



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Departamento de Química

TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

*“Desarrollo de columnas capilares monolíticas
quirales para técnicas separativas miniaturizadas.
Aplicación a la enantioseparación de compuestos de
interés biológico”*

Lic. Romina Noel Echevarría

Director: *Dr. Mario R. Reta*

Co-directora: *Dra. Sonia Keunchkarian*

2018

El presente trabajo de Tesis fue realizado en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA) de la División Química Analítica de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Mario R. Reta y la co-dirección de la Dra. Sonia Keunchkarian.

El mismo se pone en consideración de las autoridades de la Universidad Nacional de La Plata, con el objeto de acceder al grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas.

Lic. Romina Noel Echevarría

Dr. Mario R. Reta

Director

Dra. Sonia Keunchkarian

Co-directora

*“La ciencia no conoce país,
porque el conocimiento pertenece a la humanidad,
y es la antorcha que ilumina el mundo”*

Louis Pasteur

*“Para plantear nuevas preguntas, nuevas posibilidades,
considerar los viejos problemas desde un nuevo ángulo,
requiere imaginación creativa
y marca un avance real en la ciencia”*

Albert Einstein

A mi familia

Agradecimientos

En todo este tiempo de la realización de la Tesis Doctoral han pasado diversos momentos, desde nervios, preocupaciones, tristezas hasta la alegría y felicidad de ver “*un pico cromatográfico*”. Sin embargo, lo más importante de todo este tiempo fueron las personas que me han acompañado en este largo camino. Sin todos ellos esto no hubiese sido posible.

En primer lugar, quisiera agradecer a la Dra. Cecilia Castells por darme la oportunidad de formar parte de este gran grupo “familia” de investigación, por enseñarme, por el apoyo y dedicación prestada en todo momento.

Agradecer al Dr. Mario Reta por haber dirigido el presente trabajo de Tesis, por las oportunidades brindadas, por la predisposición, los conocimientos compartidos, la confianza, dedicación, paciencia y los buenos momentos. Gracias!!!

Agradecer a la Dra. Sonia Keunchkarian, por su apoyo y paciencia incondicional, por estar siempre, no sólo en los momentos de alegría sino en aquellos más difíciles alentándome a seguir y no bajar los brazos, por transmitirme esa tranquilidad intrínseca y estar predispuesta siempre, por la dedicación prestada y la enseñanza desde un principio. Gracias por brindarme consejos y cariño maternal en cada instancia!!!

Al Dr. José Manuel Herrero Martínez (Universidad de Valencia) por su inestimable contribución al desarrollo de mi trabajo, y por estar siempre predispuesto para transmitir sus conocimientos sobre materiales monolíticos e interés en cada momento.

Al Dr. Jhonny Villarroel (Universidad Nacional de San Luis) por su ayuda y sus oportunas orientaciones en las técnicas de porosimetría de intrusión de mercurio y de adsorción/desorción de nitrógeno.

Agradecer a Ernesto, Enrique, Aarón, Ivana, Oscar, Isa, María, Diego, Lucas, Marta, Ángela, Cristina, Héctor por haberme brindado hermosos e inolvidables momentos y ayudarme en todo lo posible en la realización de la estancia en Valencia.

No puedo olvidarme de las personas más importantes en todo este proceso. Con ellos es con quien he pasado la mayor parte de todos estos años, compartiendo hermosos momentos, risas, cenas, viajes, y por supuesto los mates en cada hora del día. Gracias por hacer que cada día en el laboratorio sea un placer trabajar. Gracias por el gran compañerismo, solidaridad y paciencia en todo, por ser amigos. Gracias Chicas: Fiore, Gi, Car, Estercita; por estar siempre en cada instancia no solo ayudándome cuando lo he necesitado sino para aconsejarme, relajarme y ser amigas-químicas-psicólogas. Gracias Juancito por brindarme consejos, apoyo y esos chistes locos que hacen amenos cada momento. Gracias Agus por haber estado dispuesto en cada momento cuando lo necesité, y sobre todo dando "el ajuste" necesario para que funcione el "equipito". Gracias Lilian, Leo, Nico, Marcos, Emilia por los buenos momentos de cada día y por haber estado dispuestos a ayudarme cuando lo he necesitado. No puedo olvidarme de los chicos que han pasado por el laboratorio, Leidy, Jaiver, Brenda, Rocío y Leo (pampa).

Agradecer a mis amigos incondicionales: Pedrin, Pao, Nadia, Sele, Lucy, Naty, por siempre estar presentes en cada momento cuando los necesito, y a pesar de la distancia y del tiempo transcurrido desde mi partida de La Pampa, no cambia nunca esta gran amistad.

Quiero agradecer a lo más importante en la vida "*mi familia*", a mis padres, abuelos, hermanos, tías, tíos y primos, por estar siempre a mi lado, apoyándome en todas las decisiones y aguantándome en los malos momentos y siempre ayudándome en todos los aspectos. En especial a mi Abuelo "Vasco", que pese a que ya no está con nosotros, sé que estaría orgulloso de mí por haber llegado hasta aquí. ¡Gracias, los adoro y amo!!!!

No me puedo olvidar, especialmente a Fran y su familia, quien siempre han estado a mi lado en esta última etapa, acompañándome, apoyándome y aguantándome en todas mis decisiones además de su ayuda incondicional en todos los aspectos. Gracias Fran "Amor" por ser mi amigo, compañero y novio!!!

Índice

<i>Abreviaturas</i>	1
<i>Resumen</i>	3
Capítulo I – Introducción general	
I.1.Generalidades	6
I.2.Columnas monolíticas	8
I.2.1. Columnas monolíticas de sílice	8
I.2.2. Columnas monolíticas orgánicas	10
<i>Columnas basadas en poliacrilamida</i>	12
<i>Columnas basadas en poliestireno</i>	12
<i>Columnas basadas en ésteres de metacrilato y acrilato</i>	13
I.2.2.1. Obtención de columnas monolíticas basadas en metacrilato	13
<i>Monómeros</i>	14
<i>Agente entrecruzante (cross-linker)</i>	15
<i>Sistema porogénico</i>	15
<i>Sistema de iniciación</i>	17
<i>Mecanismo de polimerización</i>	18
I.2.2.2. Caracterización de materiales monolíticos	21
Caracterización de las propiedades morfológicas	21
<i>Microscopía electrónica de barrido</i>	21
<i>Porosimetría de intrusión de mercurio</i>	22
<i>Adsorción/desorción de nitrógeno</i>	24
<i>Evaluación de permeabilidad cromatográfica</i>	26
Caracterización de las propiedades cromatográficas	27
I.3. Reconocimiento quiral	28
I.3.1. Principios del reconocimiento quiral	28
I.3.2. Selectores quirales en técnicas de separación	29
<i>Selectores quirales derivados de polisacáridos</i>	32
I.4. Referencias	37

Capítulo II - Desarrollo de columnas capilares monolíticas quirales para HPLC

II.1. Introducción	43
II.1.1. Miniaturización en técnicas de separación	44
II.1.1.1. Sistemas de HPLC en escalas micro, capilar y nano	45
II.1.2. Columnas empleadas para cromatografía de líquidos	46
II.1.2.1. Columnas particuladas convencionales	46
II.1.2.2. Columnas monolíticas	47
II.1.3. Referencias	52
II.2. Objetivos	54
II.3. Experimental	56
II.3.1. Preparación de las CCMQs para HPLC-capilar	57
II.3.1.1. Acondicionamiento del capilar	57
II.3.1.2. Composición de las mezclas de polimerización	58
II.3.1.3. Síntesis de monolitos en “ <i>bulk</i> ”	61
II.3.1.4. Fabricación de las CCMs	61
II.3.1.5. Caracterización de las CCMs	62
II.3.1.5.1. Propiedades morfológicas	62
II.3.1.5.2. Propiedades cromatográficas	63
II.3.2. Síntesis del selector quiral	63
II.3.3. Adsorción del selector quiral en las CCMs	65
II.3.4. Sistema cromatográfico	66
II.3.5. Referencias	70
II.4. Resultados y discusión	71
II.4.1. Preparación de las columnas monolíticas poliméricas	72
II.4.1.1. Composición de la mezcla de polimerización	72
II.4.1.2. Fabricación de las CCMs	75

II.4.1.3. Caracterización de las CCMs	76
<i>Microscopia electrónica de barrido</i>	76
<i>Permeabilidad cromatográfica</i>	80
<i>Adsorción/desorción de nitrógeno</i>	83
<i>Porosimetría de intrusión de mercurio</i>	87
II.4.2. Síntesis del selector quirál	91
II.4.2.1. Caracterización del producto	91
II.4.3. Funcionalización de las CCMs con el selector quirál	95
II.4.4. Enantioresolución de compuestos de interés biológico	98
II.4.4.1. Efecto de la composición de la fase móvil en la enantioresolución	98
II.4.4.2. Influencia del tipo y cantidad de aditivo en la fase móvil	101
II.4.5. Performance de la CCMQ	106
II.4.6. Estabilidad de la CCMQ	108
II.4.7. Performance de la CCM hacia moléculas pequeñas	110
II.4.8. Referencias	112
II.5. Conclusiones parciales	114

Capítulo III - Desarrollo de columnas capilares monolíticas quirales para CEC

III.1. Introducción	117
III.1.1. Electro cromatografía Capilar	118
III. 1.1.1. Equipamiento	119
III.1.2. Columnas empleadas	120
III.1.2.1. Columnas particuladas	121
III.1.2.2. Columnas de tubo abierto	122
III.1.2.3. Columnas monolíticas	122

