

Una aplicación de la técnica de difracción de rayos X
EN LA INDUSTRIA FARMACEUTICA

Al principio de la novela de Lewis Carroll "A través del espejo y lo que Alicia encontró allí", Alicia descubre un libro escrito en un enigmático idioma. Se da cuenta que el libro usa una escritura especular, y, por lo tanto, necesita ver su imagen invertida en un espejo, para así poder leer el poema "Jabberwocky", aunque se da cuenta que este carece de sentido. Leonardo da Vinci había usado la misma técnica de escritura para sus notas personales, tal vez con la idea de cifrar sus apuntes.

Pero no todo se puede cifrar de esta manera. Por ejemplo, la imagen especular de una esfera es la esfera misma, sin cambio. Al contrario, una mano izquierda reflejada en un espejo se transforma en una mano derecha. **Caminar invirtiendo los zapatos izquierdo y derecho no es nada cómodo.** Más importante para nosotros, cada mano, aunque incluye los mismos cinco dedos y la misma estructura interna **de huesos y músculos**, se ha diferenciado para especializarse en funciones distintas. Así, la inmensa mayoría de las personas zurdas no puede escribir con la mano derecha, y viceversa. Aunque hay excepciones acerca de la diferenciación izquierdo/derecho: Leonardo da Vinci era ambidiestro, y solía escribir normalmente de izquierda a derecha para sus documentos públicos (usaba entonces la

mano derecha), o de derecha a izquierda con escritura en espejo para sus documentos cifrados (usaba entonces la mano izquierda). También existe el raro caso de los palíndromos, unos textos que se pueden leer en ambos sentidos, sin cambiar su "sentido": un ejemplo con cuatro palabras en castellano es: "Sé verlas al revés", mientras el escritor Georges Perec publicó en 1970 un extraordinario palíndromo en francés, contando de 1247 palabras y 5566 letras [1]. **El número de letras no es una casualidad: 5566 es una multiplicación palindrómica, $11 \times 23 \times 2 \times 11$.**

La naturaleza usa los conceptos de "derecha", "izquierda" y fabrica palíndromos a escala molecular. Técnicamente, una molécula diferenciando la izquierda de la derecha es quiral, y genera dos enantiómeros, llamados justamente izquierdo (abreviado S, **de la palabra latina Sinister**) y derecho (abreviado R, **por Rectus**). Es el caso de casi todos los aminoácidos conformando las proteínas, los cuales son siempre de quiralidad S. Al contrario, una molécula estrictamente idéntica a su imagen especular es aquiral. Finalmente, un palíndromo molecular es un compuesto meso, es decir, un compuesto con fragmentos quirales pero que en su globalidad es indistinguible de su imagen especular





(véase Figura 1). Una planta encontrada en el norte de México, conocida bajo el nombre de Gobernadora (*Larrea tridentata*) tiene un metabolismo secundario generando una molécula meso, **parte de la familia de los lignanos**, usada en etnofarmacología por sus propiedades antioxidantes [2].

El punto de importancia para la industria farmacéutica proviene de que, en muchos casos, dos enantiómeros de la misma molécula no realizan la misma función biológica, o lo hacen con una eficiencia diferente, **de la misma manera que los diestros escriben con mucha dificultad con la mano izquierda**. El caso emblemático, debido a sus consecuencias, es el de la talidomida: el enantiómero R produce un efecto sedante, mientras el enantiómero S tiene efectos teratogénicos en el feto, causando amelia (malformación congénita caracterizada por la ausencia de miembros superiores o inferiores). Un medicamento conteniendo talidomida debe por lo tanto carecer totalmente del enantiómero S para obtener la autorización para su venta. Aunque la forma R tampoco es muy segura, ya que en 1995 se demostró que tiene un potencial de inversión quiral *in vitro*, transformándose en la forma nociva S.

