicas a través de los programas *NWChem* (Valiev, *et al.*, 2010) para (\pm)-**1**, (\pm)-**2** y (\pm)-**3** a un nivel de teoría B3LYP/TZPV y con *ORCA* a un nivel de teoría B3LYP/aug-cc-pVDZ para (\pm)-**4**, graficando cada una de estas intensidades electrónicas como una banda gaussiana con un ancho estándar apropiado (15 nm) para cada conformaciones mediante el software *Gabedit* (Allouche, 2011).

Por otro parte, los valores de RO específica $[\alpha]$ dependen de la longitud de onda a la que se realiza el cálculo; en este caso se realizó a los 670 nm, con el fin de poder comparar los valores calculados con los valores obtenidos experimentalmente tras la detección a la misma longitud de onda. Los cálculos teóricos de la rotación específica $[\alpha]_{670}$ se efectuaron sobre las mismas conformaciones optimizadas de geometría seleccionadas anteriormente para el espectro de DCE, en (\pm)-**1**, (\pm)-**2** y (\pm)-**3** se efectuaron mediante el software *NWChem* a un nivel de teoría B3LYP/aug-cc-pVDZ y para (\pm)-**4** con el software *Gaussian'03* al mismo nivel de teoría.

Finalmente, los valores obtenidos de DCE y RO de cada conformación se calculan en base a la incidencia en la distribución de Boltzmann para obtener el espectro ponderado final de DCE y el valor ponderado final de la RO del enantiómero seleccionado.

5. RESULTADO Y DISCUSIÓN.

5.1 (\pm)-Óxido *trans*-estilbeno

5.1.1 Resolución cromatográfica enantioselectiva de (\pm)-óxido *trans*-estilbeno.

La separación enantioselectiva quiral de (\pm)-**1** fue realizada en un equipo de HPLC utilizando una columna ChiralPak AD-H (fase estacionaria quiral recubierta físicamente por amilosa tris-(3,5-dimetil-fenil carbamato) sobre un soporte de 5 μm de gel de sílice) y una fase móvil compuesta de n-hexano/2-propanol, en una proporción de 90:10 respectivamente. Estas condiciones de separación enantioselectiva son bien conocidas debido a que (\pm)-**1**, es utilizado para testear las condiciones que presentan fases estacionarias quirales bajo condiciones de fase normal. (Liu & Zou, 2008) (Gong, *et al.*, 2013)

En el cromatograma de detección UV-vis a 254 nm (**Fig. 14**), se pueden observar la presencia de dos peak cromatográficos, el primero con un tiempo de retención a los 5,5 minutos y un segundo peak a los 10,4 minutos, pertenecientes a cada uno de los dos enantiómeros de la mezcla racémica, mostrando una exitosa separación enantioselectiva de estos.

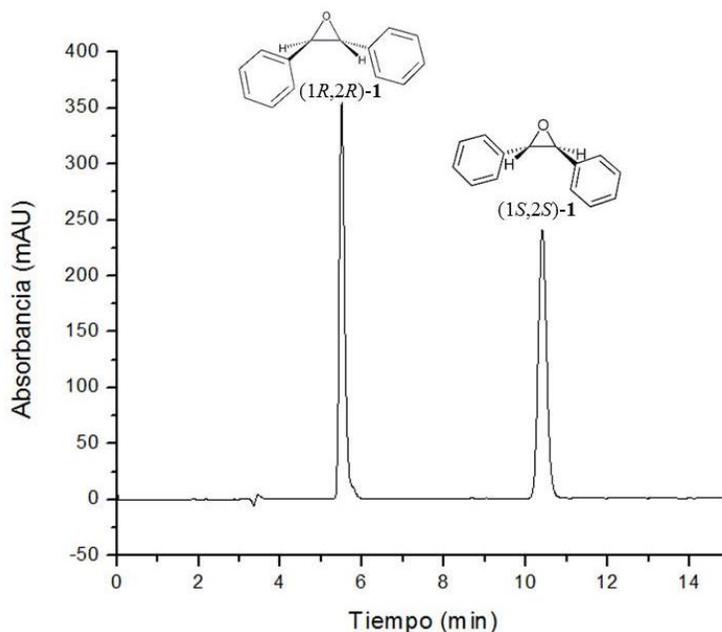


Figura 14: Resolución cromatográfica enantioselectiva tras una inyección de 5,4 μg de (\pm)-**1** conseguida mediante detección UV-vis a 254 nm.

5.1.2 Determinación cromatográfica experimental de las propiedades quiroópticas de los enantiómeros de (\pm)-1.

La medición experimental de las propiedades quiroópticas de cada uno de los enantiómeros de (\pm)-1 es de vital importancia para la asignación de la configuración absoluta de cada uno de ellos. Por lo tanto, se realizaron nuevas mediciones cromatográficas, esta vez utilizando las detecciones de DC a los 254 nm y de RO a los 670 nm. En el caso del cromatograma de DC, se observan a un mismo tiempo de retención que en el anterior cromatograma, un primer peak cromatográfico con una señal positiva y un segundo peak con una clara señal negativa (**Fig. 15**), a la longitud de onda escogida.

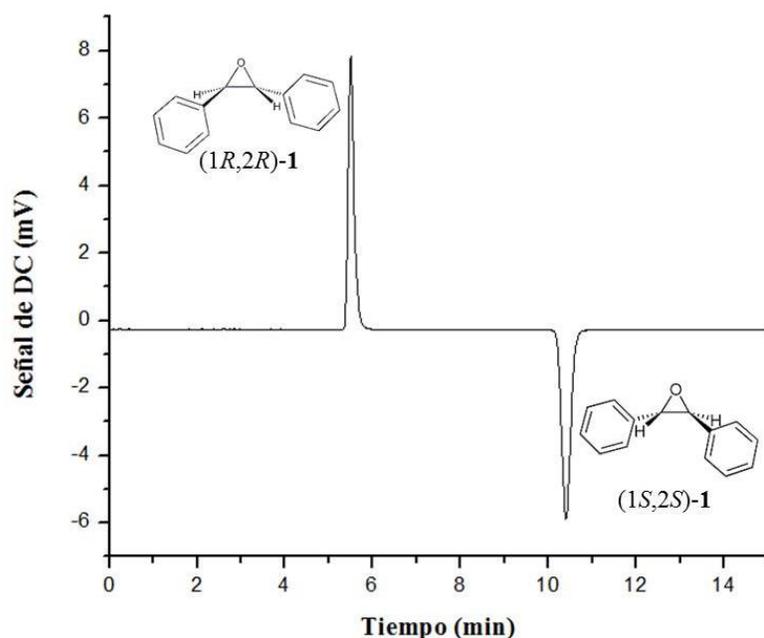


Figura 15: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 5,4 μg de (\pm)-1 conseguida mediante detección DC a 254 nm.

Por otra parte, tras una nueva inyección de (\pm)-1 se midieron los espectros de DCE experimentales de ambos enantiómeros mediante la técnica de *stopped-flow*. Estos dos espectros se presentan como líneas continuas en la **Fig. 16**; del primer peak cromatográfico se obtiene un espectro de DCE con un efecto Cotton positivo entre los 220 nm y los 280 nm (**Fig. 16 línea continua roja**), mientras que del segundo peak se obtiene un espectro con un efecto contrario al

anterior, o sea un efecto Cotton negativo entre el mismo rango de longitudes de onda. (Fig. 16 línea continua azul)

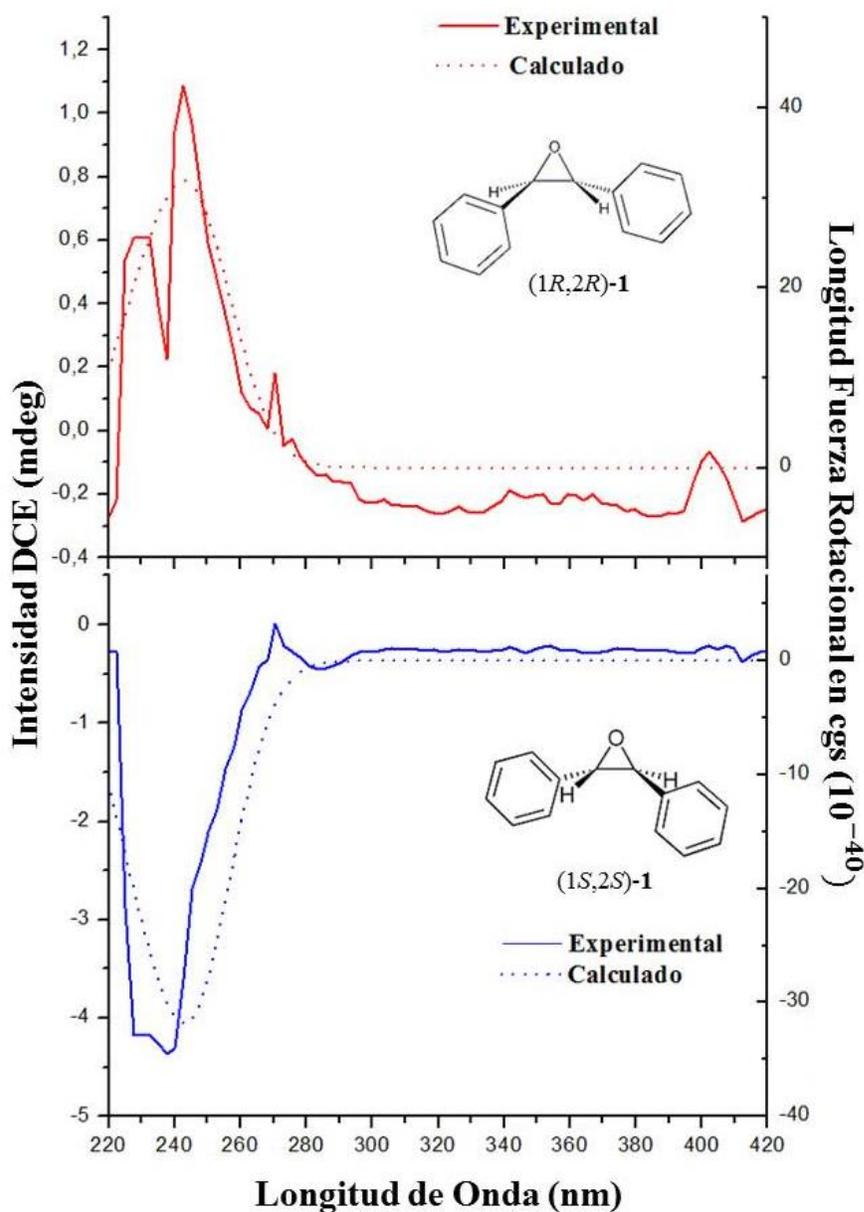


Figura 16: Comparación de espectros de DCE calculado y experimentales de los enantiómeros (1R,2R)-1 y (1S,2S)-1.

Simultáneamente, con la misma inyección de (\pm)-1 con la que se consiguió el cromatograma de DC, se obtuvo el cromatograma de RO tras la detección del detector polarimétrico laser a los 670 nm tras la separación en HPLC quiral, el que mostró un primer peak

cromatográfico positivo, correspondiente al isómero dextrorrotatorio, (+)-**1** y un segundo peak es negativo, perteneciente al isómero levorrotatorio, (-)-**1**. (**Fig. 17**)

Posteriormente, mediante el método de las bandas gaussianas fue posible la determinación de la rotación específica $[\alpha]_{670}$ experimental de ambos enantiómeros correspondiente a los dos peak cromatográficos (**Fig. 17**), obteniéndose que en el peak cromatográfico del isómero dextrorrotatorio una $[\alpha]_{670}$ de 209,22 deg/[dm(gr/cm⁻³)], mientras que en el peak levorrotatorio una $[\alpha]_{670}$ de -213,32 deg/[dm(gr/cm⁻³)]. Por lo tanto, revelando que ambos enantiómeros de (\pm)-**1** presentan una alta actividad óptica, que puede deberse a que dentro de su estructura presenta dos cromóforos (los dos grupos fenilos) que forman una estructura asimétrica, esperando que el acoplamiento de las fuerzas de Coulomb en los momentos de excitación de estos cromóforos incidan fuerte y principalmente sobre la actividad óptica de la molécula. (Gottarelli & Mason, 1970)

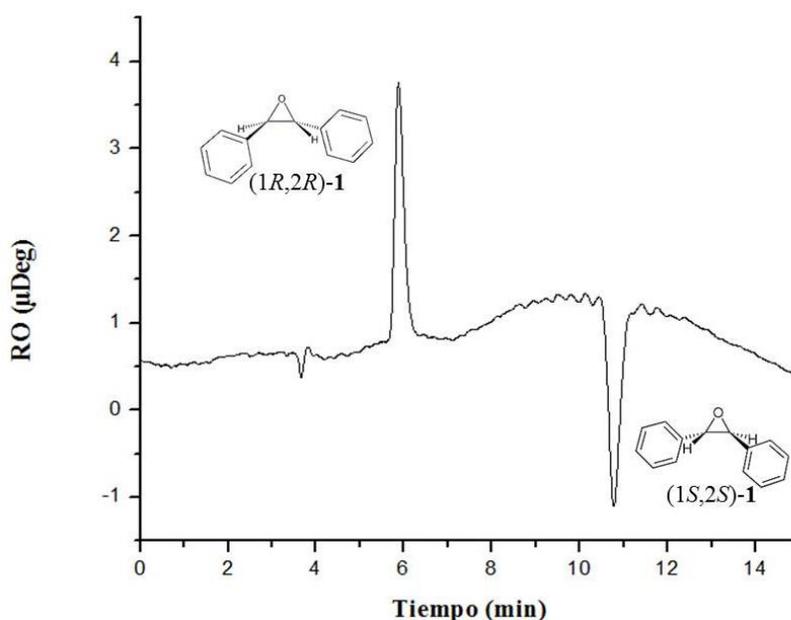


Figura 17: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 5,4 μg de (\pm)-**1** conseguida mediante detección RO a 670 nm.