<i>Columnas monolíticas basadas en ésteres de metacrilato</i>	123
III.1.3. Modificación química de los monolitos poliméricos	124
III.1.3.1. Fotoinjerto	125
III.1.4. Fases estacionarias quirales en CEC	127
III.1.5. Referencias	128
III.2. Objetivos	131
III.3. Experimental	133
III.3.1. Preparación de las CCMQs para CEC	134
III.3.1.1. Fabricación de las CCMs	134
III.3.1.2. Fotoinjerto	136
III.3.1.3. Recubrimiento <i>in situ</i> del lecho monolítico con CDMPC	138
III.3.2. Condiciones electrocromatográficas	139
III.3.3. Referencias	141
III.4. Resultados y discusión	142
III.4.1. Preparación de las CCMs	143
III.4.1.1. Estudio de las condiciones de fotoinjerto	144
<i>Recubrimiento con el selector quiral</i>	144
<i>Modificación de la superficie monolítica</i>	147
III.4.2. Optimización de la enantioresolución de compuestos quirales	150
III.4.2.1. Efecto del modificador orgánico	150
III.4.2.2. Evaluación de la performance de la CCMQ	151
III.4.2.3. Estudio de robustez de las CCMQs	154
III.4.3. Referencias	156
III.5. Conclusiones Parciales	157
<i>Conclusiones Generales</i>	159
<i>Contribuciones Científicas</i>	161

Abreviaturas

ACN	acetonitrilo
AIBN	α, α' -azobisisobutironitrilo
AMPS	ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico
BMA	metacrilato de butilo
BET	Brunauer-Emmet-Teller
B₀	permeabilidad cromatográfica
CCMs	columnas capilares monolíticas
CCMQs	columnas capilares monolíticas quirales
CDMPC	<i>tris</i> (3,5-dimetilfenil) carbamato de celulosa
CE	electroforesis capilar
CEC	electrocromatografía capilar
CG	cromatografía de gases
CL	cromatografía de líquidos
CLC	cromatografía de líquidos capilar
CV	coeficiente de variación
DEA	dietanolamina
EDMA	etilenglicol dimetacrilato
EOF	flujo electroosmótico
FA	ácido fórmico
FEQs	fases estacionarias quirales
FM	fase móvil
GMA	glicidil metacrilato
HEMA	2-hidroxietil metacrilato
HMA	hexil metacrilato
HPLC	cromatografía de líquidos de alta performance
Hx	n-hexano

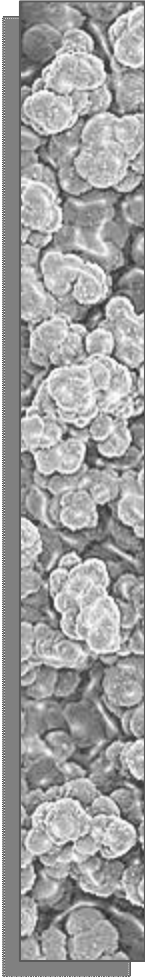
IPA	2-propanol/isopropanol
LMA	lauril metacrilato
LPO	lauril peróxido
MeOH	metanol
META	cloruro de [2-(metacrililoiloxi)etil] trimetilamonio
MIP	porosimetría de intrusión de mercurio
NP-HPLC	cromatografía de líquidos de fase normal
OT-CEC	electrocromatografía capilar de tubo abierto
RP-HPLC	cromatografía de líquidos de fase inversa
SEM	microscopía electrónica de barrido
STP	temperatura y presión estándar
TFA	ácido trifluoroacético
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil- etilendiamina
THF	tetrahidrofurano
UHPLC	cromatografía de líquidos de ultra alta performance
(γ-MAPS)	metacrilato de 3-(trimetoxisilil)propilo
RSD	desviación estándar relativa

Resumen

En el presente trabajo de Tesis se desarrollaron y caracterizaron nuevas fases estacionarias monolíticas quirales para ser empleadas en cromatografía de líquidos a escala miniaturizada (HPLC y electrocromatografía capilar). El objetivo de emplear este tipo de escala con fases estacionarias monolíticas fue realizar separaciones rápidas y eficientes que requieran el empleo de escasa cantidad de reactivos y que produzcan mínimo volumen de desechos, de acuerdo a los principios de la “*Química Verde*”. Sobre los lechos monolíticos poliméricos orgánicos sintetizados se adsorbió un selector quiral a fin de ser empleados en la separación de compuestos quirales de interés biológico.

En el **Capítulo II**, se presenta el desarrollo de columnas monolíticas sintetizadas *in situ*, es decir, en el interior de tubos capilares de sílice. Para ello, se optimizaron las condiciones de polimerización (tiempo y temperatura de reacción, concentración de los monómeros, de la mezcla de solventes porogénicos y del iniciador) para obtener un lecho monolítico con características estructurales (como permeabilidad, área superficial) y funcionalidad química adecuadas para actuar como soporte cromatográfico. Los monolitos fabricados se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido, porosimetría de intrusión de mercurio, isothermas de adsorción/desorción de nitrógeno y permeabilidad cromatográfica. También se sintetizó y caracterizó (mediante análisis elemental y espectroscopía IR) el derivado *tris*(3,5-dimetilfenil) carbamato de celulosa para actuar como selector quiral incorporado a la fase estacionaria. Se estudió y evaluó su capacidad de enantiodiscriminación luego de ser adsorbido sobre el lecho monolítico, mediante la separación de diversos compuestos quirales de interés biológico (fármacos, pesticidas, etc.). Se evaluó la performance enantioselectiva de estas nuevas columnas monolíticas quirales en un equipo de HPLC adaptado a escala miniaturizada, mediante cambios en el tipo y composición de la fase móvil, incluyendo la incorporación a la misma de aditivos ácidos y básicos.

En el *Capítulo III*, se presenta el desarrollo de columnas capilares monolíticas quirales con el objetivo de ser empleadas en electrocromatografía capilar. Para crear el flujo electroosmótico necesario en esta técnica, se incorporó sobre la superficie del monolito nativo, un monómero ionizable mediante una nueva metodología denominada “*fotoinjerto*” y posteriormente, también se depositó en el lecho el selector quiral derivado de celulosa que fue sintetizado. En este caso, se optimizó la concentración del monómero ionizable, del selector quiral adsorbido y la composición de la fase móvil hidroorgánica para la enantioseparación de diversos analitos racémicos. Por último, se evaluó la performance de estas nuevas columnas monolíticas en cuanto a la reproducibilidad *intra* e *inter* días, así como también, la estabilidad del depósito quiral a lo largo del tiempo.



Capítulo I

Introducción General

I.1. Generalidades

El término *quiral* se utiliza para designar un objeto que no es superponible sobre su imagen especular, el ejemplo más simple que podemos mencionar es la relación que existe entre nuestras manos (Figura I.1). En química, una molécula quiral posee usualmente un átomo de carbono asimétrico, es decir, un átomo de carbono con sus cuatro sustituyentes diferentes constituyendo así un centro quiral. También, existen otros elementos como azufre, nitrógeno, fósforo y boro que producen centros quirales estables.

Una molécula quiral es aquella que puede existir en por lo menos dos formas *enantioméricas*. Cada una de estas formas enantioméricas son moléculas con la misma fórmula molecular y los mismos enlaces, pero difieren en el ordenamiento espacial de sus átomos y no son superponibles sus imágenes especulares. Una mezcla compuesta de dos enantiómeros en cantidades iguales es denominada *mezcla racémica*.

Aunque los enantiómeros poseen la misma composición química, pueden presentar comportamientos diferentes entre sí cuando se exponen a ambientes quirales, tales como el cuerpo humano. Por ende, el concepto de quiralidad es relevante y de gran importancia en cualquier campo de la química que se relacione con la producción o análisis de compuestos bioactivos, en particular con el desarrollo de fármacos, de agroquímicos, de aditivos alimentarios, fragancias, contaminantes ambientales, entre otros [1,2].

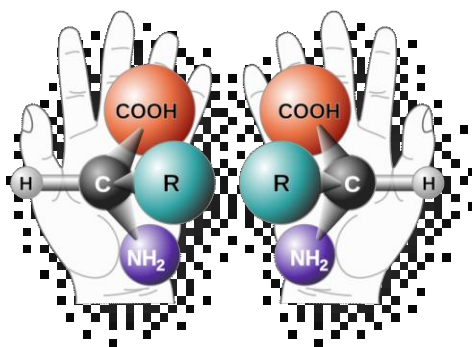


Figura I.1: Representación de las formas enantioméricas de una molécula quiral ejemplificada mediante la quiralidad de las manos.

La tristemente célebre “tragedia de la talidomida” fue un claro ejemplo de la importancia de la quiralidad y marcó un hito en el tratamiento del tema. Este fármaco fue prescrito a principios de los años '60 a mujeres embarazadas que sufrían de náuseas

matutinas. Al ser tomado en el embarazo, impedía el crecimiento adecuado del feto, resultando en malformaciones en el niño. La molécula de talidomida es quiral, siendo el *enantiómero S* un potente tranquilizante, mientras que el *enantiómero R* es teratógeno [3].

En la actualidad, dado que la mayoría de los nuevos fármacos son quirales, un principio activo racémico y cada uno de sus enantiómeros deben someterse a pruebas biológicas y toxicológicas para determinar los perfiles farmacológicos para cada entidad. Es así que, no sólo los compuestos quirales propiamente dichos son objeto de estudio, sino que su producción industrial en diversos ámbitos tiene como objetivo la separación enantiomérica de los mismos [4]. Entre los métodos de resolución de racematos, las separaciones cromatográficas son las de mayor aplicación. Además, para hacer frente a problemas de la estereoselectividad, la cromatografía de líquidos de alta performance (HPLC) es una de las técnicas analíticas elegidas por excelencia [5]. Los métodos para separaciones enantioméricas de fármacos usando cromatografía de líquidos (CL) se han establecido tanto con fines analíticos como para técnicas preparativas [6,7].

La comprensión de la relevancia de la quiralidad ha impactado en diversos ámbitos industriales, demandando técnicas analíticas rápidas, automatizadas, sensibles, selectivas, robustas y aplicables al análisis de una amplia variedad y cantidad de muestras.

Los avances realizados en los procedimientos cromatográficos tienden permanentemente a aumentar la productividad en las determinaciones, así como a reducir el consumo de solventes y de muestra. En este sentido, la cromatografía de líquidos de ultraalta performance (UHPLC), busca mejorar la resolución cromatográfica disminuyendo el diámetro de las partículas de relleno de la columna, lo que conlleva un aumento en la caída de presión del sistema al operar a flujos aceptables [8].