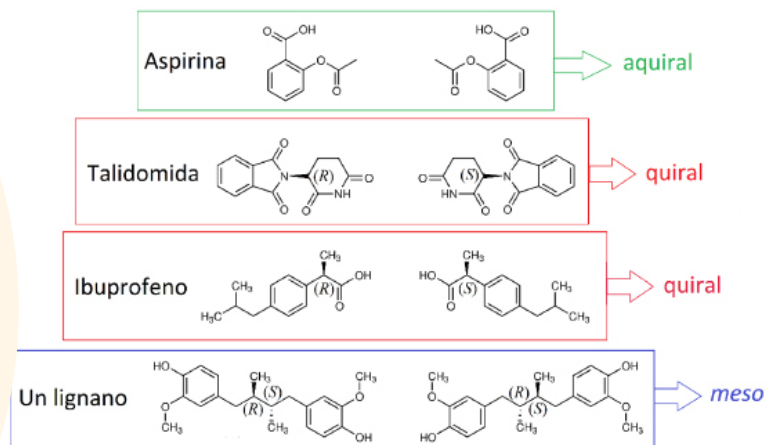


Figura 1. Ejemplos de moléculas quirales y aquirales. Las moléculas de la columna derecha son imágenes especulares de las moléculas en la columna izquierda. La asignación de los centros asimétricos (R o S) se marcan en las moléculas quirales.

En otros casos ambos enantiómeros generan el efecto deseado. Es posible entonces vender cualquier enantiómero puro, o bien una mezcla 50/50% de cada uno, conocida como mezcla racémica. El ibuprofeno, uno de los antiinflamatorios de mayor venta en la actualidad, es una

mezcla racémica. En este caso preciso, no vale la pena producir un enantiómero puro: la síntesis a nivel industrial de los enantiómeros puros es mucho más costosa que la producción de mezclas racémicas.

Actualmente, el 50% de los medicamentos vendidos son quirales (incluyendo moléculas meso); la mitad de este 50% son enantiómeros puros, y, por ley, es indispensable entonces verificar experimentalmente que cada lote producido para un principio activo de un fármaco (API) contiene exclusivamente el enantiómero deseado.

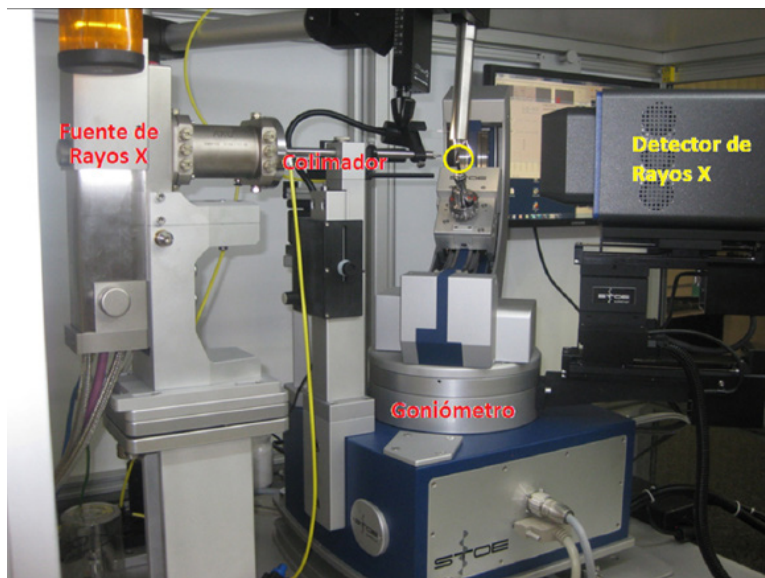
La OMS marca en sus documentos: "When a single enantiomer of the API is claimed for non-pharmacopoeial APIs, unequivocal proof of absolute configuration of asymmetric centres should be provided, such as determined by X-ray of a single crystal" [3]. La determinación de la configuración de los centros asimétricos (o quirales) corresponde a la determinación de la configuración absoluta de la molécula.

La difracción de rayos X en monocristales es efectivamente la única técnica experimental para determinar con absoluta

seguridad y a ciegas (es decir sin necesidad de comparación con otro compuesto de quiralidad conocida) si un enantiómero es S o R. Se determinan las coordenadas de los átomos conformando la molécula en un espacio tridimensional, a partir de las intensidades de difracción del cristal, medidas con un difractómetro (véase Figura 2). La posición relativa de los átomos determina entonces la configuración absoluta de la molécula. Para diferenciar un enantiómero de su imagen especular, solo se deben cumplir tres condiciones en el estudio por difracción: (1) tener un

monocristal de dimensiones razonables, en general mayores a 0.1mm; (2) la molécula debe contener por lo menos un átomo pesado, con un número atómico mayor a 16 (azufre); (3) se deben usar algunas condiciones experimentales adecuadas, por ejemplo, una longitud de onda larga (mayor a 0.7 Å) para los rayos X. El fenómeno físico que permite la asignación de la quiralidad a partir del patrón de difracción, se llama dispersión anómala (aunque el termino dispersión resonante sería mucho más adecuado), fue observado y teorizado en los años 1950 por el cristalógrafo holandés, Johannes Bijvoet (1892-1980) [4]. Sin embargo, el fenómeno había sido conjeturado desde 1928 por el físico sueco de la universidad de Uppsala, Ivar Waller (1898-1991).