5.1.3 Cálculo de las propiedades quiroópticas teóricas de (1R,2R)-**1**

La búsqueda conformacional sistemática del enantiómero (1R,2R)-**1** mostró solo una conformación de menor energía (-385834,55 Kcal/mol) en las primeras 10 kcal/mol de energía

(Fig. 18), por ende ésta única conformación fue utilizada para los cálculos de las propiedades quiroópticas. Fue posible la determinación del espectro de DCE de (1*R*,2*R*)-**1** (Fig. 16 líneas punteadas rojas), que fue calculado a un nivel de teoría B3LYP/TZVP, pudiendo ser contrastado finalmente con los dos espectros de DCE obtenidos en forma experimental. Tras esta comparación, se evidenció que el espectro de DCE calculado para (1*R*,2*R*)-**1** posee similares características en cuanto a su orientación y signo con el espectro experimental del primer peak cromatográfico, que de acuerdo al cromatograma de DC y RO sugiere que la configuración absoluta de **1** sería (+)-(1*R*,2*R*)-**1** y (-)-(1*S*,2*S*)-**1**

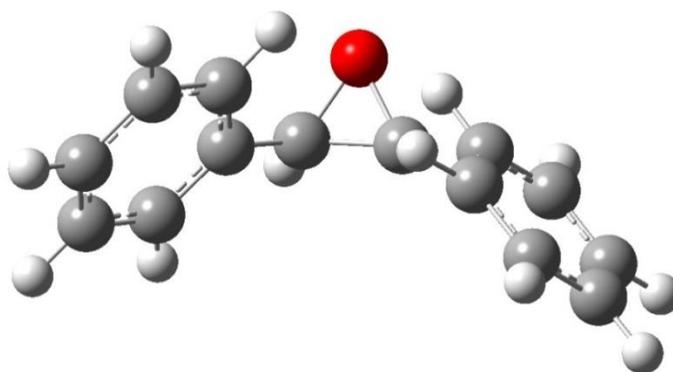


Figura 18: Conformación optimizada de geometría más estable de (1*R*,2*R*)-**1**.

Además, simultáneamente se realizó el cálculo teórico de la rotación específica $[\alpha]$, sobre la misma conformación de (1*R*,2*R*)-**1** al nivel de teoría B3LYP/aug-cc-pVDZ, obteniéndose una rotación específica $[\alpha]_{670}$ de 212,86 deg/[dm(gr/cm⁻³)], revelando que el enantiómero (1*R*,2*R*)-**1** es el isómero dextrorrotatorio de la mezcla racémica, resultado que coincide con la asignación de la configuración absoluta sugerida anteriormente en base al espectro de DCE del enantiómero (+)-(1*R*,2*R*)-**1**, reafirmando que los resultados obtenidos anteriormente son correctos.

Finalmente, la configuración absoluta obtenida mediante esta técnica coincide también con estudios anteriores realizados, en donde se señala que los dos átomos de carbono asimétricos en las posiciones 1 y 2 del enantiómero dextrorrotatorio (+)-**1**, presentan una configuración “*R*”. (Gottarelli & Mason, 1970) (Gong, *et al.*, 2013)

5.2 (\pm)-5-metil-5-fenil-hidantoína.

5.2.1 Resolución cromatográfica enantioselectiva de (\pm)-5-metil-5-fenil-hidantoína.

La resolución enantioselectiva de (\pm)-**2** fue realizada sobre la columna quiral Chirobiotic V, la cual presenta como selector quiral al antibiótico macrólido Vancomicina, columnas que presentan una alta capacidad de resolución y además son más estables. El análisis debe ser realizado con una fase móvil orgánica polar, compuesta en este caso por un 100% de metanol; por lo demás dentro de la literatura se describe que (\pm)-**2** ha sido enantioseparada exitosamente por columnas quirales basadas en antibióticos macrólidos. (Yiwen, *et al.*, 2007) (Astec, 2004)

En el cromatograma de detección UV-vis a los 254 nm (**Fig. 19**), se observa la presencia de dos peak, el primero con un tiempo de retención a los 2,6 minutos y un segundo peak a los 2,7 minutos, revelando la presencia de ambos enantiómeros presentes en la mezcla racémica comercial, pero no lográndose una separación enantioselectiva completamente exitosa, sino consiguiendo una pequeña separación la que nos entrega la posibilidad de comprobar si esta metodología es capaz en condiciones no ideales poder asignar la configuración absoluta de cada uno de los enantiómeros que presenta (\pm)-**2**.

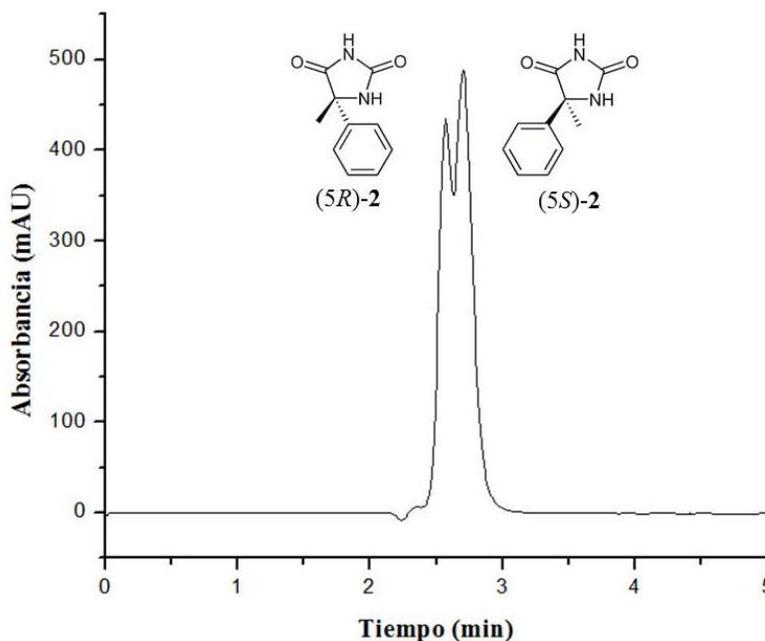


Figura 19: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 25,5 μ g de (\pm)-**2** conseguida mediante detección UV-vis a 254 nm.

5.2.2 Determinación cromatográfica experimental de las propiedades quiroópticas de los enantiómeros de (\pm)-2.

La detección de DC fue realizada sobre la mezcla racémica comercial (\pm)-2 a los 254 nm, tras la enantioseparación realizada por el HPLC quiral, observándose en el cromatograma un primer peak cromatográfico con un efecto Cotton negativo a los 2,6 minutos y un segundo peak con un efecto Cotton positivo a los 2,7 minutos, a la longitud de onda escogida. (**Fig. 20**)

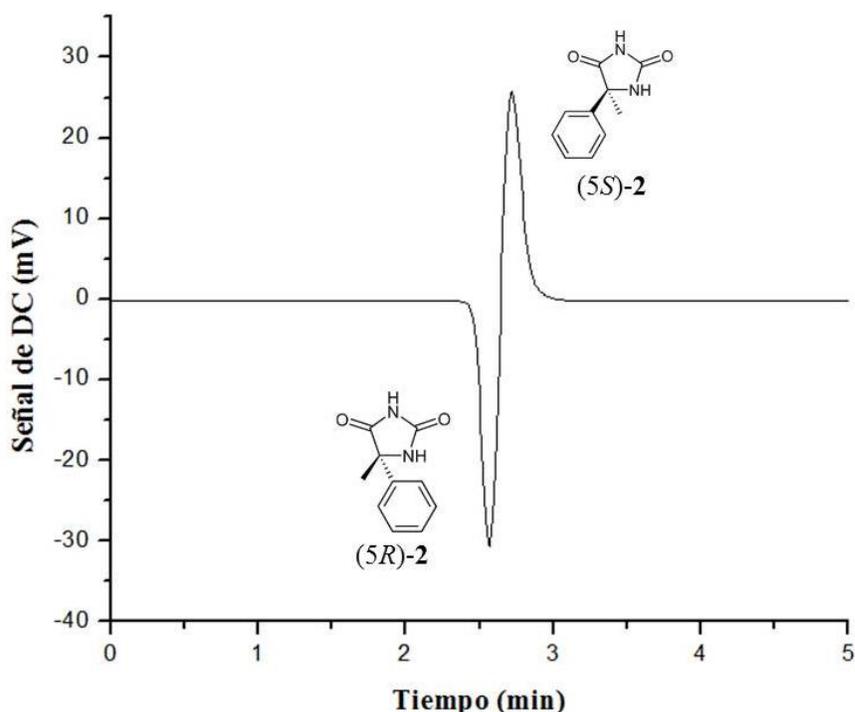


Figura 20: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 25,5 μ g de (\pm)-2 conseguida mediante detección DC a 254 nm.

Por otro lado, se obtuvieron los espectros experimentales de DCE de ambos enantiómeros de (\pm)-2, mediante la técnica de *stopped-flow* (**Fig. 21 líneas continuas**), en donde el espectro de DCE correspondiente al primer peak de DC, se observa un claro efecto Cotton negativo entre los 220 y 280 nm (**Fig. 21 línea continua azul**), y por lo tanto, en el caso del espectro perteneciente al segundo peak cromatográfico de DC, manifiesta un efecto Cotton contrario, o sea positivo entre las mismas longitudes de onda mencionadas anteriormente (**Fig. 21 línea continua roja**)