Otras opciones actuales incluyen el empleo de nuevas fases estacionarias. Una alternativa prometedora, es el empleo de lechos monolíticos en cromatografía de líquidos.

Un *monolito* es un bloque único de material continuo con una porosidad uniforme. La síntesis de materiales monolíticos para ser empleados como fases estacionarias en cromatografía de líquidos presenta la posibilidad de controlar la cantidad de poros o canales de paso de la fase móvil y optimizar sus tamaños. Monolitos de alta porosidad tienen mayor área superficial y son más permeables al pasaje de la fase móvil permitiendo un flujo más rápido con bajas caídas de presión. El resultado final son separaciones más rápidas y eficientes [9,10].

I.2. Columnas monolíticas

El mayor interés hacia los monolitos poliméricos orgánicos se debe a que pueden ser diseñados para el análisis de cada sistema en particular, es decir, las fases estacionarias son hechas “a medida”, gracias a la facilidad y al gran número de grupos funcionales que pueden incluirse en la matriz polimérica. En este sentido, se han diseñado monolitos para un gran número de aplicaciones, pudiendo citarse, la separación y análisis de péptidos [11,12], proteínas, oligómeros y polinucleótidos [13,14], compuestos quirales [15], polímeros [16,17] y esteroides [18]. Las columnas monolíticas poliméricas se pueden clasificar básicamente en dos categorías, inorgánicas (o de sílice) y orgánicas.

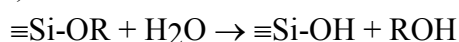
I.2.1. Columnas monolíticas de sílice

Los monolitos de sílice fueron sintetizados por primera vez por Tanaka *y col.* en 1997. Las columnas monolíticas de sílice poseen una alta resistencia física y estabilidad química frente a diversos solventes. Sin embargo, no pueden usarse con eluyentes de pH mayor a 8, al igual que las columnas de sílice particuladas. Además, muestran gran variabilidad y baja reproducibilidad en el proceso de derivatización que afecta significativamente la reproducibilidad de las columnas obtenidas [19].

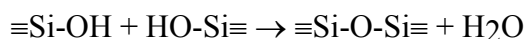
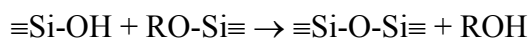
En general, las columnas monolíticas de sílice se preparan mediante la tecnología sol-gel [20,21], con la cual se crea una red continua por gelificación de una solución en el interior del capilar. Los precursores más comúnmente utilizados en la síntesis de estos monolitos son los alcóxidos metálicos, que reaccionan fácilmente con el agua, entre ellos alcóxidos silanos como tetrametoxisilano y tetraetoxisilano.

El proceso sol-gel puede describirse mediante dos etapas: la hidrólisis del alcóxido silano seguida de una reacción de condensación, como se muestra en el siguiente esquema:

a) Hidrólisis:



b) Condensación:



La policondensación se produce posteriormente mediante la unión en cadena de grupos silanoles adicionales. Las características morfológicas de los monolitos de sílice se encuentran determinadas principalmente por el proceso de separación de fases y por el tiempo transcurrido entre el comienzo de dicho proceso y la gelificación [22]. La morfología de la estructura resultante puede controlarse variando las condiciones iniciales y la temperatura de reacción, por lo que se han estudiado diferentes materiales de partida y distintas condiciones experimentales [20,19].

La estructura de un monolito de sílice está formada por un esqueleto interconectado que crea una distribución determinada de poros. La Figura I.2 A muestra la sección transversal de un monolito de sílice y la Figura I.2 B, una ampliación de la superficie, ambas obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM). En ellas se observa una estructura porosa bimodal compuesta por macroporos de 1 a 3 μm y por mesoporos de 10 a 20 nm.

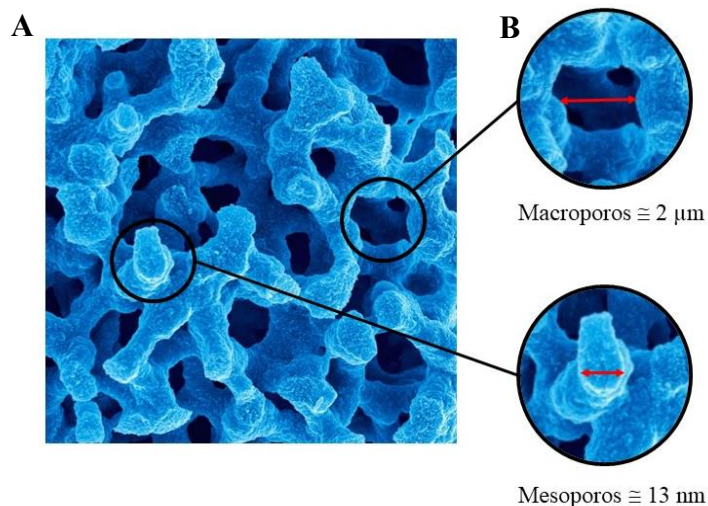


Figura I.2: Micrografía de columnas monolíticas de sílice, A) sección transversal y B) ampliación de la superficie (9000 X).

Como se mencionó anteriormente, la porosidad del lecho continuo se encuentra determinada principalmente por los macroporos, que son los responsables del flujo a través de la columna, mientras que en los mesoporos se establece el proceso de retención de los analitos. En el proceso de formación de la estructura polimérica se puede realizar un tratamiento hidrotérmico con el fin de aumentar el volumen de los mesoporos y el área superficial [23]. Para controlar la contracción del lecho y prevenir su rotura, se seca bajo

presiones reducidas utilizando disolventes específicos [24,25]. También, pueden incluirse etapas de derivatización para obtener fases estacionarias con propiedades alternativas. Todo esto hace que la fabricación de monolitos de sílice sea bastante compleja.

I.2.2. Columnas monolíticas orgánicas

Los monolitos orgánicos están constituidos por polímeros basados en carbono. Las primeras aproximaciones a estos materiales fueron realizadas por Kubín y *col.* hacia fines de los años '60, sintetizando geles de metacrilatos [26]. Posteriormente, Hjertén y *col.* trabajaron con polímeros obtenidos a partir de acrilatos en presencia de una sal, los cuales fueron insertados en columnas de acero inoxidable [27,28]. Svec y Fréchet (1994) publicaron un trabajo sobre monolitos de metacrilatos utilizando la técnica de síntesis más empleada hasta la actualidad, y es la que se desarrolla en este trabajo de Tesis para la fabricación de columnas capilares monolíticas orgánicas [29]. Son varios los tipos de monómeros que han sido estudiados a lo largo del tiempo, pero los más comúnmente utilizados son a base de acrilamidas, estireno-divinilbenceno y ésteres de acrilatos y metacrilatos [30,31].

Si bien las columnas monolíticas poliméricas orgánicas comparten algunas características con las de sílice, hay que destacar algunas particularidades:

- a) Su comportamiento varía considerablemente con los solventes utilizados como fase móvil, dependiendo de cómo se solvate la fase estacionaria será el volumen que ésta ocupe. Esta propiedad es de gran importancia, pues su permeabilidad dependerá entonces de la composición de la fase móvil utilizada.
- b) Los monómeros elegidos son los que determinan las características químicas de la columna, sin necesidad de una posterior derivatización (en la mayoría de los casos).
- c) Estas columnas no se encuentran disponibles comercialmente en todas sus variedades.
- d) Se suelen sintetizar *in situ* en una sola etapa en el interior de capilares de sílice previamente silanizados, de manera de anclarlos a la pared del mismo durante el proceso de polimerización.

- e) Son estables frente a una gran variedad de solventes y pueden utilizarse en un rango muy amplio de pH (2-12).

La gran simplicidad, versatilidad y bajo costo de la preparación hacen que estas columnas puedan y deban ser diseñadas para el análisis de cada muestra en particular.

El proceso de polimerización se inicia con precursores líquidos y se lleva a cabo directamente en el interior de un tubo capilar, lo que permite obtener fácilmente monolitos de cualquier longitud y diámetro. La mezcla de polimerización puede prepararse a partir de diversos monómeros, y esta flexibilidad permite realizar ajustes sencillos para conseguir la columna deseada. El control que puede ejercerse sobre el proceso de polimerización mediante la variación del tipo y concentración de disolvente porogénico, temperatura de polimerización o tipo de iniciador radicalario, permiten optimizar las propiedades porosas de los monolitos resultantes (Figura I.3) y por tanto, la velocidad de flujo de la fase móvil y las propiedades cromatográficas.

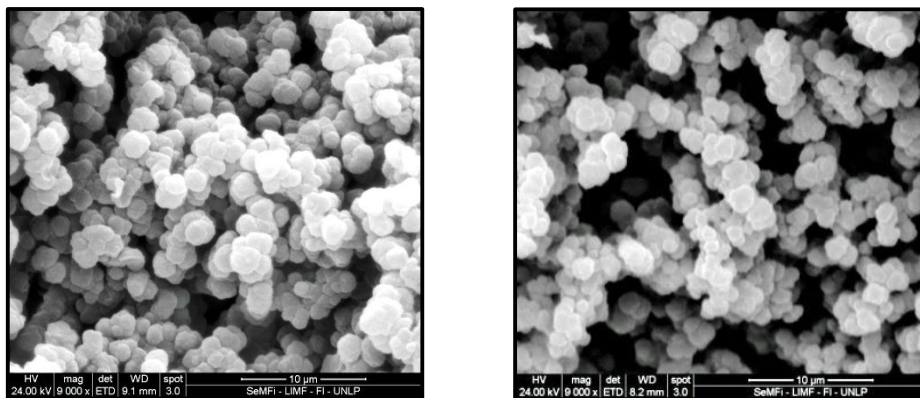


Figura I.3: Micrografías SEM de dos rellenos típicos de polímeros metacrílicos en las que se puede observar la diferente aglomeración de racimos o “clusters” de monómeros y la diferente porosidad del lecho.