Figura 2. Un difractómetro para cristalografía de monocristal, instalado en el IFUAP. Las partes principales se indican; el cristal se encuentra en el centro del círculo amarillo, entre el colimador y el detector.



El fenómeno de dispersión anómala ocurre cuando la energía de los rayos X usados para medir la intensidad de difracción se aproxima a un borde de absorción de un átomo presente en la muestra. Este átomo, **al interactuar con los fotones de rayos X**, ioniza parcialmente una capa electrónica profunda, y, a consecuencia de ello, se transforma en una fuente de rayos X de energía **(o de longitud de onda)** ligeramente diferente a la de la fuente de radiación del difractor. El resultado de las interferencias entre las ondas dispersadas por este átomo

mo y los otros permite medir diferencias de intensidades de difracción para pares de reflexiones relacionadas por un cierto elemento de simetría. Estas relaciones de simetría ya eran conocidas desde 1913, gracias al trabajo del mineralogista, Georges Friedel (1865-1933). Son estas diferencias de intensidades las que permiten determinar si un centro quiral es R o S, pero son de amplitud pequeña y difíciles de medir para átomos ligeros. De aquí la necesidad de tener por lo menos un átomo pesado en la muestra, para amplificar el fenómeno de dispersión anómala.

Cuando las condiciones (1) y (2) no se aplican, sea porque el compuesto químico es un líquido a temperatura ambiental, o no contiene átomos más pesados que el azufre, las normas que regulan la industria farmacéutica autorizan reacciones químicas para transformar la molécula, siempre y cuando el número de reacciones sea mínimo (lo ideal es un solo paso de transformación) y asegurándose de que estas reacciones no modifican la quiralidad de la molécula. Se determina entonces

la configuración absoluta por difracción de rayos X para el nuevo compuesto cristalizado, para luego inferir la configuración del principio activo del medicamento sintetizado. Si no se realiza este control de calidad, se prohíbe la venta del medicamento. **Cualquier intento para infringir estas normas genera castigos tan severos, que la compañía involucrada desaparece del mercado.**

Más allá de la talidomida o del ibuprofeno, los cuales contienen un solo centro asimétrico para definir el enantiómero **(este centro quiral casi siempre es un átomo de carbono)**, otras moléculas tienen varios centros quirales, generando varios isómeros, cada uno con una distribución espacial única para sus átomos. Por ejemplo, el captopril y el ketoconazol (véase Figura 3) son medicamentos con dos centros quirales, y, potencialmente generan cuatro isómeros distintos (SS, SR, RS, RR). Las estructuras de los isómeros usados



como principios activos se re-determinaron recientemente en la BUAP [5]. Los esteroides, usados por ejemplo como anticonceptivos, tienen alrededor de diez centros quirales (dando lugar a más de 1000 isómeros distintos), y la palitoxina, una sustancia extremadamente tóxica producida por ciertos corales, con sus 64 centros quirales, tiene alrededor de 10^{19} isómeros. Por esta razón, la síntesis del isómero correspondiente al producto natural se considera como uno de los más grandes logros de la química orgánica moderna. Fue concluida en 1994 por Yoshito Kishi (1937-2023) y colaboradores, en la Universidad de Harvard [6].

Sin embargo, determinar la configuración absoluta de una molécula por difracción de rayos X de monocristal no depende del número de centros quirales: la dificultad técnica es la misma con uno, o 64 centros quirales, haciendo de esta técnica una herramienta universal para la

caracterización estructural de los compuestos quirales.