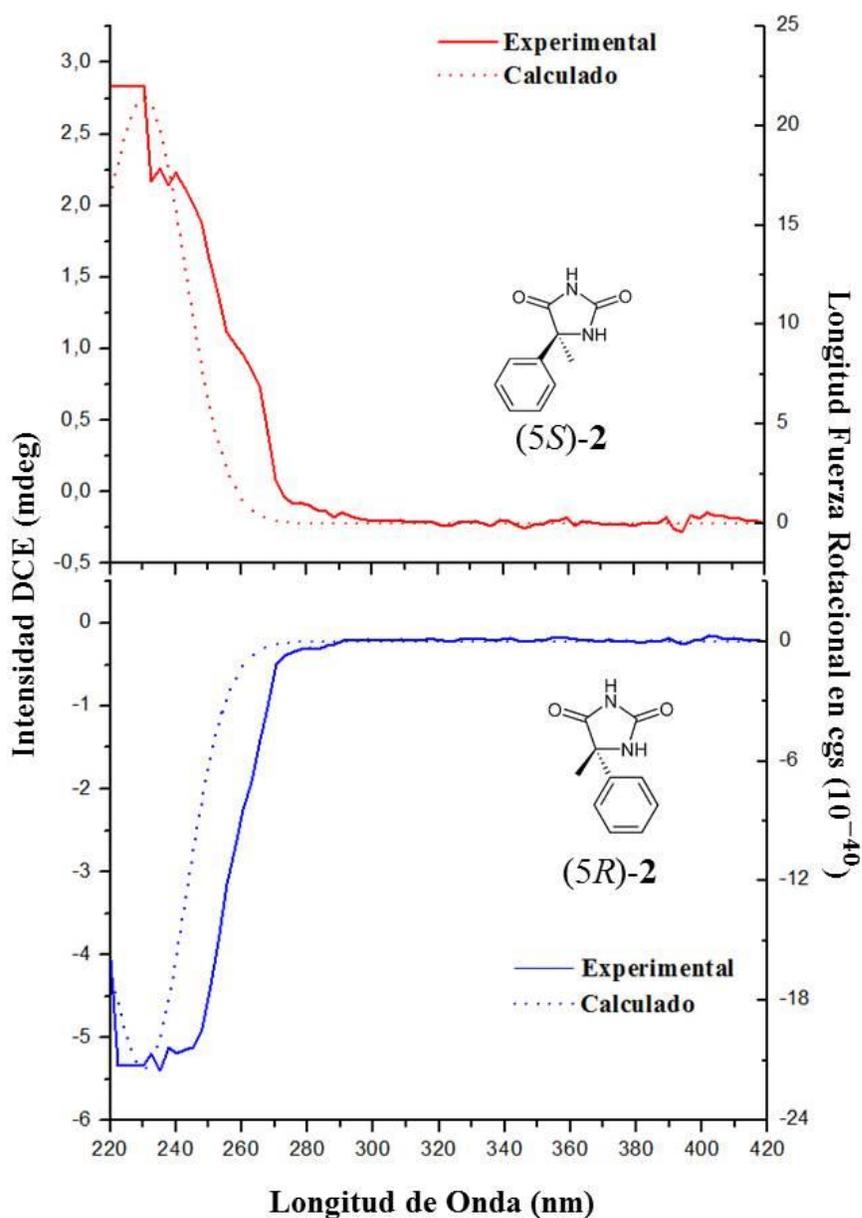


Figura 21: Comparación de espectros de DCE calculado y experimental de los enantiómeros (5*S*)-2 y (5*R*)-2.

Entretanto, tras una nueva inyección de (±)-2 se consiguió el cromatograma de RO (**Fig. 22**), mediante el uso del detector de láser polarimétrico a los 670 nm, mostrando un primer peak cromatográfico negativo a los 2,8 minutos, correspondiente al isómero levorrotatorio (-)-2 y un segundo peak positivo a los 3,1 minutos, perteneciente al isómero dextrorrotatorio (+)-2.

Debido a una obtención de una pobre resolución cromatográfica quirál, los dos peaks detectados por el polarímetro se encuentran sobrepuestos, obteniéndose peaks no ideales para ser utilizados directamente en el método de las bandas gaussianas. Por lo tanto, se realiza computacionalmente una deconvolución para obtener las bandas gaussianas estimadas para cada uno de los peaks y así poder obtener la rotación específica $[\alpha]_{670}$ de ambos enantiómeros eluidos. (Kiesswetter, *et al.*, 2003) Por lo tanto, a través del método de las bandas gaussianas fue posible determinar las rotaciones específicas $[\alpha]_{670}$ experimentales de ambos enantiómeros, obteniéndose que en el peak cromatográfico negativo presenta una $[\alpha]_{670}$ de $-61,28 \text{ deg}/[\text{dm}(\text{gr}/\text{cm}^{-3})]$ y a su vez en el peak cromatográfico positivo una $[\alpha]_{670}$ de $62,56 \text{ deg}/[\text{dm}(\text{gr}/\text{cm}^{-3})]$.

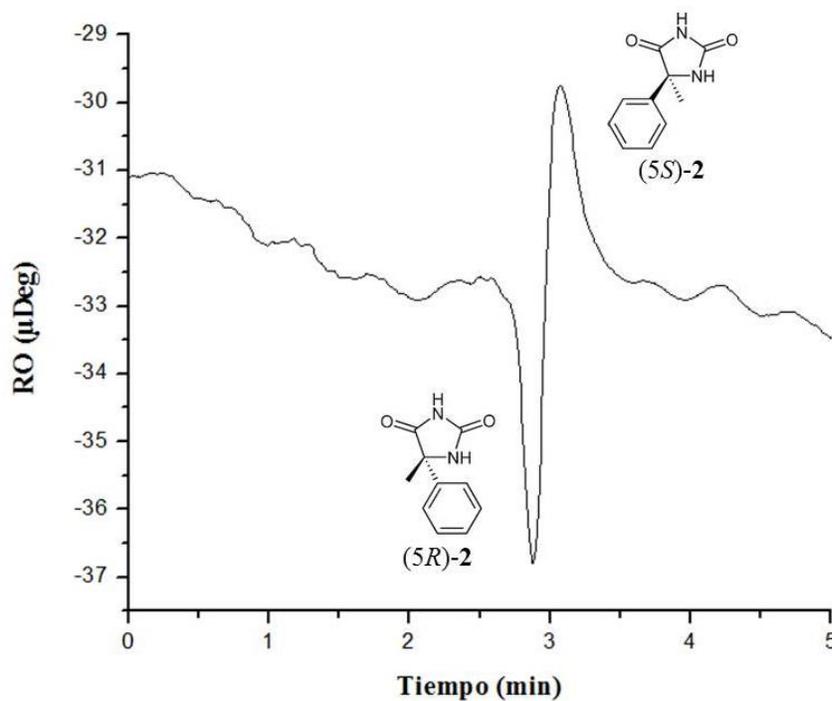


Figura 22: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 25,5 μg de (\pm) -2 conseguida mediante detección RO a 670 nm.

5.2.3 Cálculo de las propiedades quiroópticas teóricas de (5R)-2

La búsqueda conformacional sistemática de (5R)-2, entregó la existencia de una sola conformación de menor energía ($-405409,85 \text{ Kcal/mol}$) en las primeras 10 kcal/mol de energía (Fig. 23), conformación que posteriormente es utilizada para los respectivos cálculos teóricos de las propiedades quiroópticas.

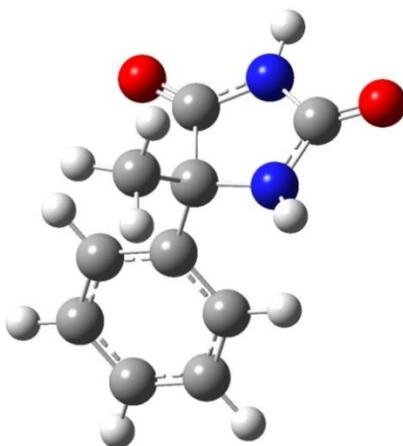


Figura 23: Conformación optimizada de geometría más estable de (5R)-2.

Consiguientemente, al igual que en **1** el cálculo del espectro teórico de DCE fue realizado con un nivel de teoría B3LYP/TZVP sobre la misma conformación mencionada anteriormente de (5R)-2. Sin embargo de acuerdo a la comparación de los espectros UV experimental y teórico se determinó que el cálculo del espectro de DCE presenta un corrimiento de 10 nm, obteniéndose el espectro final teórico de DCE (**Fig. 21 líneas punteadas azul**). Posteriormente, este fue contrastado con los dos espectros de DCE obtenidos en forma experimental, mostrando una gran similitud visual en cuanto a su orientación y signo con el espectro experimental de DCE correspondiente al primer peak cromatográfico del cromatograma de DC (**Fig. 21 línea continua azul**), indicando que el primer enantiómero eluido tras la separación quiral corresponde a (5R)-2.

En cuanto al cálculo teórico de la rotación específica $[\alpha]_{670}$, se realizó sobre la misma conformación de (5R)-2 y con un nivel de teoría B3LYP/aug-cc-pVDZ, consiguiendo una $[\alpha]_{670}$ de $-182,8 \text{ deg}/[\text{dm}(\text{gr}/\text{cm}^{-3})]$, revelando que el enantiómero (5R)-2 es levorrotatorio. No obstante, al comparar las $[\alpha]_{670}$ experimentales ($-61,28 \text{ deg}/[\text{dm}(\text{gr}/\text{cm}^{-3})]$) y teóricas ($-182,8 \text{ deg}/[\text{dm}(\text{gr}/\text{cm}^{-3})]$) se presenta una diferencia de aproximadamente tres veces mayor del valor teórico por sobre el obtenido experimentalmente. Esta sobreestimación puede ser explicada considerando que el resultado teórico no involucra una potencial interacción que pueda manifestar el solvente utilizado como fase móvil (metanol) con la molécula estudiada. Además, en la literatura se manifiestan dos casos similares, como el de la flavanona (Muñoz, *et al.*, 2013) y la (-)-naringenina (Giorgio, *et al.*, 2004), en donde se sugiere que esta sobreestimación podría ser característica de algunos tipos de moléculas, debido a la alta dependencia de la $[\alpha]_{670}$ con

respecto a la rotación que pueda presentar el grupo aromático unido al centro quiral, en donde una pequeña rotación conlleva a una notable diferencia en cuanto a la $[\alpha]_{670}$ calculada. A pesar de lo anterior, se puede observar una gran similitud entre los espectros de DCE calculado y experimental del enantiómero (5*R*)-**2**, propiedad quiroóptica que teóricamente también debería sufrir la misma situación mencionada anteriormente.

Por lo tanto, relacionando los resultados experimentales y teóricos mencionados anteriormente, la asignación de la configuración absoluta de los dos enantiómeros de (±)-**2** son (-)-(5*R*)-**2** y (+)-(5*S*)-**2**.

5.3 (±)-6β-hidroxi-tropinona.

5.3.1 Resolución cromatográfica enantioselectiva de (±)-6β-hidroxi-tropinona.

La resolución cromatográfica enantioselectiva de (±)-**3** a través del equipo de HPLC equipado con la misma columna ChiralPak AD-H utilizada para **1**, pero en cambio utilizando una fase móvil compuesta por hexano, 2-propanol y dietilamina en proporciones de 90:10:0,1 respectivamente.

La detección UV-vis se realizó a los 254 nm, obteniéndose un cromatograma en donde se observan dos peaks cromatográficos, el primero a un tiempo de retención a los 10,2 minutos y un segundo a los 10,6 minutos, mostrando solo una pequeña separación entre estos dos peaks, sin embargo, revelando la presencia de ambos enantiómeros de (±)-**3**. (**Fig. 24**) Por lo demás, sin haber conseguido una separación exitosa de los dos enantiómeros de acuerdo a las condiciones cromatográficas mencionadas anteriormente, se produce el mismo desafío que con la mezcla racémica (±)-**2**, por lo tanto, una nueva gran oportunidad de comprobar si la metodología propuesta logra conseguir la asignación de la configuración absoluta de ambos enantiómeros en condiciones desfavorables, como también en moléculas completamente distintas.

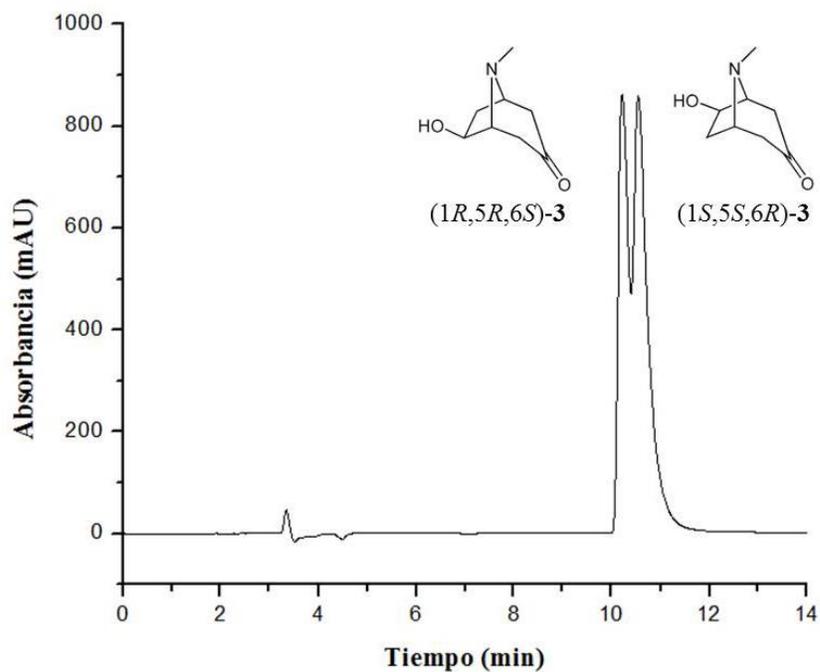


Figura 24: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 48 μg de (\pm)-**3** conseguida mediante detección UV-vis a 254 nm.