Como se dijo anteriormente, la mezcla de polimerización es una combinación de monómeros entre los que se encuentra un agente entrecruzante o cross-linker, una mezcla porogénica de disolventes y un iniciador radicalario [32,33]. La mezcla se polimeriza en la mayoría de los casos por calentamiento en un baño de agua u horno, por la acción de iniciadores químicos, térmicos o mediante radiación (UV, rayos γ , etc.). Para evitar que la fase móvil desplace al lecho monolítico a lo largo de la columna, es necesario un

adecuado anclaje del polímero a la pared interna del capilar, recurriéndose a menudo a la silanización de la misma, empleando metacrilato de 3-(trimetoxisilil)propilo (γ -MAPS).

Columnas basadas en poliacrilamida

Hjertén *y col.*, introdujeron las columnas monolíticas basadas en acrilamida para HPLC [27] que posteriormente las utilizaron también en CEC [32]. Estos autores describieron la preparación de fases estacionarias monolíticas de acrilamida en disolventes acuosos. Unos años más tarde, Novotny *y col.* desarrollaron un método basado en el empleo de disolventes orgánicos para mejorar la solubilidad de los monómeros no polares y obtener así mezclas de polimerización más homogéneas [33].

Estas fases estacionarias monolíticas pueden sintetizarse directamente en el interior de los capilares por polimerización en cadena de monómeros de acrilamida, empleando un sistema catalizador/iniciador como el del peroxidisulfato de amonio con N,N,N',N'-tetrametil- etilendiamina (TEMED). La mezcla de polimerización a menudo incluye monómeros como acrilamida, N,N'-bisacriloxilpiperazina y metacrilamida, y agentes entrecruzantes como N,N'-metilbisacrilamida. Para su empleo en CEC pueden obtenerse monolitos con cargas si se añade ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (AMPS) o ácido vinilsulfónico, mientras que para asegurar la existencia de interacciones analito/fase estacionaria necesarias en cromatografía se adicionan frecuentemente metacrilato de estearilo o metacrilato de butilo (BMA). La polimerización de este tipo de columnas tiene lugar normalmente en una sola etapa y a temperatura ambiente.

Columnas basadas en poliestireno

Los polímeros de estireno-divinilbenceno poseen alta estabilidad incluso en condiciones extremas de pH (1–14), posibilitando así numerosas aplicaciones, entre las que se encuentran tanto la preparación de catalizadores con base polimérica como de agentes extractantes inmovilizados en el polímero, la síntesis de resinas de intercambio iónico y la elaboración de fases estacionarias para cromatografía de exclusión molecular.

Dada la alta porosidad de estos polímeros, comenzaron a utilizarse a principios de los años '90 como medio monolítico de separación en HPLC de fase inversa [34] y desde

entonces se han estudiado ampliamente como fases estacionarias en HPLC y CEC [35,36,37].

La preparación de estas columnas monolíticas es muy sencilla. La polimerización se inicia por radicales libres de estireno (monómero funcional) y divinilbenceno (agente entrecruzante), en presencia de un diluyente que es el disolvente porogénico. Dada su gran hidrofobicidad, en ocasiones pueden utilizarse directamente como fase estacionaria en HPLC en modo inverso, aunque su superficie puede derivatizarse fácilmente para aumentar las interacciones cromatográficas y permitir el análisis de moléculas pequeñas.

Columnas basadas en ésteres de metacrilato y acrilato

Las columnas monolíticas obtenidas a partir de metacrilato también fueron introducidas en HPLC en los años '90 [12,38,39]. Las propiedades cromatográficas de estos compuestos ya habían sido evaluadas por Lukas *y col.* en 1978 [40]. Estas fases estacionarias se han desarrollado ampliamente tanto en HPLC como en CEC, y se encuentran entre las de uso más extendido y mejor caracterizadas.

Los polímeros de metacrilato y acrilato poseen características mecánicas y químicas que los hacen altamente apropiados para su uso como fases estacionarias. Son estables en un amplio rango de pH (2–12), su síntesis es rápida y sencilla, y se pueden utilizar monómeros de polaridades muy diversas. Además, si se utiliza metacrilato de glicidilo (GMA) como monómero de base, el monolito obtenido puede derivatizarse fácilmente debido a la reactividad de su grupo epoxi [41,42]. Dado que en los monolitos poliméricos orgánicos predominan los macroporos por sobre los mesoporos, pueden utilizarse para la separación de biomoléculas de gran tamaño, como proteínas y polinucleótidos [43,44], porque las moléculas de pequeño tamaño presentan una transferencia de masa lenta dentro de los micro/mesoporos con fase móvil estanca.

I.2.2.1. Obtención de columnas monolíticas basadas en metacrilato

Las propiedades de los monolitos de metacrilato pueden optimizarse ajustando la composición de la mezcla de polimerización (monómeros, agente entrecruzante, disolvente/s porogénico/s y/o iniciador), así como el tipo de iniciación empleada (térmica,

química o mediante radiación UV o rayos γ). La modificación de cada uno de estos factores cambia el proceso de polimerización y produce un efecto diferente sobre las características del monolito final [45,46]. Se exponen a continuación los principales aspectos relacionados con cada uno de ellos.

Monómeros

El monómero funcional determina la hidrofobicidad y las características químicas de la superficie del lecho. Existe una gran variedad de monómeros de metacrilato cuya estructura general se muestra en la Figura I.4 que han sido utilizados para la preparación de columnas monolíticas:

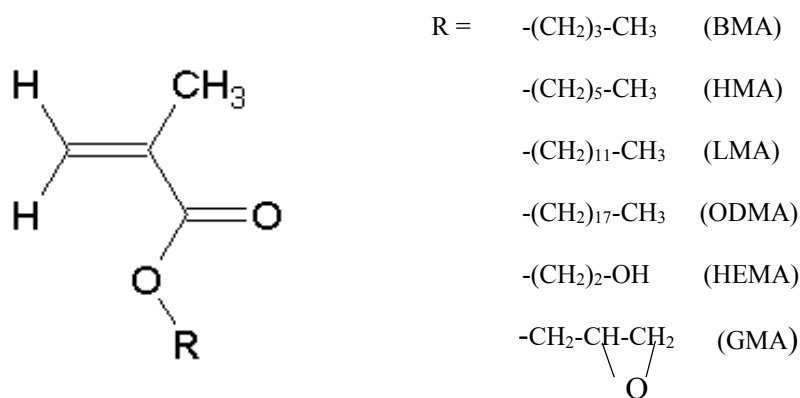


Figura I.4: Estructura química de un éster de metacrilato, conteniendo un sustituyente R de diferente naturaleza química.

Estos ésteres permiten modificar la polaridad del monolito en función del radical R. Así, pueden destacarse el butil-metacrilato (BMA), hexil-metacrilato (HMA) y lauril-metacrilato (LMA), cuyas polaridades decrecen con el largo de la cadena permitiendo así modificar la hidrofobicidad de la fase estacionaria. También el glicidil-metacrilato (GMA) [47,46] que permite derivatizar a través de su grupo epóxido y el 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA) [48,49] conteniendo grupos OH⁻ que le confieren un carácter mucho más polar al lecho monolítico.

Agente entrecruzante (Cross-linker)

Como agentes entrecruzantes para las columnas monolíticas de metacrilato se utilizan dimetacrilatos de alcoholes saturados, en particular los derivados de los etilenglicoles (Figura I.5):

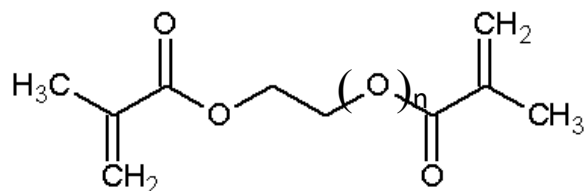


Figura I.5: Estructura química general de dimetacrilatos derivados de etilenglicoles.

En las columnas monolíticas de metacrilato, el dimetacrilato de etilenglicol (EDMA, $n=0$) es el agente entrelazante más utilizado [50], mientras que con menos frecuencia se emplean el dimetacrilato de dietilenglicol ($n=1$) y de trietilenglicol ($n=2$) [46,51] así como el de 1,4-butanodiol [52] y el de glicerol [53].

El contenido de agente entrelazante en la mezcla de monómeros afecta tanto a la composición química del lecho monolítico como a sus propiedades porosas, de modo que en general un incremento del contenido de cross-linker produce una disminución del tamaño medio de poro debido a la temprana formación de microglóbulos con un alto grado de entrecruzamiento. Además, el porcentaje de agente entrelazante puede afectar la rigidez y homogeneidad del monolito. La polimerización de mezclas con un alto contenido de cross-linker puede resultar útil para obtener lechos monolíticos de elevada área superficial, de hasta más de $100 \text{ m}^2/\text{g}$; sin embargo, estos monolitos presentan una permeabilidad a los líquidos bastante limitada, por lo que su uso en HPLC y CEC se encuentra muy restringido.

Sistema porogénico

La elección del disolvente porogénico y su proporción en la mezcla de polimerización constituyen uno de los principales factores a considerar en la optimización de las propiedades porosas de los monolitos de metacrilato. Mientras que la variación del

monómero, del agente entrelazante y del tipo de iniciador, pueden modificar la composición y rigidez del monolito, las modificaciones relacionadas con los porógenos sólo afectan a la estructura final del polímero [30,54].

Para optimizar el proceso de fabricación de las columnas, el sistema porogénico ideal debe permitir:

- i) la preparación de un medio homogéneo de polimerización en una sola fase, a partir del monómero funcional y el agente entrelazante;
- ii) la incorporación uniforme y directa de estos monómeros con diferente polaridad, generando un monolito polimérico macroporoso;
- iii) un control fino de las propiedades porosas de los lechos monolíticos resultantes.

Además, luego de la polimerización estos solventes deben ser fácilmente eliminados mediante el lavado de la columna.

El mecanismo de formación de poros mediante la utilización de agentes porogénicos puede explicarse teniendo en cuenta la solubilidad del polímero en los distintos porógenos. La polimerización tiene lugar en un medio de reacción inicialmente homogéneo hasta que se separan las cadenas de polímero por el aumento del tamaño y el entrecruzamiento. Los cambios en la naturaleza o en la composición del disolvente porogénico influyen sobre la solvatación de las cadenas de polímero en las primeras etapas de la reacción obteniéndose poros de *mayor tamaño* si se utilizan disolventes con *pobres propiedades solvatantes* hacia el polímero. Por el contrario, si el porógeno es un *buen disolvente* del polímero, la separación de fases se hace más lenta formándose poros de *menor tamaño* [55,56].