Muchos investigadores consideran la penicilina, descubierta en 1928 por Alexander Fleming (1881-1955), como uno de los más útiles descubrimientos en el campo de los medicamentos. Se trata de una molécula conteniendo tres centros quirales (8 isómeros). Su determinación estructural por difracción de rayos X fue realizada por Dorothy Hodgkin (1910-1994), durante la segunda guerra mundial. Más precisamente, ella determinó la estructura de la sal de potasio de la penicilina G. No solamente confirmó la presencia de un ciclo de cuatro miembros (un anillo β -lactámico), cuando muchos químicos en esta época

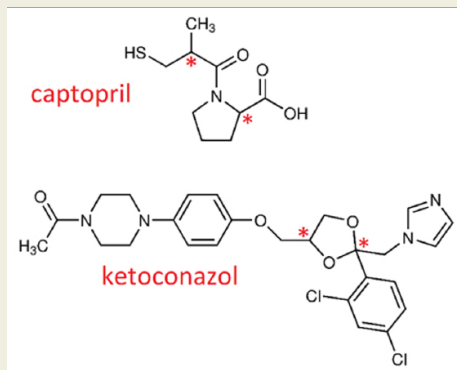
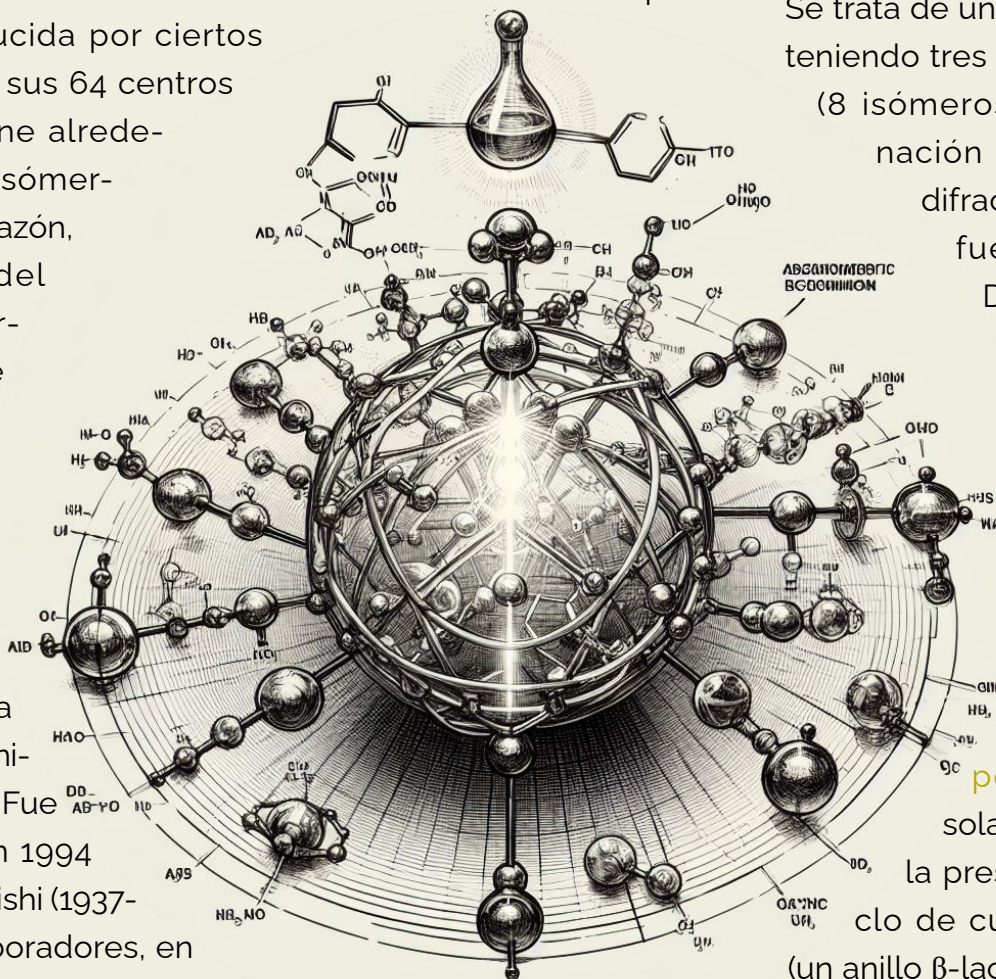


Figura 3. Dos ejemplos de moléculas incluyendo 2 centros quirales, marcados con asteriscos. En cada caso, uno solo de los cuatro isómeros se usa como principio activo de los medicamentos.