5.3.2 Determinación cromatográfica experimental de las propiedades quiroópticas de los enantiómeros (\pm)-**3**.

La obtención del cromatograma de DC fue realizado con una longitud de onda de 254 nm sobre la mezcla racémica comercial (\pm)-**3**, observándose la presencia de dos peaks cromatográficos, un primer peak cromatográfico con un efecto Cotton positivo a los 10,2 minutos y un segundo peak con un efecto Cotton contrario a los 10,6 minutos. (**Fig. 25**)

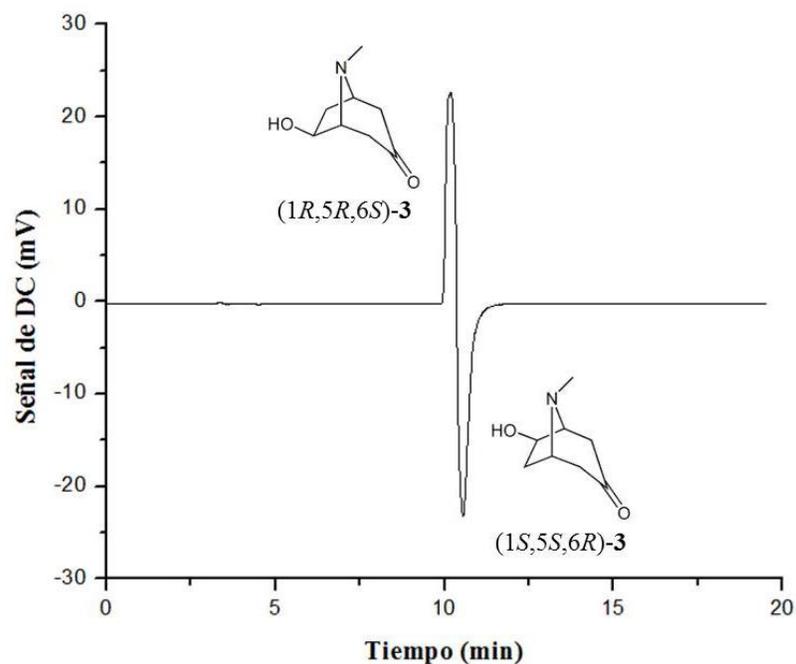


Figura 25: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 96 μg de (\pm)-**3** conseguida mediante detección DC a 254 nm.

Por otro parte, mediante la técnica de *stopped-flow* tras una nueva inyección se midieron y obtuvieron los espectros de DCE experimentales de ambos enantiómeros, que se encuentran representados en la **Fig. 26** como líneas continuas. En el espectro experimental de DCE correspondiente al primer peak del cromatograma de DC, se observa un efecto Cotton positivo entre los 230 nm y los 320 nm (**Fig. 26 línea continua roja**), a su vez, en el segundo espectro obtenido de DCE correspondiente al segundo peak del cromatograma de DC, ocurre exactamente el mismo fenómeno, pero con el signo contrario entre las mismas longitudes de ondas mencionadas anteriormente. (**Fig. 26 línea continua azul**)

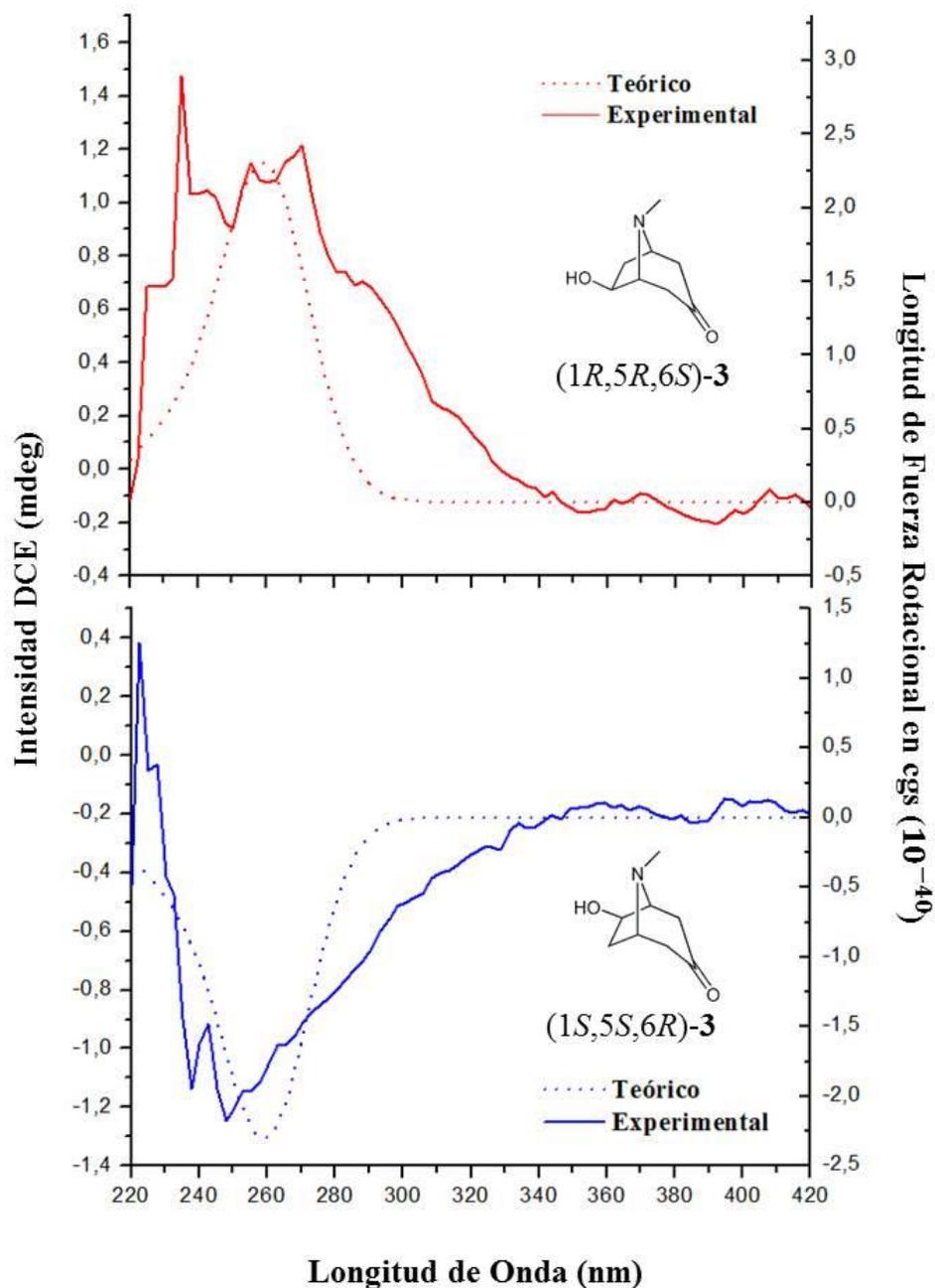


Figura 26: Comparación de espectros de DCE calculado con un corrimiento de 30 nm y experimental de los enantiómeros (1S,5S,6R)-3 y (1R,5R,6S)-3.

Conjuntamente, con la misma inyección de (±)-3 con la que se obtuvo el cromatograma de DC se logró conseguir el cromatograma de RO a los 670 nm, posterior a la separación del equipo HPLC quiral, mostrando un primer peak cromatográfico positivo a los 10,6 minutos,

correspondiente al isómero dextrorrotatorio (+)-**3** y un segundo peak negativo a los 10,9 minutos, correspondiente al isómero levorrotatorio (-)-**3**. (Fig. 27)

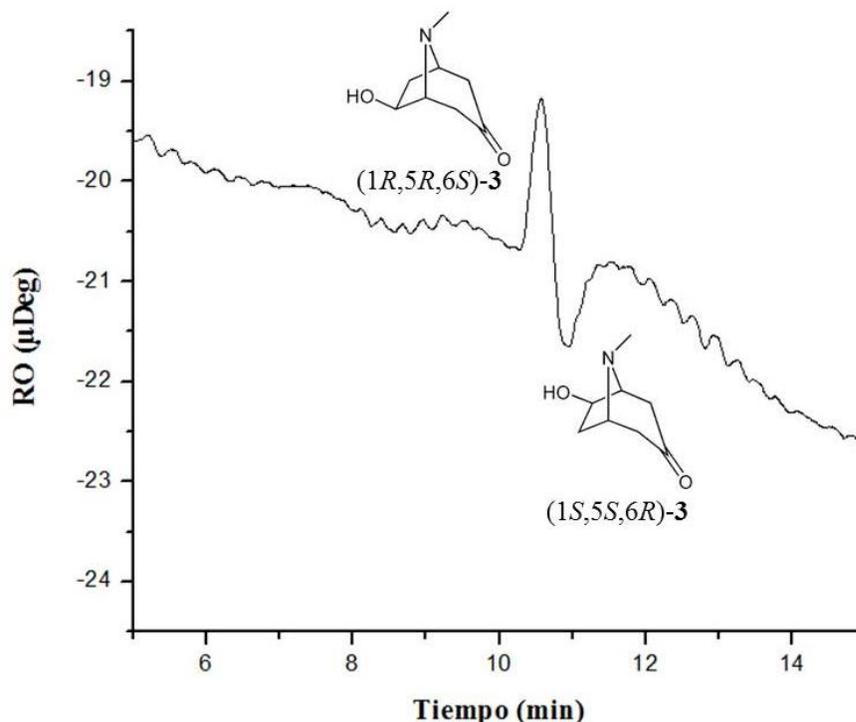


Figura 27: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 96 µg de (±)-**3** conseguida mediante detección de RO a 670 nm.

Al igual como sucede con el compuesto (±)-**2**, se observa una pobre resolución cromatográfica quiral, observándose que los dos peaks detectados por el polarímetro se encuentran sobrepuestos. Por lo tanto, se vuelve a realizar computacionalmente una deconvolución para obtener las bandas gaussianas estimadas para ambos peaks, para lograr obtener la rotación específica $[\alpha]_{670}$ de ambos enantiómeros eluidos. Con la obtención del cromatograma de RO, se determinó la rotación específica $[\alpha]_{670}$ experimental de acuerdo al método de las bandas gaussianas, resultando del peak cromatográfico dextrorrotatorio a los 10,6 minutos una $[\alpha]_{670}$ de 8,46 deg/[dm(gr/cm³)], mientras que en el peak cromatográfico levorrotatorio de los 10,9 minutos una $[\alpha]_{670}$ de -6,19 deg/[dm(gr/cm³)], sugiriendo que el compuesto presenta una baja actividad óptica.

5.3.3 Cálculo de las propiedades quiroópticas teóricas de (1*S*,5*S*,6*R*)-3

Mediante la búsqueda conformacional sistemática del enantiómero (1*S*,5*S*,6*R*)-3 se obtuvieron seis diferentes conformaciones, en donde la que presenta menor energía (-324394,23 Kcal/mol) y por ende la más estable, es la esquematizada en la **Fig. 28**. Esta conformación presenta una incidencia del 87,38% dentro de una distribución de Boltzmann, que considera solo las 3 conformaciones de mayor incidencia.

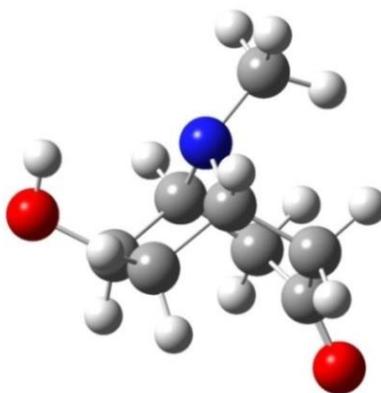


Figura 28: Conformación con optimización de geometría de menor energía (87,38% en la distribución de Boltzmann) de (1*S*,5*S*,6*R*)-3.

Por lo tanto, de las seis conformaciones inicialmente encontradas sólo las tres de menores energías fueron consideradas y se les efectuaron los cálculos mecánico-cuánticos pertinentes para la obtención de las propiedades quiroópticas teóricas. Estos cálculos se llevaron a cabo a un nivel de teoría B3LYP/TZVP sobre cada conformación para la obtención del espectro final ponderado de DCE (**Fig. 29**). Tras una comparación de los espectros UV experimental y teórico se estableció que el cálculo del espectro de DCE presenta un corrimiento de 30 nm, el cual fue aplicado a cada conformación para conseguir el espectro final ponderado de DCE del enantiómero (1*S*,5*S*,6*R*)-3 (**Fig. 26 línea punteada azul**), que fue contrastado con los dos espectros de DCE obtenidos experimentalmente. De esta comparación se pudo observar una gran similitud visual en cuanto a signo y orientación con el espectro experimental correspondiente al segundo peak cromatográfico negativo de DC (**Fig. 26 línea continua azul**), indicando que el segundo enantiómero eluido corresponde al (1*S*,5*S*,6*R*)-3.