La disminución de la relación monómeros/porógenos proporciona un método directo de incrementar el tamaño de poro y reducir la resistencia al flujo en las columnas monolíticas. Sin embargo, esto conlleva a la disminución en el área superficial y en la rigidez del polímero formado obteniéndose monolitos quebradizos. Por el contrario, un aumento de aquella relación proporciona monolitos con mayor porosidad y área superficial, pero de alta resistencia al caudal de fase móvil, por lo que la relación óptima se debe establecer en cada caso.

Sistema de iniciación

La polimerización de lechos monolíticos de metacrilato está dada por una reacción radicalaria iniciada generalmente por temperatura, un proceso de irradiación o la presencia de agentes químicos.

En la iniciación térmica, para obtener monolitos con estructuras porosas uniformes y reproducibles, la temperatura del proceso de polimerización debe controlarse cuidadosamente debido a su fuerte influencia sobre la velocidad de crecimiento de los núcleos. A temperaturas elevadas, a las que tanto la descomposición del iniciador como la velocidad de propagación son muy rápidas, aumenta el número de núcleos con la consiguiente reducción del tamaño final de poro. Polimerizaciones rápidas dan lugar a estructuras porosas menos uniformes, por lo que desde esta perspectiva sería preferible utilizar temperaturas de polimerización más bajas. Sin embargo, las bajas temperaturas pueden inhibir el efecto del iniciador o afectar la cinética del proceso en su conjunto, haciéndolo cada vez más lento [57]. Por último, la naturaleza del iniciador puede afectar también las propiedades porosas de la estructura resultante. Para la iniciación térmica se suele utilizar α,α' -azobis isobutironitrilo (AIBN) [58,59] o bien un peróxido orgánico como el lauril peróxido (LPO) (Figura I.6) [13, 60, 61].

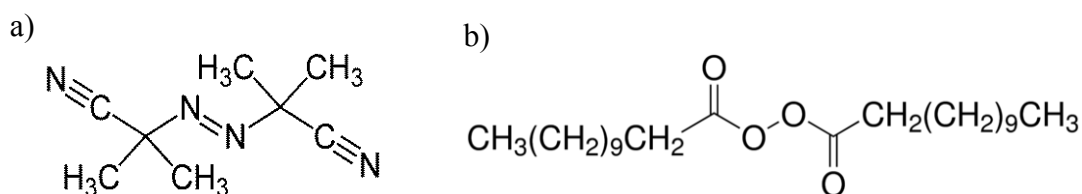


Figura I.6: Estructura química de iniciadores térmicos a) AIBN, b) LPO.

La polimerización iniciada por radiación UV se efectúa normalmente a temperatura ambiente. Algunos iniciadores radicalarios utilizados son el AIBN y la 2,2-dimetoxi-2-fenil-acetofenona.

En la polimerización con agentes químicos puede utilizarse como iniciador el peroxidisulfato amónico, adicionándose TEMED como activador. Algunos grupos de investigación [21,41,62] han empleado este modo de iniciación para preparar columnas basadas en acrilamida para cromatografía de líquidos capilar (CLC) y CEC [63].

Por último, también es posible preparar lechos monolíticos utilizando radiación gamma (γ) [65]. Este método es menos común que los anteriores, pero presenta algunas ventajas, en particular la generación directa de radicales de los monómeros sin necesidad de adicionar iniciadores. Por esta vía, los radicales libres se generan de manera homogénea en todo el sistema, y las variaciones en la cantidad y velocidad de irradiación permiten controlar la estructura porosa final del polímero.

Mecanismo de polimerización

El mecanismo de formación del monolito macroporoso se basa en una reacción radicalaria, donde el monolito se prepara *in situ*, mediante una polimerización en cadena. El iniciador radicalario, que es capaz de generar radicales libres a partir de enlaces débiles, se descompone y se inicia la polimerización (Figura I.7). A continuación, los radicales se transfieren desde el iniciador a los monómeros circundantes [65].

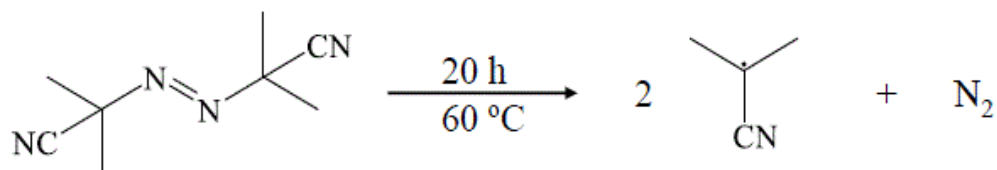


Figura I.7: Mecanismo de la polimerización. Etapa de iniciación: descomposición del iniciador AIBN.

La segunda etapa (Figura I.8) consiste en la propagación, toma la mayor parte del tiempo de polimerización y genera un aumento de la longitud de cadena de los polímeros. Una cadena comienza cuando un radical libre utiliza un electrón π para formar un enlace estable con un átomo de carbono. Esto convierte a toda la nueva molécula en otro radical, que ataca a otro monómero en el entorno. Una vez que se ha iniciado una cadena, se propaga hasta que no hay más monómero disponible o hasta la desactivación del radical [66]. A su vez, se produce la reacción entre el monómero y el agente entrecruzante. Siguiendo con el ejemplo de los polímeros de metacrilato, y utilizando EDMA como cross-linker, se muestra en Figura I.9 el mecanismo de reacción.

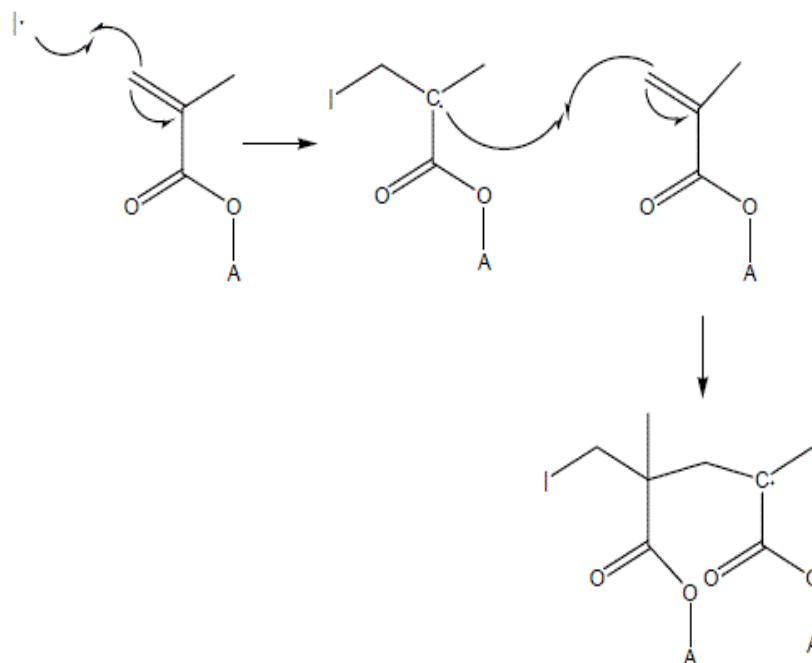


Figura I.8: Mecanismo de la polimerización. Segunda etapa: iniciación radicalaria del monómero y crecimiento de las cadenas poliméricas (A es un grupo terminal que depende del monómero empleado).

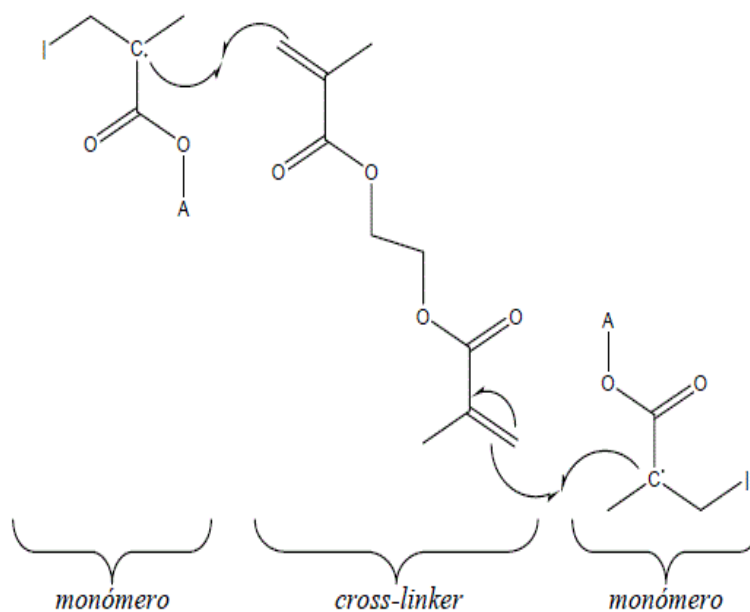


Figura I.9: Mecanismo de la polimerización. Tercera etapa: polimerización radicalaria entre monómero y entrecruzante.

A medida que crecen las cadenas del polímero, disminuye su solubilidad en el medio y los núcleos generados se van separando. Los monómeros son termodinámicamente mejores disolventes del polímero que los porógenos, por lo que los núcleos se solvatan preferentemente con los monómeros que quedan en la mezcla de polimerización. Como la concentración de monómeros en el interior de los núcleos es mayor que en la disolución, la polimerización continúa preferentemente en dichos núcleos por motivos cinéticos [67,68], produciéndose un aumento de su tamaño y pasando a formar microglóbulos. Éstos continúan aumentando de tamaño y se van interconectando, creando la morfología final del monolito. El proceso da lugar finalmente a un sistema de dos fases: un sólido monolítico continuo de color blanco y un líquido porogénico inerte que llena los poros de la estructura. El volumen ocupado por los porógenos corresponde por tanto al volumen de macroporos del lecho monolítico. En la Figura I.10 se muestra el proceso de crecimiento de los núcleos hasta la interconexión final (reticulación) para formar el esqueleto monolítico.