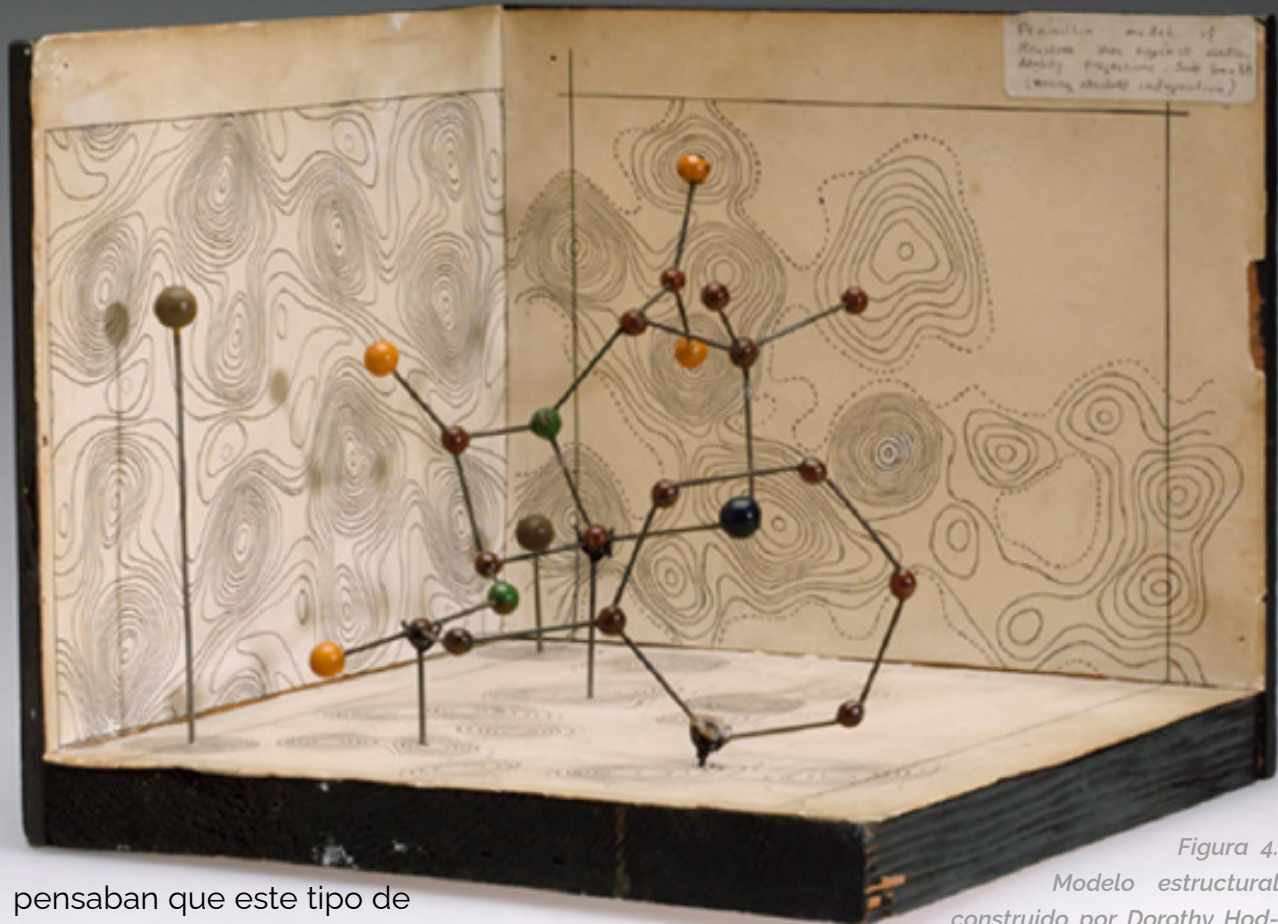
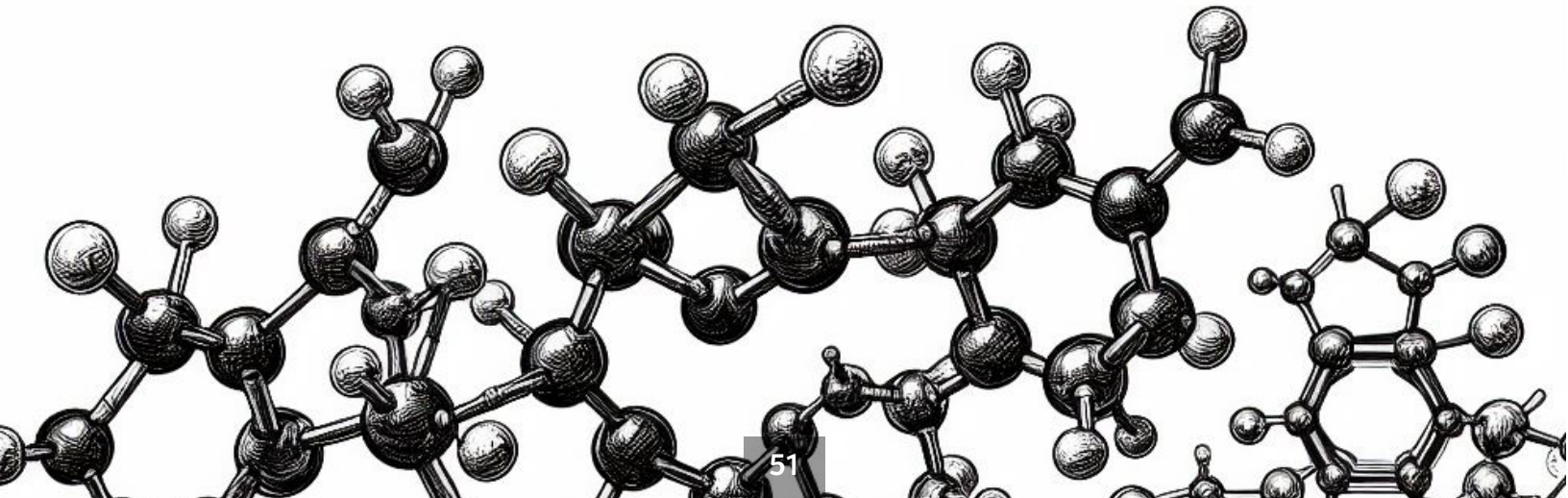