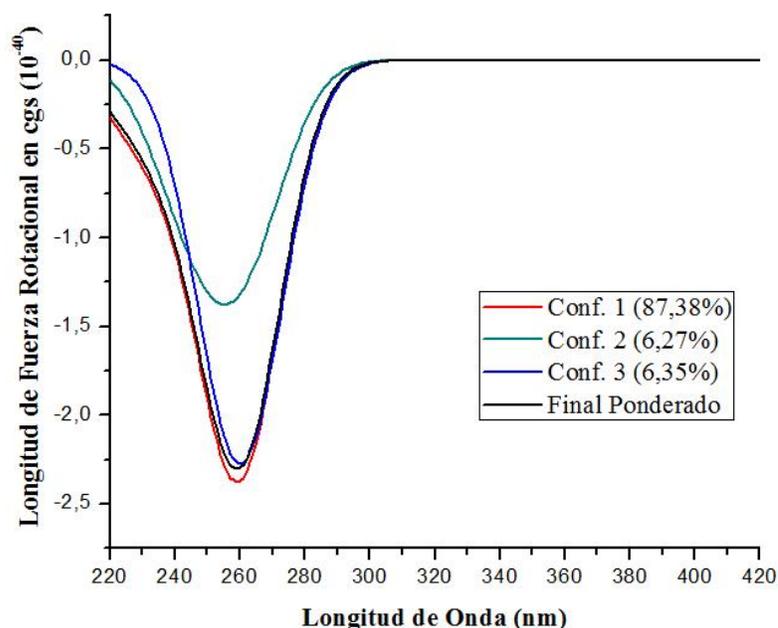


Figura 29: Espectros de DCE teóricos a un nivel B3LYP/TZVP de las tres conformaciones más estables de (1S,5S,6R)-3 con un corrimiento de 30 nm.

Asimismo, se realizó el cálculo de la rotación óptica específica $[\alpha]_{670}$ teórica sobre las mismas tres conformaciones del enantiómero (1S,5S,6R)-3, a un nivel de teoría B3LYP/aug-cc-pVDZ, obteniéndose una $[\alpha]_{670}$ final ponderada de $-15,95 \text{ deg}/[\text{dm}(\text{gr}/\text{cm}^{-3})]$ (Tabla 2), revelando que el enantiómero (1S,5S,6R)-3 corresponde al isómero levorrotatorio, $(-)-(1S,5S,6R)-3$, recordando que el isómero levorrotatorio es el segundo enantiómero eluido tras la separación quiral.

	Incidencia en la distribución de Boltzmann (%)	Rotación específica $[\alpha]$ a 670 nm. (deg/[dm(gr/cm-3)])
Conformación 1	87,38	-23,54
Conformación 2	6,27	11,14
Conformación 3	6,35	61,76
Final ponderado	100	-15,95

Tabla 2: Detalle del cálculo de la rotación específica $[\alpha]_{670}$ de (1S,5S,6R)-3 a un nivel de teoría B3LYP/aug-cc-pVDZ.

Por lo tanto, al relacionar los resultados tanto de rotación específica $[\alpha]_{670}$ y del espectro de DCE teórico y experimental del enantiómero (1*S*,5*S*,6*R*)-**3**, se concluye que la configuración absoluta de **3** es (-)-(1*S*,5*S*,6*R*)-**3** y (+)-(1*R*,5*R*,6*S*)-**3**. Finalmente, la configuración absoluta obtenida mediante la metodología de HPLC-DCE-RO/DFT quiral, coincide con estudios realizados anteriormente, en los que se señala que el enantiómero (1*S*,5*S*,6*R*)-**3** corresponde al isómero levorrotatorio (-). (Pollini, *et al.*, 2005).

5.4 (±)-1-(2-(5-metilisoxazol-3-il)-1,2,3,4-tetrahidroquinolin-4-il)pirrolidin-2-ona.

La mezcla racémica (±)-**4** fue sintetizada mediante la reacción química orgánica Diels-Alder, que corresponde a una forma sencilla de cicloadición entre un dieno (molécula que presenta dos dobles enlaces conjugados) y un dienófilo (molécula con un doble o triple enlace), con la finalidad de formar un ciclo o anillo de seis miembros formado por el arreglo de los enlaces π a enlaces σ (**Fig. 30**). De igual forma es conocida esta reacción como la cicloadición 4+2. Además corresponde a un método bastante útil para la formación de anillos de 6 miembros con un buen control tanto en la regio- como en la estereo-selectividad. (Brocksom, *et al.*, 2001) Es de remarcar que la importancia de la reacción Diels-Alder en síntesis orgánica es una consecuencia de su versatilidad, *cis*-estereoespecificidad, elevada regioselectividad y *endo*-estereoselectividad.



Figura 30: Representación de una reacción de Diels-Alder.

Dentro de la estructura molecular de **4** existe la presencia de dos centros asimétricos, por lo que fue necesario primeramente especificar y conocer su configuración relativa, debido a que en los tres casos anteriores se presentaban sólo la presencia de un par de enantiómeros posibles, mientras que en este último caso pueden presentarse cuatro estereoisómeros. Conociendo por ende su configuración relativa se puede determinar y reconocer que par de enantiómeros se

encuentra presente en nuestra muestra sintetizada, a la que posteriormente se realizaron los respectivos análisis cromatográficos.

Mediante el espectro de ^1H -RMN (**Espectro 1**) realizado sobre la muestra, fue posible determinar la configuración relativa que presentan los sustituyentes del anillo THQ en las posiciones de los 2-C y 4-C, basándose en las constantes de acoplamiento (3J) que presentan de los hidrógenos de los dos centros asimétricos con respecto a sus hidrógenos vecinos.

En el espectro de ^1H -RMN de (\pm)-**4** se observa la presencia de dos dobles dobletes, el primero a los 4,75 ppm correspondiente al 2-H y un segundo a los 5,75 ppm perteneciente al 4-H. Conforme a lo anterior, se determinaron las constantes de acoplamiento (3J) obteniéndose tras el cálculo en el espectro, que en el H-2 presenta una constante de acoplamiento de $^3J_{2-3a} = 11,54$ Hz y $^3J_{2-3b} = 1,4$ Hz, sugiriendo que las interacciones son axial-axial entre 2-H con 3a-H y una interacción axial-ecuatorial entre 2-H y 3b-H, mientras que 4-H presenta una $^3J_{4-3a} = 11,62$ Hz y $^3J_{4-3b} = 6,1$ Hz, sugiriendo también una interacción axial-axial entre 4-H con 3a-H y una interacción axial-ecuatorial entre 4-H y 3b-H (**Fig. 31**). Adicionalmente se calcularon los ángulos dihédricos usando los valores de las constantes de acoplamiento mediante la ecuación de Karplus, de los compuestos con configuración *cis* (167° , $^3J = 14,4$ Hz; 47° $^3J = 5,79$ Hz) y *trans* (65° , $^3J = 2,07$ Hz; -55° , $^3J = 4,01$ Hz). Por lo tanto, los altos valores en las constantes de acoplamiento (11,54 Hz y 11,62 Hz) de los protones 2-H y 4-H, confirman la existencia de una configuración axial de estos y por consiguiente, los sustituyentes en los carbonos quirales 2 y 4 del anillo THQ presentan una disposición ecuatorial y una configuración relativa *cis*, obteniéndose la presencia de dos posibles enantiómeros, el (2*S*,4*S*)-**4** y el (2*R*,4*R*)-**4**. (**Fig. 32**) (Bermudez, *et al.*, 2011) (Savitha & Perumal, 2006)

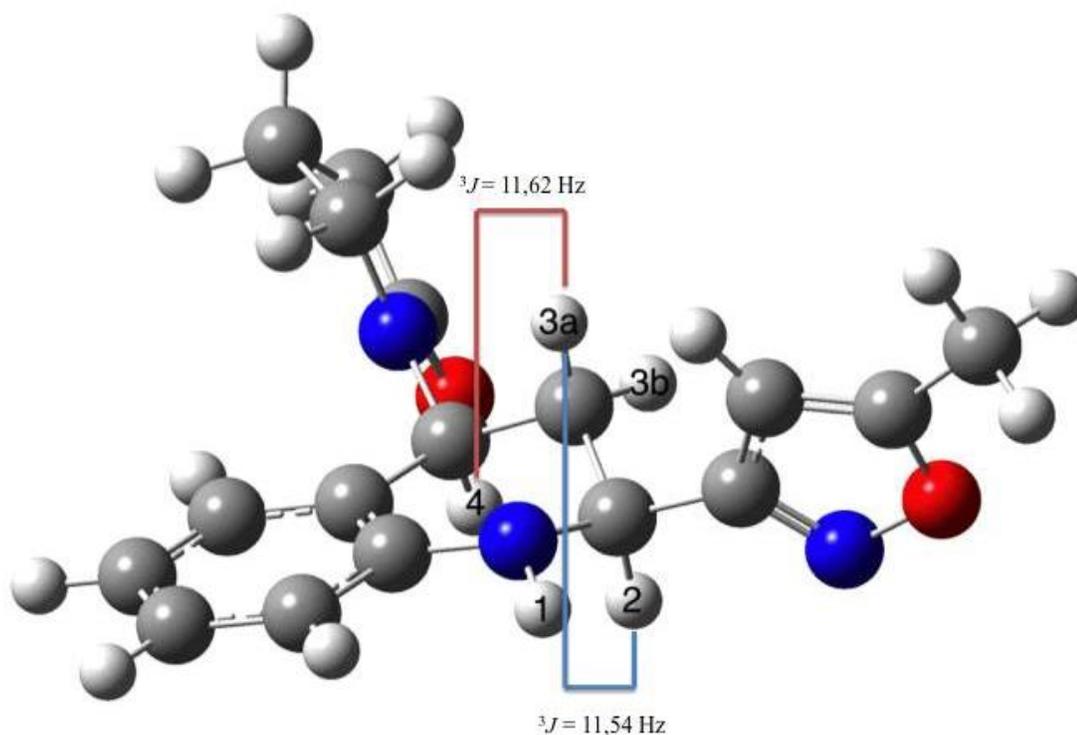


Figura 31: Representación de la conformación con optimización de geometría de menor energía (74,31% en la distribución de Boltzmann) del enantiómero (2*S*,4*S*)-4.

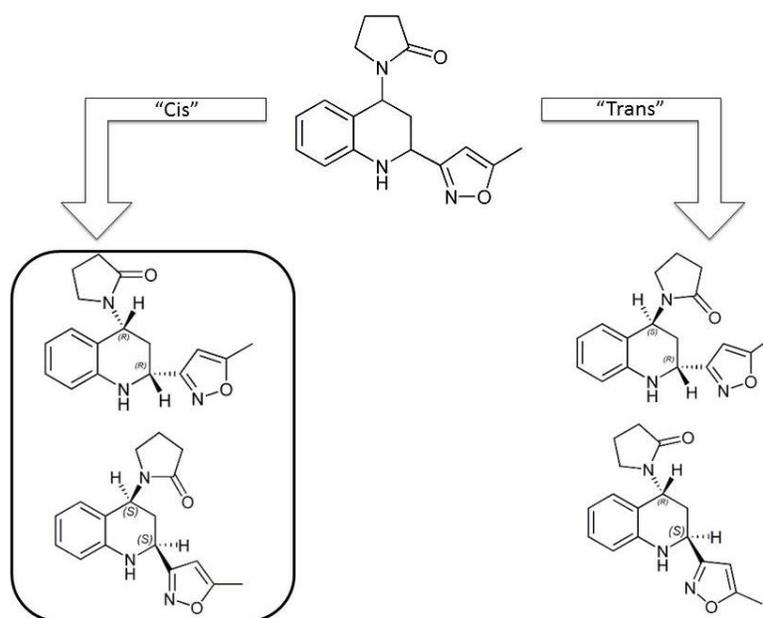


Figura 32: Representación de los enantiómeros de (±)-4.