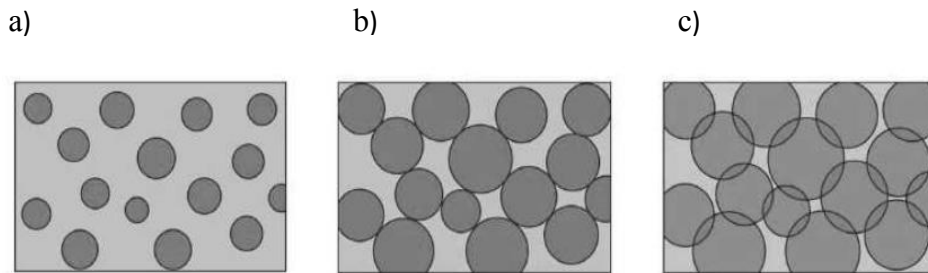


Figura I.10: Esquema del proceso de crecimiento de los núcleos, a) formación de núcleos, b) crecimiento y gelificación y c) interconexión de los núcleos.

La morfología resultante de los monolitos macroporosos constituye un sistema complejo, con una estructura constituida por una serie de microglóbulos interconectados, parcialmente agregados en agrupaciones de mayor tamaño, que forman el cuerpo del polímero. Los huecos irregulares entre las agrupaciones de microglóbulos son los macroporos [69]. La organización de los glóbulos y sus agregados depende tanto de la composición de la mezcla de polimerización como de las condiciones de reacción utilizadas en la preparación del monolito.

I.2.2.2. Caracterización de materiales monolíticos

Caracterización de las propiedades morfológicas

Existen numerosos métodos y herramientas analíticas que proporcionan información sobre la morfología de los materiales monolíticos. Estos métodos incluyen técnicas como la microscopía electrónica de barrido (SEM), la porosimetría de intrusión de mercurio (MIP), la adsorción/desorción de nitrógeno evaluada mediante la ecuación de Brunauer-Emmet-Teller (BET) y la determinación de la permeabilidad cromatográfica.

Microscopía electrónica de barrido

Esta técnica permite obtener imágenes de alta resolución de la estructura de los materiales estudiados utilizando las interacciones electrón-materia. En ella, un rayo focalizado de electrones a los que se aplica un voltaje entre 2 y 30 kV barre la superficie del material, produciendo principalmente la emisión de electrones secundarios y retrodispersados que se recogen mediante un adecuado sistema de detección, permitiendo obtener una imagen tridimensional de la superficie que puede ser examinada con gran amplificación.

Los voltajes más pequeños se utilizan para muestras biológicas sensibles que pueden dañarse y los voltajes más altos para muestras metálicas, pudiendo en este caso aprovecharse las menores longitudes de onda para ganar resolución. Luego del barrido de la superficie con los electrones acelerados, un detector formado por lentes basadas en electroimanes mide la cantidad e intensidad de los electrones que devuelve la muestra. La información proporcionada por la señal variará en función de las características del detector empleado [70].

Para realizar el análisis por SEM, la muestra debe estar seca, ya que la baja presión existente en el microscopio causaría la evaporación de los componentes volátiles, alterando la estructura de la misma. Además, la superficie debe ser conductora y térmicamente estable, requisitos que no satisfacen los polímeros monolíticos [70]. La conductividad necesaria para minimizar los efectos de carga que pueden producir distorsiones en la imagen de muestras no conductoras se consigue recubriendo la

superficie de la misma con una película de un material conductor como el oro, mediante las técnicas de sputtering (pulverización catódica en alto vacío) o de evaporación térmica.

Porosimetría de intrusión de mercurio

La MIP es una de las herramientas más importantes para caracterizar el tamaño de los poros, su distribución y el volumen total definido por ellos en los sistemas porosos. Estas propiedades morfológicas se obtienen determinando el volumen de mercurio introducido bajo presión en los poros del material a analizar.

Dado que el mercurio es un líquido que no moja la superficie del sólido, no puede penetrar en los poros espontáneamente a no ser que se le aplique una presión externa que fuerce su entrada en los mismos. Supuesto que el poro tenga una geometría cilíndrica, la presión aplicada se relaciona con el tamaño de poro mediante la ecuación de Washburn [71], según la cual el radio del poro es inversamente proporcional a la presión aplicada:

$$P = \frac{2\sigma \cos\theta}{r} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde P es la presión ejercida sobre el mercurio, σ la tensión superficial de éste (480 erg/cm²), θ el ángulo de contacto entre el mercurio y la superficie del poro (130°) y r el radio equivalente del poro que se llena con mercurio.

En esta técnica, la muestra se coloca en un recipiente con cierre hermético (penetrómetro) y se somete a vacío con el fin de desgasificarla. A continuación, el penetrómetro se llena con mercurio, aplicando presión de forma progresiva, con lo que se produce la intrusión gradual de éste en el medio poroso desgasificado. Finalmente, llegado al punto máximo de presión y volumen de mercurio intruido, una disminución gradual de la presión condiciona la extrusión de éste desde la estructura porosa.

El volumen de mercurio introducido en la muestra se registra junto con el valor de la presión aplicada. Estos pares de valores describen la curva “volumen de mercurio intruido vs. presión aplicada”, que puede convertirse, mediante un modelo adecuado de porosidad, en volumen de poro frente a radio de poro; y la distribución de tamaños de poros se calcula derivando la curva acumulada de intrusión respecto del radio. Con esta

técnica, se pueden caracterizar poros de tamaños comprendidos entre 3 nm y 360 μm . En la Figura I.11 se muestra, la distribución de poros obtenida para materiales monolíticos.

Cabe aclarar que las presiones empleadas en el desarrollo de un ensayo de porosimetría son tan elevadas que la estructura porosa puede ser dañada y/o modificada definitivamente según la fragilidad del material. Esto no significa que la utilización de la MIP no sea adecuada para el estudio del sistema poroso, por el contrario, es una técnica muy resolutive que utilizada en combinación con otras técnicas, proporciona una información muy útil, debiendo tenerse en cuenta las limitaciones señaladas en función de las características de cada sólido poroso.

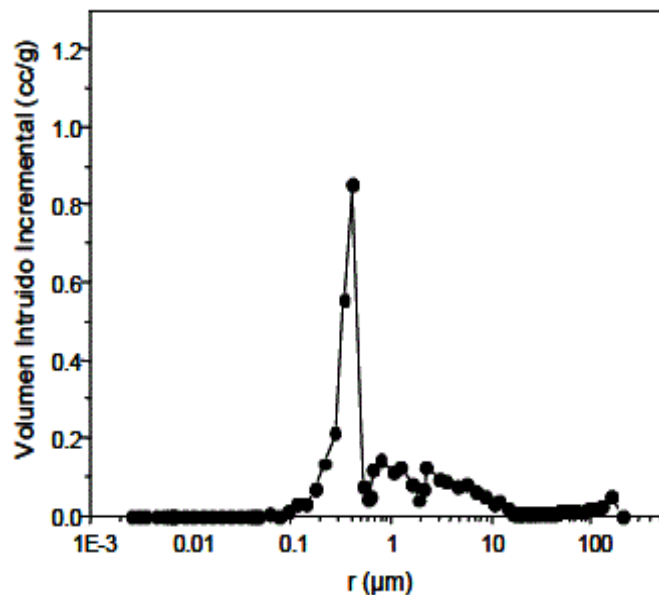


Figura I.11: Distribución del tamaño de poro obtenida mediante la técnica MIP de un material monolítico (polimerización térmica).

Dada la limitada resistencia de los polímeros monolíticos que se van a estudiar en la presente Tesis, la MIP se utilizará principalmente para obtener información sobre el diámetro medio de poro y el volumen total de poros (valores directamente relacionados con los macroporos), mientras que los datos de superficie específica, a la que contribuyen fundamentalmente los mesoporos y microporos presentes en la estructura de estos materiales, se obtendrán mediante la técnica de adsorción/desorción de nitrógeno (BET).

Adsorción/desorción de nitrógeno

La adsorción/desorción de nitrógeno es otra técnica muy utilizada para caracterizar materiales porosos, permitiendo determinar su superficie específica, el volumen total de poros y la distribución de diámetros de poros comprendidos entre 0.3 y 300 nm [73].

En esta técnica, la muestra se lleva a temperatura constante por medio de un baño externo y se realiza un desgasificado. A continuación, se introducen, en etapas sucesivas, pequeñas cantidades de nitrógeno líquido (adsorbato) en el interior de la cámara que contiene la muestra. Las moléculas de gas que alcanzan la superficie de la muestra se adsorben y tienden a formar una delgada capa que cubre por completo la superficie adsorbente, formándose una monocapa de moléculas adsorbidas. La adición continua de moléculas de gas una vez que se ha formado la monocapa lleva a la formación gradual de capas múltiples o multicapas (Figura I.12 A).

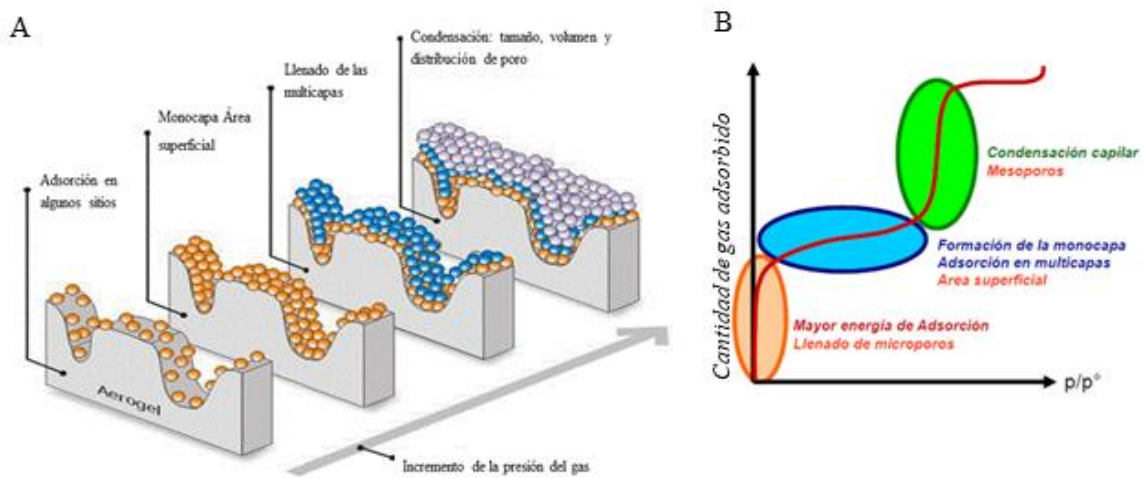


Figura I.12: Esquema representativo de A) la adsorción de las moléculas de N₂ sobre la superficie de los poros, B) isoterma de adsorción correspondiente.