Figura 4. Modelo estructural construido por Dorothy Hodgkin para la penicilina. Los mapas dibujados (a mano) en los tres planos perpendiculares de la maqueta son mapas de densidad electrónica calculados a partir de los datos de difracción, y permiten establecer las coordenadas de cada átomo. La etiqueta arriba a la derecha, con la letra de la investigadora, dice: "Penicillin: model of structure seen against electron density projections. Scale 2 cm = 1 Å (wrong absolute configuration)".

pensaban que este tipo de ciclo no es estable, sino también determinó su configuración absoluta [7]. Construyó un modelo de la molécula, todavía visible en un museo de Londres (véase Figura 4), pero ... ise equivocó!, en la etiqueta pegada sobre la maqueta, anotó: "wrong absolute configuration". Para visualizar la estructura de la penicilina, se debe mirar el modelo en un espejo. Dorothy Hodgkin, tal como Alicia, pasó del otro lado del espejo, no para tratar de descifrar el poema "Jabberwocky", sino para regalar a la humanidad la estructura molecular del primer antibiótico.



Referencias

- [1] https://www.arretetonchar.fr/wp-content/uploads/2013/IMG/pdf_GeorgesPerec_le_grand_palindrome.pdf (consultado el 22/02/2024).
- [2] C. L. Salinas-Salazar, M. del R. Camacho-Corona, S. Bernès, N. Waksman de Torres, 2,2'-Dime-thoxy-4,4'-lrel-(2R,3S)-2,3-dimethylbutane-1,4-di-yl)diphenol, *Acta Cryst.* E65, 2009, o1279.
- [3] WHO, Technical Report Series No. 986, 2014.
- [4] J. M. Bijvoet, Phase determination in direct Fourier synthesis of crystal structures, *Proc. K. Ned. Akad. Wet. B*, 52, 1949, 313-314.
- [5] I. Angel-Nieto, *Cristaloquímica de cocrystalos de aspirina con otros fármacos comunes*, Tesis de Maestría, BUAP, 2021. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/6dd548e7-e780-4068-age0-281426c2ea11> (consultado el 22/02/2024).
- [6] E. M. Suh, Y. Kishi, Synthesis of Palytoxin from Palytoxin Carboxylic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 1994, 11205-11206.
- [7] D. Crowfoot, C. W. Bunn, B. W. Rogers-Low, A. Turner-Jones, The X-ray crystallographic investigation of the structure of penicillin. En *Chemistry of Penicillin*, editado por Hans T. Clarke, Princeton University Press, 1949, pp. 310-366.