5.4.1 Resolución cromatográfica enantioselectiva de (\pm)-*cis*-4.

Tras varios análisis, la mejor resolución cromatográfica enantioselectiva de (\pm)-*cis*-4, se consiguió con el uso de la columna ChiralPak AD-H con una fase móvil compuesta por hexano, 2-propanol y dietilamina, en proporciones de 70:30:0,1 respectivamente. Sin embargo, se debe considerar que ésta molécula presenta una baja solubilidad con respecto a los eluyentes que forman parte de la fase móvil con la que fue diluida, y por lo tanto se debe tener precaución para no generar complicaciones en el cuidado de la columna quiral utilizada.

En el cromatograma de detección UV-vis a los 254 nm (**Fig. 33**), se observa la presencia de dos peak cromatográficos, el primero a un tiempo de retención a los 12,6 minutos y un segundo peak a los 17,9 minutos, correspondientes a cada uno de los enantiómeros posibles de (\pm)-*cis*-4, mostrando una exitosa separación enantioselectiva de estos enantiómeros.

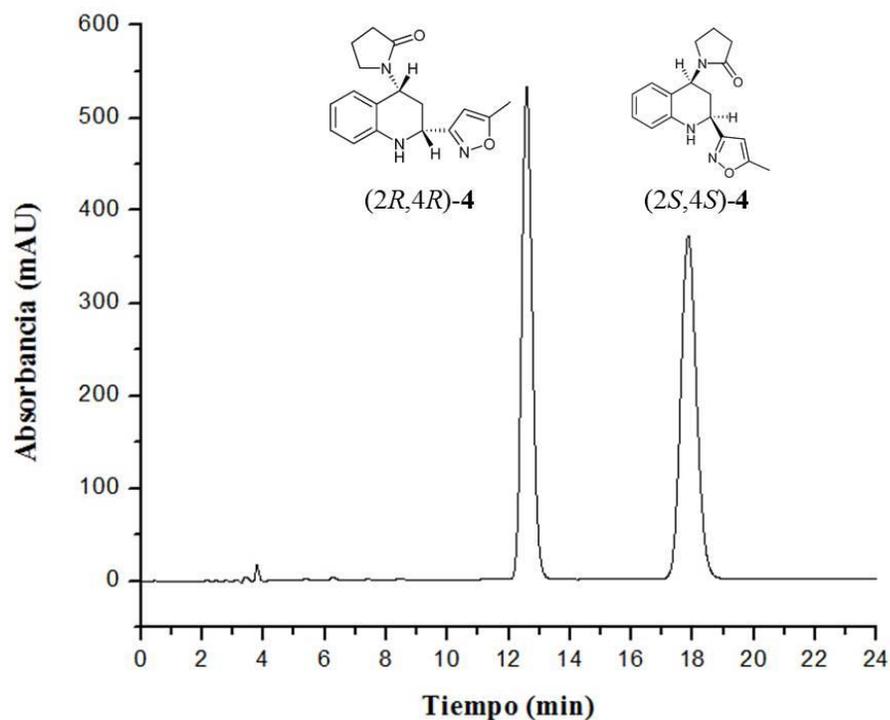


Figura 33: Resolución cromatográfica quiral de una inyección de 6,6 μ g de (\pm)-*cis*-4 conseguida mediante detección UV-vis a 254 nm.

5.4.2 Determinación cromatográfica experimental de las propiedades quiroópticas de los enantiómeros de (\pm)-*cis*-4.

En primer lugar, se realizó la detección del DC a los 254 nm tras una inyección de 6,6 μ g de (\pm)-*cis*-4, observándose en el cromatograma la presencia de dos peak, un primer peak con un efecto Cotton negativo a los 12,6 minutos y un segundo peak con un efecto Cotton positivo a los 18,7 minutos. (**Fig. 34**)

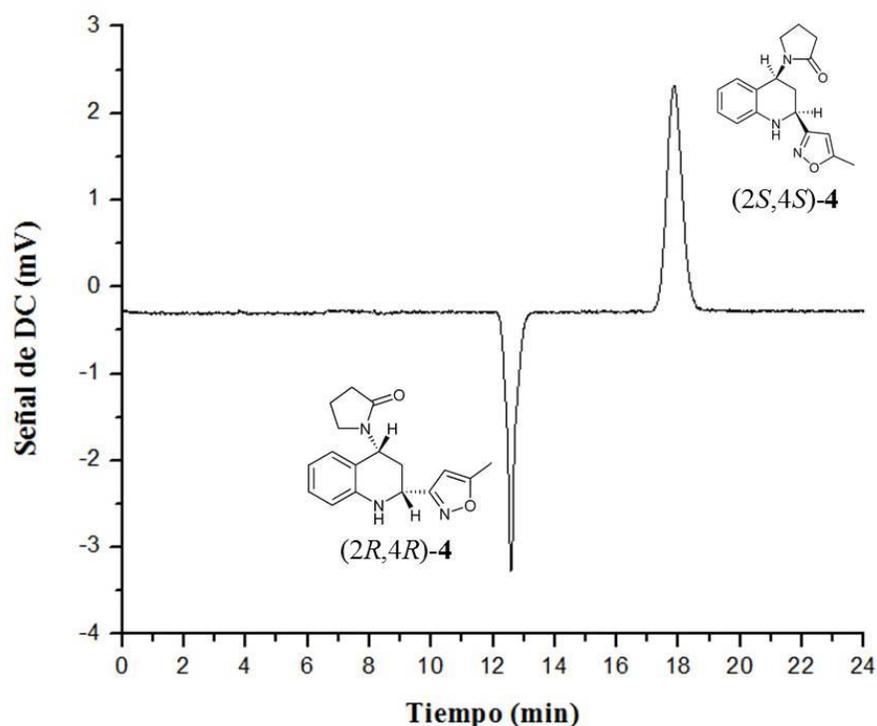


Figura 34: Resolución cromatográfica quiral de una inyección de 6,6 μ g de (\pm)-*cis*-4 conseguida mediante detección DC a 254 nm

Por otra parte, tras una nueva inyección se midieron los espectros de DCE experimentales de ambos enantiómeros mediante la técnica de *stopped-flow*, los que se presentan en la **Fig. 35** como líneas continuas, observándose que el espectro de DCE tras la medición del primer peak negativo del cromatograma de DC presenta un efecto Cotton positivo entre los 220 y 270 nm seguido de un pequeño efecto Cotton negativo entre los 270 y los 290 nm (**Fig. 35 línea punteada roja**), mientras que en el espectro de DCE correspondiente al segundo peak positivo del cromatograma de DC, presenta los efectos contrarios, es decir un primer efecto Cotton

negativo y un segundo pequeño efecto Cotton positivo entre los mismos rangos de longitudes de ondas mencionada anteriormente (**Fig. 35** línea punteada azul).

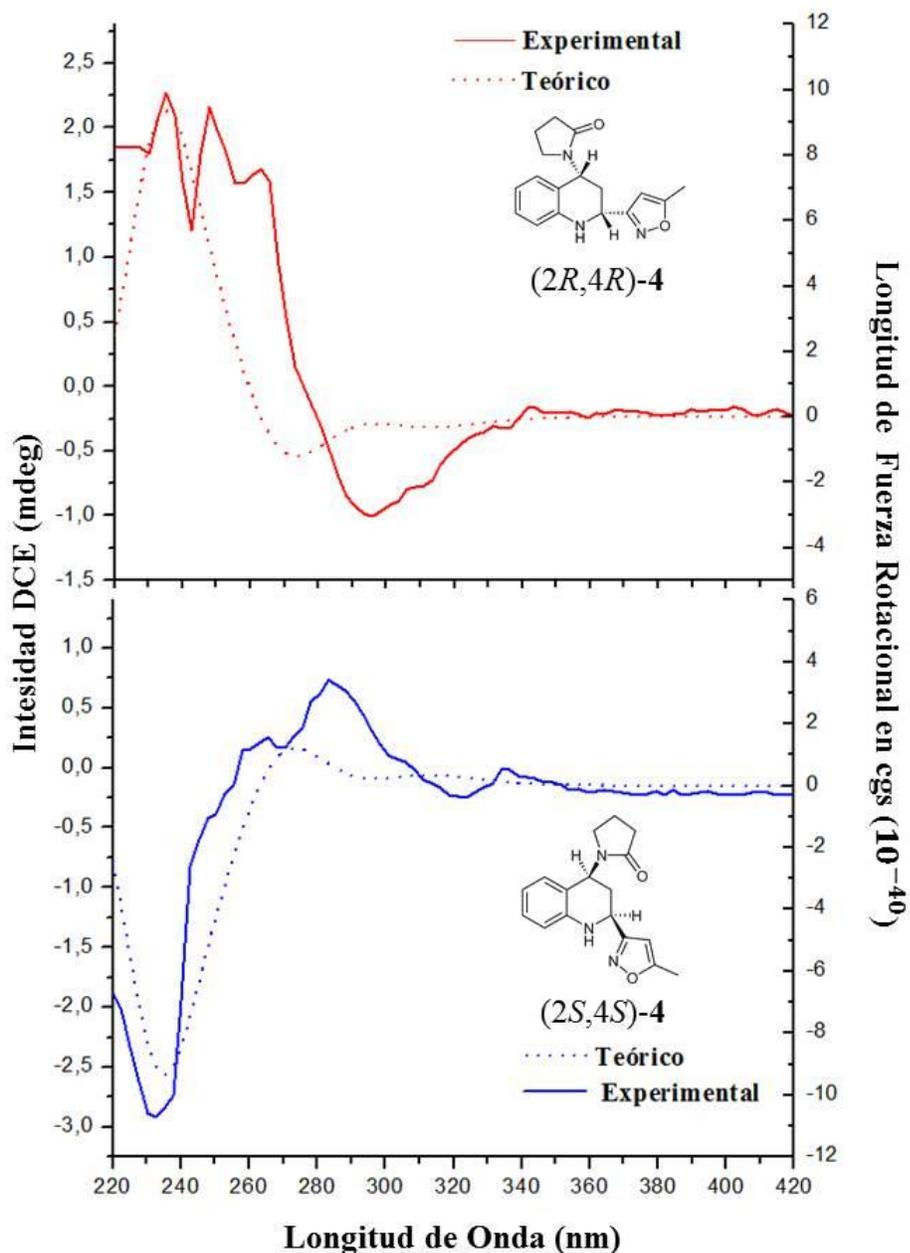


Figura 35: Comparación de espectros de DCE calculado y experimental de los enantiómeros (2*R*,4*R*)-4 y (2*S*,4*S*)-4.

Del mismo modo, posterior a una nueva inyección se realizó la detección experimental de la RO a los 670 nm de (\pm)-*cis*-4, posterior a la separación en HPLC quiral. Sin embargo, en este caso para poder observar algún cambio en el cromatograma fue necesaria aumentar la cantidad de muestra de la inyección a los 96 μ g, cerca de 15 veces mayor a la cantidad que fue necesaria para ser observada con el detector de DC. En este caso se observó un primer peak cromatográfico eluído negativo a los 12,9 minutos, correspondiente al isómero levorrotatorio (-)-*cis*-4 y un segundo peak cromatográfico eluído positivo a los 18,4 minutos, correspondiente al isómero dextrorrotatorio (+)-*cis*-4. (**Fig. 36**)

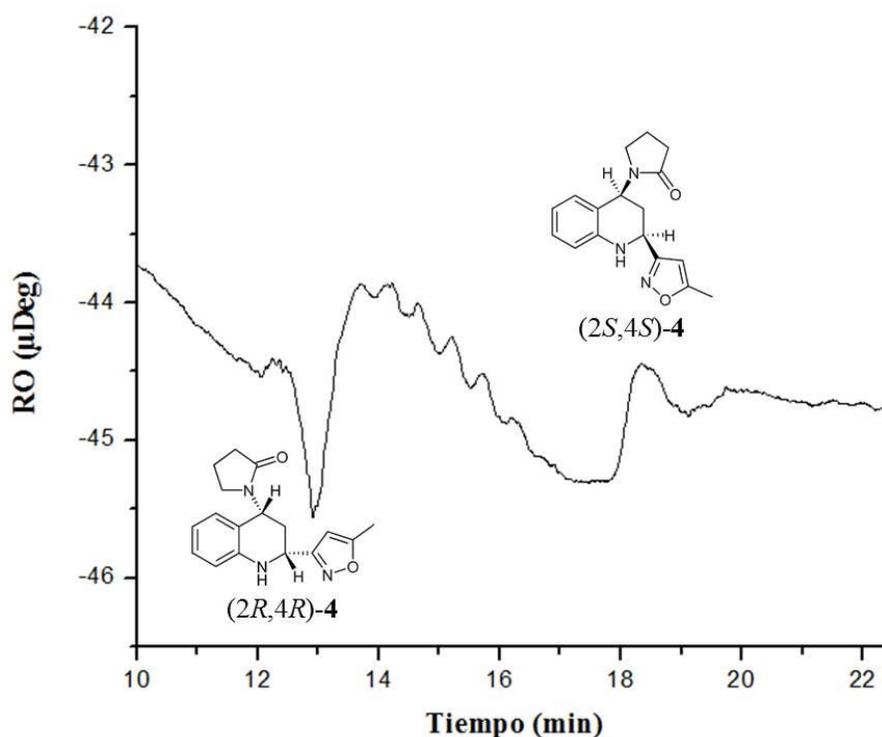


Figura 36: Resolución cromatográfica enantioselectiva de una inyección de 96 μ g de (\pm)-*cis*-4 conseguida mediante detección RO láser a 670 nm.