La representación del volumen de gas adsorbido por unidad de masa frente a la presión relativa del gas (p/p_0 , con p = presión del gas en equilibrio y p_0 = presión de saturación) permite obtener la curva o isoterma de adsorción. Cuando p/p_0 se aproxima a 1 se revierte la adsorción obteniéndose la isoterma de desorción.

Las isothermas que resultan de la adsorción física, fueron propuesta por Brunauer, Deming, Deming y Teller (BDDT) (1940) y se pueden clasificar en cinco tipos (Figura I.13).

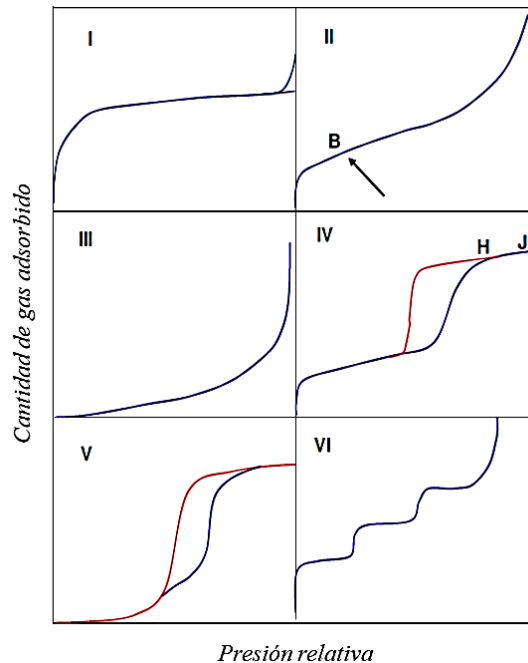


Figura I.13: Clasificación de las Isothermas Tipo I al V por BDDT y Tipo VI (isoterma escalonada).

La isoterma tipo I es típica de sólidos microporosos e isothermas de quimisorción, es reversibles (tipo Langmuir), con formación de una larga porción plana, cortando la línea $p/p_0 = 1$ bruscamente o generando una "cola". Las isothermas de tipo II son características de sólidos pocos porosos, con meso y macroporosidad. El denominado "punto B" por BDDT, en el cual comienza la porción lineal indica que el cubrimiento de la monocapa está completo y está por comenzar la adsorción en multicapas. Las de tipo III, son isothermas reversibles características de sólidos no porosos o macroporosos, no presentan el punto B, son convexas hacia el eje p/p_0 , e indican interacciones débiles entre adsorbato-adsorbente. Las isothermas tipo IV se asemejan a las isothermas de tipo II, presentando histéresis y punto B, pero con un punto de inflexión a baja presión. Estas isothermas se dan en sólidos mesoporosos. La isoterma tipo V, es similar al tipo III, pero con histéresis. Finalmente, la isoterma tipo VI, representa un proceso de adsorción por

capas (escalonada) sobre una superficie uniforme no porosa. La altura del escalón representa la capacidad de la monocapa para cada capa adsorbida.

La superficie específica, S_{BET} (m^2/g), se puede calcular con la ecuación de BET [72]:

$$S_{\text{BET}} = \frac{V_m \cdot N_A \cdot a_m}{22414} 10^{-22} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde V_m es el volumen que ocupa el adsorbato por gramo de adsorbente (cm^3STP Adsorbato/ g adsorbente), N_A es el número de Avogadro y a_m (nm^2) es el área superficial ocupada por una molécula de nitrógeno (0.162 nm^2). El volumen de la monocapa, V_m (cm^3/g), se calcula a partir de la expresión:

$$\frac{p}{V \cdot (p_0 - p)} = \frac{1}{V_m \cdot c} + \frac{c-1}{V_m \cdot c} \cdot \frac{p}{p_0} \quad (\text{Ec. 3})$$

donde V es el volumen de nitrógeno adsorbido, p y p_0 tienen el significado anteriormente mencionado y c es la constante BET relacionada con la entalpía de adsorción. La representación de $p/[V(p_0-p)]$ frente a p/p_0 (isoterma) permite determinar los parámetros c y V_m .

La regla de Gurvich indica la cantidad de vapor adsorbido en el punto de saturación ($p/p_0=0.995$) expresada como líquido, determinando una medida del volumen total de poros del material [73].

Evaluación de la permeabilidad cromatográfica

Las propiedades de flujo de una columna monolítica pueden evaluarse determinando la permeabilidad cromatográfica del lecho. Este parámetro representa la capacidad de un medio poroso para permitir el pasaje a través de un fluido impulsado mediante una caída de presión determinada, y puede calcularse mediante de la ley de Darcy:

$$Bo = \frac{\eta \cdot L \cdot u}{\Delta P} \quad (\text{Ec. 4})$$

donde B_o es la permeabilidad específica (m^2) del medio poroso, η la viscosidad de la fase móvil (poise), L la longitud del lecho monolítico (m), u la velocidad lineal de flujo (m/s) y ΔP la caída de presión aplicada (bar).

La permeabilidad cromatográfica está determinada principalmente por los canales de flujo o macroporos presentes en el material monolítico [74], de manera que a medida que aumenta el tamaño de poro lo hace también la permeabilidad cromatográfica del monolito, disminuyendo por tanto la resistencia al flujo. Desde el punto de vista experimental, es conveniente trabajar con columnas de permeabilidad elevada para obtener separaciones rápidas, disminuyendo el tiempo de análisis, aunque en general, a mayor cantidad de macroporos menor es el área superficial y, por lo tanto, menor la eficiencia separativa de la columna.

Caracterización de las propiedades cromatográficas

El comportamiento de las columnas monolíticas puede evaluarse a partir de parámetros cromatográficos típicos: eficiencia (N), altura equivalente de plato teórico (H), resolución (R_s) y selectividad (α), que pueden calcularse a partir de las expresiones básicas dadas en las ecuaciones 5 a 8.

$$N = 5,54 \left(\frac{t_r}{w_{0.5}} \right)^2 \quad (\text{Ec. 5})$$

donde t_r es el tiempo de retención del analito y $w_{0.5}$ es la anchura del pico a media altura.

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{Ec. 6})$$

siendo L , la longitud del lecho monolítico.

$$R_s = 1,18 \frac{(tr_2 - tr_1)}{(w_{0.5\ 1} + w_{0.5\ 2})} \quad (\text{Ec. 7})$$

donde tr_1 y tr_2 son los tiempos de retención para el analito menos y más retenido, respectivamente, y $w_{0.5\ 1}$ y $w_{0.5\ 2}$ los correspondientes valores de los anchos de cada pico a mitad de altura. Valores de $R_s = 1,5$ indican separación completa o “a la línea de base”, aunque valores de 1,25 ya permiten una cuantificación apropiada de los analitos.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (\text{Ec. 8})$$

donde k_1 y k_2 son los factores de retención del analito menos y más retenido, respectivamente.

I.3. Reconocimiento quiral

I.3.1. Principios del reconocimiento quiral

Dos enantiómeros tienen exactamente las mismas propiedades físicas y químicas en un medio anisotrópico. Por lo tanto, para separarlos se necesitan interacciones estereoespecíficas con una molécula ópticamente activa, denominada “*selector quiral*”. Esta molécula puede asociarse transitoriamente de manera preferencial a uno de los enantiómeros. Con el fin de racionalizar las diferencias observadas entre los enantiómeros en cuanto a su actividad biológica/farmacológica, en 1933 Easson y Stedman propusieron un “*modelo de acoplamiento de tres puntos*” como base de las interacciones enantioselectivas droga-receptor. El modelo, deducido a partir de la diferente acción de los enantiómeros de la epinefrina, se basa en que, si tres grupos funcionales de la molécula de un dado enantiómero interactúan con tres sitios complementarios en el receptor quiral, el otro enantiómero no podrá interactuar exactamente del mismo modo con el receptor, resultando entonces en interacciones y, consecuentemente, en efectos biológicos diferentes para ambos enantiómeros. Si bien este modelo, esquematizado en la Figura I.14 es demasiado simple, dado que no considera la posibilidad de que la interacción entre el fármaco y el receptor pueda producir cambios en la configuración de ambos, fue ampliado

luego para explicar la enantioselectividad biológica de drogas quirales en general [62], y también se extendió su aplicación para justificar la retención enantioselectiva en cromatografía [75].

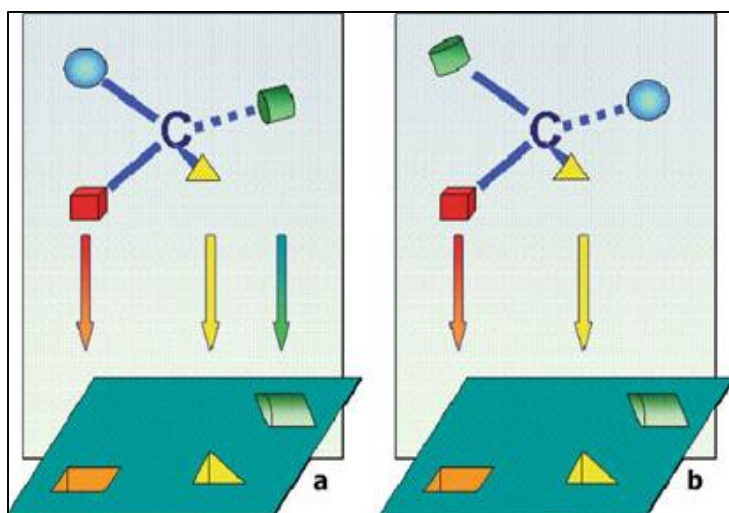


Figura I.14: Modelo de interacción de tres puntos. El enantiómero (a) presenta tres grupos exactamente complementarios con tres sitios del selector quiral, mientras que el enantiómero (b) puede interactuar a lo sumo con dos sitios del selector quiral [76].