Mediante el método de las bandas gaussianas fue posible determinar la rotación específica $[\alpha]_{670}$ experimental en base al cromatograma de RO (**Fig. 36**), obteniéndose tras el cálculo del peak levorrotatorio una $[\alpha]_{670}$ de -9,04 deg/[dm(gr/cm³)] y tras el peak dextrorrotatorio una $[\alpha]_{670}$ de 7,02 deg/[dm(gr/cm³)], revelando que la molécula exhibe un bajo poder rotatorio.

5.4.3 Cálculo de las propiedades quiroópticas teóricas de (2*S*,4*S*)-4.

Una búsqueda conformacional sistemática de (2*S*,4*S*)-4, entregó seis conformaciones posibles, en donde dos conformaciones corresponden a cerca del 98% de la población dentro de la distribución de Boltzmann. La conformación de menor energía o más estable (-611035,37 Kcal/mol) se encuentra representada en la **Fig. 31**. Por ende, en las dos conformaciones de menor energía fueron consideradas para los posteriores cálculos teóricos mecánicos-cuánticos para la obtención del espectro de DCE y de la $[\alpha]$.

En el primer caso, el espectro de DCE fue calculado sobre las dos conformaciones de menores energías de (2*S*,4*S*)-4 a un nivel de teoría B3LYP/aug-cc-pVDZ (**Fig. 37**), obteniéndose un espectro final de DCE ponderado (**Fig. 35 línea punteada azul**), que tras una comparación con ambos espectros experimentales presentó características visuales similares en cuanto a su orientación y signo con el espectro de DCE experimental perteneciente al peak positivo del cromatograma de DC (**Fig. 35 línea continua azul**), concluyendo que el segundo peak eluido tras la separación quiral corresponde al enantiómero (2*S*,4*S*)-4.

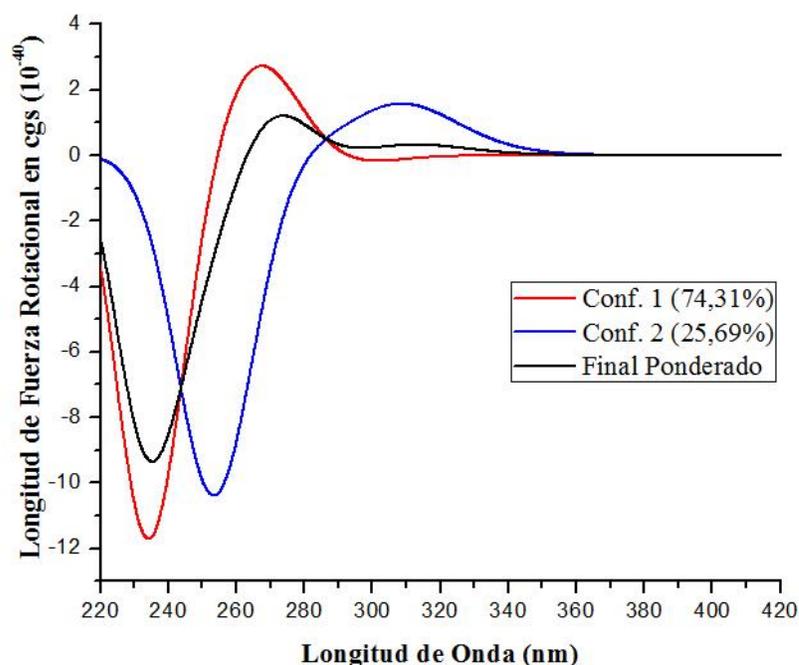


Figura 37: Espectros de DCE teóricos a un nivel B3LYP/aug-cc-pVDZ de las dos conformaciones más estables de (2*S*,4*S*)-4 y el espectro final ponderado.

Por otra parte, el cálculo de la rotación específica $[\alpha]_{670}$ se realizó sobre las mismas dos conformaciones más estables de (2*S*,4*S*)-**4** y a un nivel de teoría B3LYP/aug-cc-pVDZ, obteniéndose una $[\alpha]_{670}$ de 55,55 deg/[dm(gr/cm⁻³)] (**Tabla 3**), sugiriendo que el enantiómero (2*S*,4*S*)-**4** corresponde al isómero dextrorrotatorio (+). Por lo tanto, al comparar la $[\alpha]_{670}$ experimental (7,02 deg/[dm(gr/cm⁻³)] y teórica (55,55 deg/[dm(gr/cm⁻³)] del enantiómero dextrorrotatorio, se observa una diferencia de 7,9 veces mayor la teórica por sobre la obtenida experimentalmente, que puede deberse a que el cálculo teórico de la $[\alpha]_{670}$ se realiza en condiciones ideales y por lo demás, la $[\alpha]_{670}$ experimental nos reveló que (±)-*cis*-**4** presenta un bajo poder rotatorio, necesitando grandes cantidades para observar algún cambio en la detección polarimétrica.

	Incidencia en la distribución de Boltzmann (%)	Rotación específica $[\alpha]$ (deg/[dm(gr/cm⁻³))] a 670 nm.
Conformación 1	74,31	49,18
Conformación 2	25,69	73,98
Total	100	55,55

Tabla 3: Detalle del cálculo de la rotación específica $[\alpha]_{670}$ de (2*S*,4*S*)-**4** a un nivel de teoría B3LYP/aug-cc-pVDZ.

Finalmente, se concluye que la configuración absoluta de ambos enantiómeros de (±)-*cis*-**4**, de acuerdo a los espectros de DCE y de los datos de la $[\alpha]_{670}$ experimentales y teóricos para cada uno de los enantiómeros, revelan que el primer enantiómero eluído tras la separación quiral corresponde a (+)-(2*S*,4*S*)-**4** y por lo tanto, el segundo enantiómero eluído pertenece al (-)-(2*R*,4*R*)-**4**.

6. CONCLUSIONES.

En base a lo desarrollado y expuesto en la presente tesis, se concluye que:

Para el compuesto (\pm)-**1** se pudo observar una buena resolución enantioselectiva en condiciones de fase normal y utilizando una fase estacionaria basada en amilosa modificada, lo que en conjunto con los sistemas de detección UV-vis, DCE y RO, mostró que los isómeros dextro- y levorrotatorio son eluidos en primer y segundo lugar, respectivamente. Así mismo fue posible medir los espectros de DCE y los valores de $[\alpha]_{670}$, observándose un efecto de Cotton positivo entre los 220 y 280 nm para el isómero (+)-**1**, y otro negativo en el mismo rango para (-)-**1**. Por otra parte, tras una búsqueda conformacional y posteriores cálculos DFT para el isómero (1*R*,2*R*)-**1**, se pudo establecer que este presenta un sólo conformero de baja energía, el que a su vez mostró tener propiedades quiroópticas coincidentes con las medidas experimentalmente para (+)-**1**. De esta comparación entre datos experimentales y teóricos, se pudo concluir que (1*R*,2*R*)-**1** corresponde al enantiómero dextrorrotatorio y por lo tanto, su configuración absoluta es (+)-(1*R*,2*R*)-**1**.

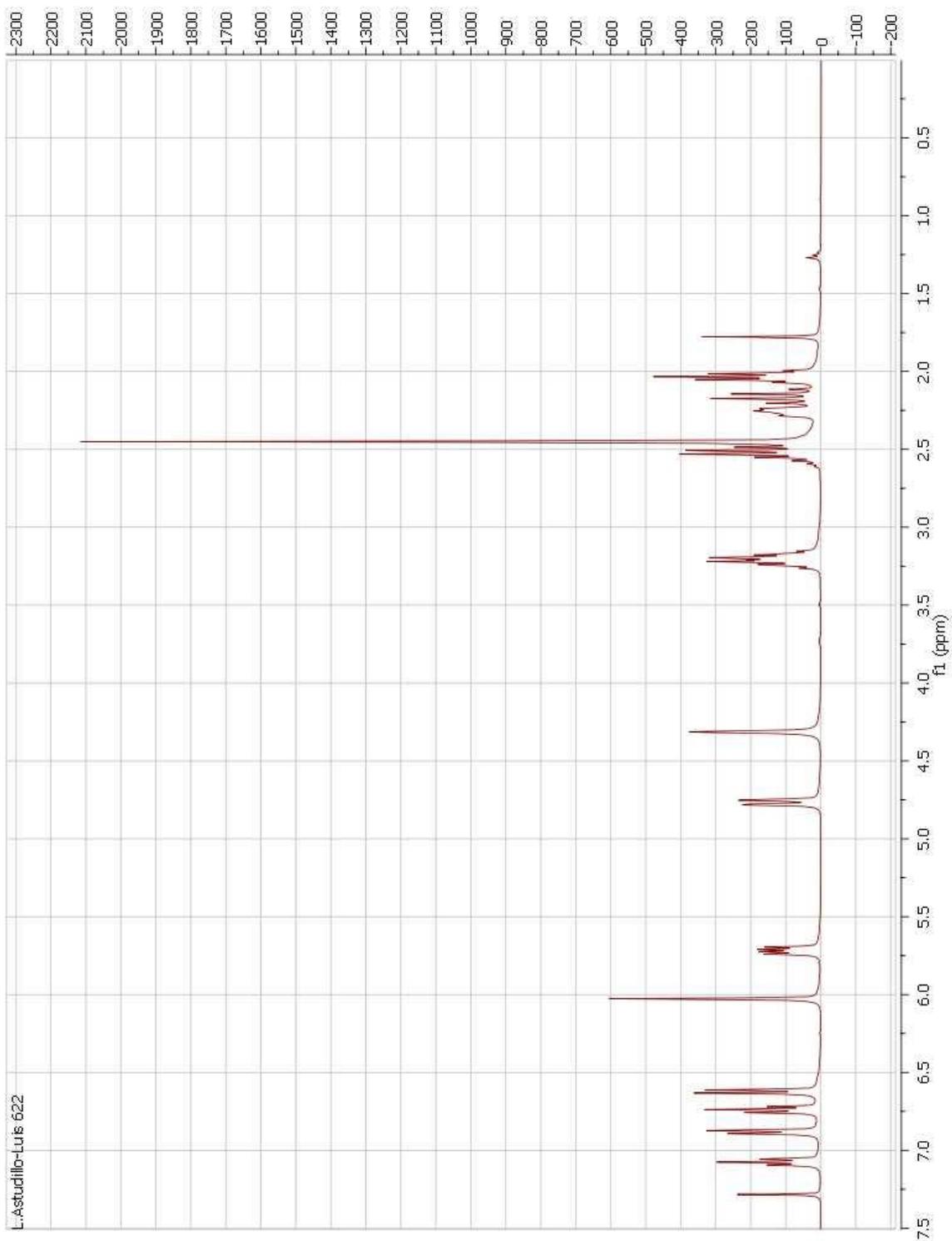
Por otra parte, en el caso de (\pm)-**2** se pudo observar una limitada enantioselectividad en condiciones de fase reversa (metanol) y utilizando una fase estacionaria basada en antibióticos macrólidos (Vancomicina). Además, en forma equivalente al caso anterior se pudo determinar que el isómero levorrotatorio tiene un menor tiempo de retención bajo estas condiciones cromatográficas, y que su espectro de DCE muestra un efecto Cotton negativo entre los 220 y 280 nm. Así mismo, cálculos computacionales para el único conformero de baja energía de (5*R*)-**2**, mostraron un espectro de DCE coincidente con el medido para (-)-**2**, lo que contrasta con la sobreestimación tres veces mayor al valor de $[\alpha]_{670}$ calculado por sobre el experimental. Sin embargo, y considerando que estas diferencias se han observado antes en sistemas que presentan un grupo fenilo con libre rotación enlazado al centro quiral, igualmente fue posible concluir que que (5*R*)-**2** corresponde al enantiómero levorrotatorio y por lo tanto, su configuración absoluta es (-)-(5*R*)-**2**.

Para el compuesto (\pm)-**3**, al igual que para (\pm)-**2** se pudo observar una limitada enantioselectividad pero en condiciones de fase normal y utilizando una fase estacionaria basada en amilosa modificada. Además, en forma equivalente a los casos anteriores se logró determinar

que los isómeros dextro- y levorrotatorio son eluidos en primer y segundo lugar, respectivamente. Además, se midieron los espectros de DCE observándose un efecto Cotton positivo entre los 220 y 320 nm para el isómero (+)-**3**, y un efecto contrario para (-)-**3**. Por otra parte, una búsqueda conformacional de (1*S*,5*S*,6*R*)-**3** mostró seis posibles conformeros, de los cuales sólo tres fueron seleccionados para los cálculos DFT, resultando en propiedades quiroópticas similares a las obtenidas experimentalmente para (-)-**3**, y además dilucidando tras los valores de la $[\alpha]_{670}$ que el compuesto presenta una baja actividad óptica. Tras esta comparación entre los datos experimentales y teóricos, se pudo concluir que (1*S*,5*S*,6*R*)-**3** corresponde al enantiómero levorrotatorio y por lo tanto, su configuración absoluta es (-)-(1*S*,5*S*,6*R*)-**3**.

Para el cuarto y último compuesto (\pm)-**4**, primeramente se determinó la configuración relativa a través de las constantes de acoplamiento (3J) obtenidas tras el espectro de $^1\text{H-RMN}$, las cuales revelaron que los sustituyentes del anillo THQ en los carbonos 2 y 4 presentan una orientación *cis*. En cuanto a los análisis cromatográficos, se logró una separación enantioselectiva exitosa de (\pm)-*cis*-**4** en condiciones de fase normal y utilizando una fase estacionaria basada en amilosa modificada, al igual que en los casos anteriores se logró mostrar que los isómeros dextro- y levorrotatorio son eluidos en primer y segundo lugar, respectivamente. Además, fue posible obtener los espectros de DCE para ambos isómeros, observándose en el espectro correspondiente a (+)-*cis*-**4** un efecto Cotton positivo entre los 220 y 270 nm seguido de un leve efecto Cotton negativo entre los 270 y 290 nm, y a su vez para (-)-*cis*-**4** se observaron efectos Cotton inversos dentro los mismos rangos de longitudes de onda. Por otra parte, tras una búsqueda conformacional del isómero (2*S*,4*S*)-**4** se obtuvieron seis posibles conformaciones, en donde las dos de menor energía fueron seleccionadas para los cálculos DFT, obteniéndose un espectro de DCE coincidente con el obtenido experimentalmente de (-)-*cis*-**4**. Por otra parte, el valor de $[\alpha]_{670}$ calculado resultó ser mayor comparado con el experimental, esto posiblemente debido a la baja solubilidad del compuesto en la fase móvil utilizada. Sin embargo, tras esta comparación se logró concluir que (2*S*,4*S*)-**4** corresponde al enantiómero levorrotatorio y por lo tanto, su configuración absoluta es (-)-(2*S*,4*S*)-**4**.

7. ESPECTROS.



Espectro 1: ^1H -RMN de (\pm) -cis-4.

8. BIBLIOGRAFÍA.

Allenmark, S. & Gawronski, J., 2008. Determination of Absolute Configuration—an Overview Related to This Special Issue. *Chirality*, Vol 20, pp. 606-608.

Allouche, A.-R., 2011. Gabedit—A graphical user interface for computational chemistry softwares.. *J. Comput. Chem.*, 32(1), pp. 174-182.

Astec, 2004. *Chirobiotic Handbook: A guide to using macrocyclic glycopeptide bonded phases*. 5ta ed. USA: Advanced Separation Technologies Inc..

Bermudez, *et al.*, 2011. Simple preparation of new N-(6-methyl-2-nitrophenyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-yl) pyrrolidin-2-ones and their spectroscopic analysis. *Universitas Scientiarum*, 16(2), pp. 160-167.

Berova, N., Di Bari, L. & Pescitelli, G., 2007. Application of electronic circular dichroism in configurational and conformational analysis of organic compounds. *Chemical Society Reviews*, Vol 36, pp. 914-931.

Bertucci, C., Salvadori, P. & Guimaraes, L. L., 1994. Determination of optical purity by high-performance liquid chromatography upon non-chiral stationary phases with dual circular dichroism/absorption detection. *Journal of Chromatography A*, Vol 666, pp. 535-539.

Bertucci, C. & Tedesco, D., 2012. Advantages of electronic circular dichroism detection for the stereochemical analysis and characterization of drugs and natural products by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, Vol 1269, pp. 69-81.

Bosch, M. E., Sánchez, A. R., Rojas, F. S. & Ojeda, C. B., 2008. Recent advances in analytical determination of thalidomide and its metabolites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol 46, pp. 9-17.

Brocksom, T., Nakamura, J., Ferreira, M. & Brocksom, U., 2001. The Diels-Alder Reaction: an Update. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12(5), pp. 597-622.

Bruhn, T., Schaumlöffel, A., Hemberger, Y. & Bringmann, G., 2013. SpecDis: Quantifying the Comparison of Calculated and Experimental Electronic Circular Dichroism Spectra. *Chirality*, Vol 25, pp. 243-249.

Davies, N. & Teng, X. W., 2003. Importance of Chirality in Drug Therapy and Pharmacy Practice: Implications for Psychiatry. *Advance in Pharmacy*, I(3), pp. 242-252.

Debie, E., *et al.*, 2011. A Confidence Level Algorithm for the Determination of Absolute Configuration Using Vibrational Circular Dichroism or Raman Optical Activity. *ChemPhysChem*, Vol 12, pp. 1542-1549.

Easson, L. & Stedman, E., 1933. Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action. *Biochemical Journal*, 27(4), pp. 1257-1266.

Florez, J., 2008. *Farmacología Humana*. Tercera ed. España: Masson.

Franks, M., Macpherson, G. & Figg, W., 2004. Thalidomide. *The Lancet*, Vol 363, pp. 1802-1811.

Giorgio, E., Parrinello, N., Caccamese, S. & Rosini, C., 2004. Non-empirical assignment of the absolute configuration of (-)-naringenin, by coupling the exciton analysis of the circular dichroism spectrum and the ab initio calculation of the optical rotatory power. *Organic & Biomolecular Chemistry*, Vol 24, pp. 3602-3607.

Gong, R., Li, P. & Yu, J., 2013. Experiment and modeling for the separation of trans-stilbene oxide enantiomers on Chiralcel OD preparative column. *Journal of Chromatography A*, Vol 1286, pp. 119-126.

Gottarelli & Mason, 1970. The Circular Dichroism and Absolute Configuration of (+)-trans-stilbene oxide. *Journal Chemistry Society*, pp. 1349-1353.

Gutierrez, M., *et al.*, 2011. 1-[2-(4-Nitrophenyl)-5-(5-phenyl-1,2-oxazol-3-yl)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-4-yl]pyrrolidin-2-one monohydrate. *Acta Crystallographica*, Vol 67, pp. 175-176.

Hmuda, S., *et al.*, 2013. Solvent effects on the absorption spectra of potentially pharmacologically active 5-alkyl-5-arylhydantoin: a structure–property relationship study. *Journal of Serbian Chemical Society*, 78(5), pp. 627-637.

Kiesswetter, R., Brandi, F., Kastner-Puslet, N. & Mannschreck, A., 2003. Chiroptical Detection During Liquid Chromatography: Deconcolution of Overlapping Peaks of Enantiomers and Its Applications. *Chirality*, Vol 15, pp. S40-S49.

Kott, L., Holzheuer, B., Wong, M. & Webster, G., 2007. An evaluation of four commercial HPLC chiral detectors: A comparasion of three polarimeters and a circular dichroism detector. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Vol 43, pp. 57-65.

Liu, Y. & Zou, H., 2008. High-performance liquid chromatographic evaluation of a coated cellulose tris(3,5-dimethylphenyl carbamate) chiral stationary phase having a small-pore silica support. *Journal of Chromatography A*, Vol 1178, pp. 118-125.

Maddala, V. *et al.*, 2013. Isolation and Characterization of S-Enantiomer in Montelukast. *American Journal of Analytical Chemistry*, Vol 4, pp. 56-61.

McConathy, J. & Owens, M. J., 2003. Stereochemistry in Drug Action. *Primary Care Companion Journal Clinical Psychiatry*, 5(2), pp. 70-73.

Mohan, S., Mohan, E. & Yamsani, M., 2009. Chirality and its Importance in Pharmaceutical Field- An Overview. *International Journal of Pharmaceutical Science and Nanotechnology*, 1(4), pp. 309-316.

Muñoz, M., Bucio, M. & Joseph-Nathan, P., 2013. Chiroptical Studies of Flavanone. *Natural Product Communications*, 8(0), pp. 1-4.

Neese, F., 2012. The ORCA program system. *Wiley Interdiscip. Rev.: Comput. Mol. Sci.*, 2(1), pp. 73-78.

Pannikar, V., 2003. The Return of Thalidomide: new uses and renewed concerns. *Leprosy Review*, Vol 74, pp. 286-293.

Pollini, G. P., *et al.*, 2005. Enantioselective Approach to Tropane Skeleton: Synthesis of (1S,5S,6R)-6-hydroxy-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]octan-3-one. *Synlett*, Issue 1, pp. 164-167.

Revision C.02, G. O. *et al.*, 2004. *Gaussian, Inc.*. Wallingford CT: s.n.

Rice, P. *et al.*, 1989. Specific rotation measurements from peak height data, with a gaussian peak model. *Talanta*, 36(4), pp. 473-478.

Roussel, C. *et al.*, 2004. Chiral liquid chromatography contribution to the determination of the absolute configuration of enantiomers. *Journal of Chromatography A*, Vol 1037, pp. 311-328.

Salvadori, P., Rosini, C. & Bertucci, C., 1984. Circular Dichroic Detection in the HPLC of Chiral Molecules: Direct Determination of Elution orders. *The Journal of Organic Chemistry*, 49(26), pp. 5050-5054.

Savitha & Perumal, 2006. An efficient one-pot synthesis of tetrahydroquinoline derivatives via an aza Diels–Alder reaction mediated by CAN in an aqueous medium and oxidation to heteroaryl quinolines. *Tetrahedron Letters*, Issue 47, pp. 3589-3593.

Shriner, *et al.*, 2003. *The Systematic Identification of Organic Compounds*. 8th ed. United States: Wiley.

Slitt, y otros, 2006. trans-Stilbene Oxide Induces Expression of Genes Involved in Metabolism and Transport in Mouse Liver via CAR and Nrf2 Transcription Factors. *Molecular Pharmacology*, 69(5), pp. 1554-1563.

Srebro, M., Govind, N., A. de Jong, W. & Autschbach, J., 2011. Optical Rotation Calculated with Time-Dependent Density Functional Theory: The OR45 Benchmark. *The Journal of Physical Chemistry A*, Vol 115, pp. 10930-10949.

Tang, M., Zhang, J., Zhuang, S. & Liu, W., 2012. Development of chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic separation. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol 39, pp. 180-194.

Tranter, G., 2010. Circular Dichroism Spectrometers. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Vol II, pp. 325-336.

Valiev, M. *et al.*, 2010. NWChem: a comprehensive and scalable open-source solution for large scale molecular simulations. *Computer Physics Communications*, 181(9), p. 1477–1489.

Wang, W.-F.*et al.*, 2009. Chiral separation of trans-stilbene oxide through cellulose acetate butyrate membrane. *Tetrahedron: Asymmetry*, Vol 20, pp. 1052-1056.

Yiwen, Y., Baogen, S., Hanwen, S. & Qilong, R., 2007. *Highly Enantioselective HPLC Separation of 5-Methyl-5-phenylhydantoin on the Norvancomycin-bonded Chiral Stationary Phase*. [En línea] Disponible en: http://www.paper.edu.cn/en_releasepaper/content/11167 [Último acceso: 11 Agosto 2014].