I.3.2. Selectores quirales en técnicas de separación

En la actualidad se dispone de numerosas alternativas aplicables a la separación y análisis enantiomérico. Las clásicas técnicas polarimétricas, de degradación enzimática y de cristalización fraccionada presentan varias desventajas que fueron superadas por las técnicas que incluyen cromatografía de líquidos (LC), cromatografía de gases (GC), métodos de separación con membrana, biosensores y electroforesis capilar (CE) [7]. Un esquema de las diversas metodologías utilizadas para la separación enantiomérica se muestra en la Figura I.15.

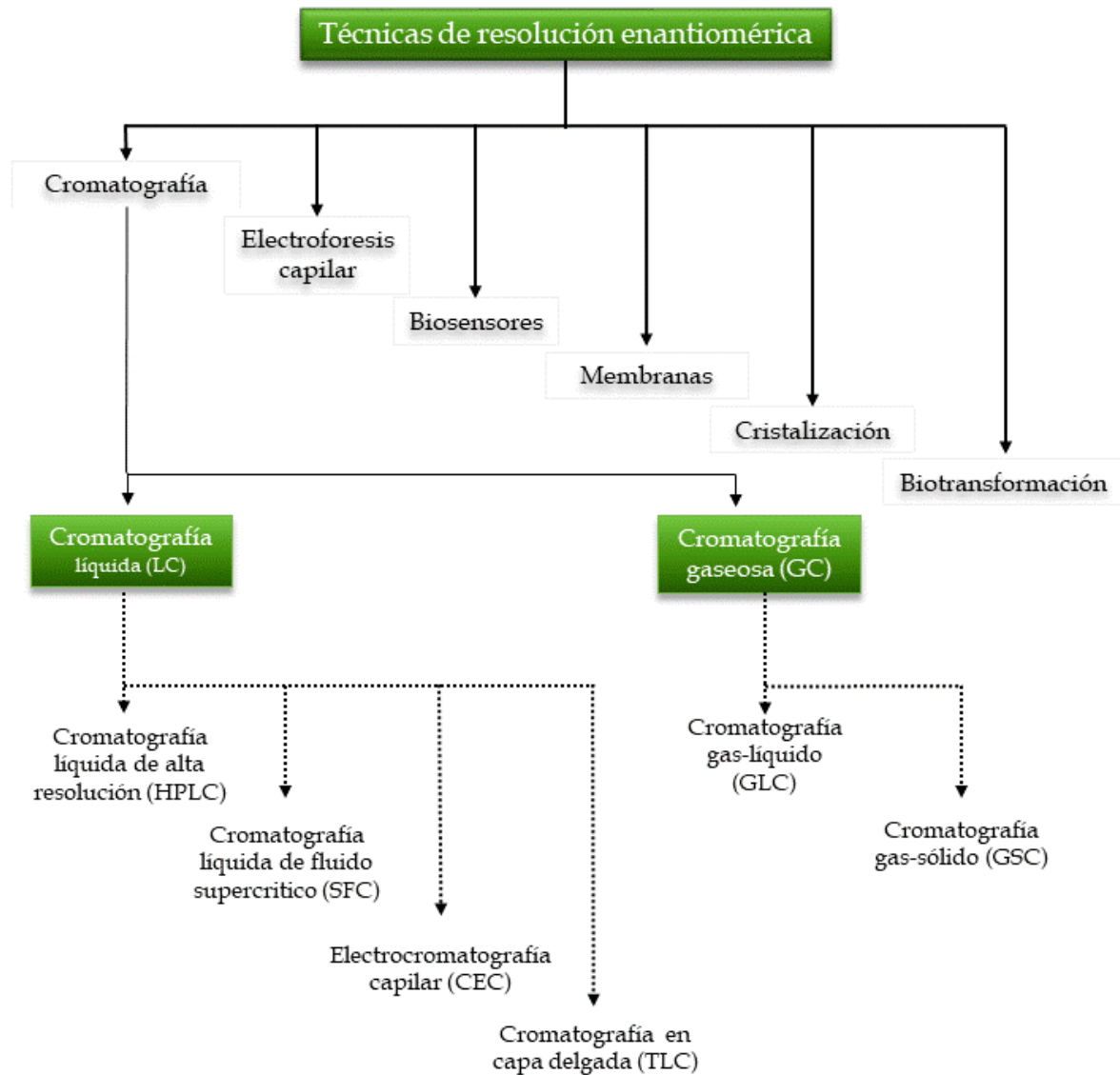


Figura I.15: Técnicas modernas de resolución quiral.

Entre las técnicas de LC mencionadas, la de HPLC es la más utilizada por ser la que presenta mayores ventajas, como sensibilidad, versatilidad, reproducibilidad de los resultados y tiempos de análisis adecuados. Aproximadamente el 90% de las separaciones quirales de compuestos farmacéuticos se realizan mediante HPLC. Debido al amplio rango de aplicación de la técnica en separaciones quirales, se encuentran columnas comerciales para HPLC conteniendo varios selectores quirales. En la Tabla I.1, se encuentra la primera clasificación de las fases estacionarias quirales (FEQs), que incluyen

las Tipo I al V realizada por Wainer en 1987 [77]; las Tipo VI [7] y Tipo VII introducidas por Armstrong en 1994 [82].

Tabla I.1: Clasificación de fases estacionarias quirales para HPLC.

<i>Tipo</i>	<i>Denominación</i>	<i>Interacciones</i>	<i>Ejemplos</i>
I	<i>“Pirkle”</i>	Atractivas, puente de hidrogeno, π - π , dipolares	Aminoácidos y derivados.
II	<i>Poliméricas</i>	Atractivas y formación de complejos de inclusión	Derivados de celulosa y amilosa; poliacrilatos, poliacrilamida.
III	<i>de Inclusión</i>	Formación de complejos de inclusión dentro de cavidades	Derivados de ciclodextrinas y éteres de corona.
IV	<i>Complejación</i>	Intercambio de ligandos mediante complejos metálicos	Cu(II)-S-prolina; con derivados de alcaloides (Cu(II)-Quinidina)
V	<i>Proteínas</i>	Hidrofóbicas y polares	Albúmina, Pepsina, Orosomucide.
VI	<i>Polímeros impresos</i>	Interacciones no covalentes	Derivados de acrilatos ó metacrilatos, con aminoácidos.
VII	<i>Antibióticos macrocíclicos</i>	Puente de hidrogeno, π - π , dipolares, electrostáticas, estéricas y de inclusión	Vancomicina, Teicoplanina.

La variedad de fases móviles utilizadas incluye las correspondientes al modo normal, el modo inverso, el polar iónico y el polar orgánico.

Los enantiómeros necesitan un medio quiral para manifestar sus propiedades diferenciales, y esta interacción enantiómeros/selector quiral puede ser:

- (1) **indirecta:** por la derivatización pre-columna de la mezcla racémica con un agente quiral o bien por la incorporación de un selector quiral a la fase móvil cromatográfica (ver trabajo publicado relacionado a este punto, en *Publicaciones Científicas* de la presente Tesis), para obtener un par diastereoisomérico que puede separarse por medios clásicos no quirales;
- (2) **directa:** a partir de la interacción de la mezcla racémica con un selector quiral que forma parte de la fase estacionaria cromatográfica.

En 1971, Davankov logró la primera separación hasta la línea de base de enantiómeros de aminoácidos y otros compuestos capaces de formar compuestos de coordinación con iones metálicos mediante cromatografía de intercambio de ligandos quiral utilizando L-prolina como selector quiral [79]. Desde entonces varios grupos de investigación han desarrollado FEQs utilizando una amplia variedad de compuestos quirales, que incluyen aminoácidos, ciclodextrinas, glucopéptidos macrocíclicos, alcaloides, éteres corona, compuestos aromáticos π -básicos o π -ácidos, etc. [80,81]. De la gran cantidad de FEQs desarrolladas, las derivadas de polisacáridos han demostrado un muy amplio rango de aplicación y alta capacidad de discriminación quiral.

Una de las claves del éxito en la separación de enantiómeros radica, en primer lugar, en la adecuada elección de la fase estacionaria. Por lo tanto, el conocimiento de las propiedades de las FEQs existentes es de suma importancia. Muchas de las moléculas quirales naturales y sintéticas se estudiaron para evaluar su capacidad para actuar como selectores quirales en técnicas cromatográficas. Actualmente más de un centenar de FEQs se ofrecen comercialmente, y entre ellas unas 20 ó 30 son las que se usan con frecuencia para resolver la mayoría de los problemas que involucran enantioseparaciones diversas.

Selectores quirales derivados de polisacáridos

Los polímeros naturales, como celulosa o componentes de almidón fueron los primeros en utilizarse como selectores quirales cromatográficos debido a su naturaleza quiral inherente y a su gran abundancia. La capacidad de resolución de los polisacáridos, en particular de la celulosa, se observó por primera vez en cromatografía en papel cuando

se logró separar un aminoácido racémico. Esto condujo a un mayor uso de la celulosa y otros polisacáridos, como la amilosa como materiales de partida en la preparación de selectores para ser utilizados en fases estacionarias quirales [76,82].

Estos selectores quirales cuentan con una larga tradición en la enantioseparación de una amplia variedad de compuestos por HPLC. Entre ellos los *tris*(3,5-dimetilfenil) carbamatos de celulosa y amilosa, actualmente se comercializan como columnas quirales, Chiralcel® OD y Chiralpak® AD (soporte silíceo recubierto con el selector quiral) o Chiralpak® IB y IA (selector quiral unido covalentemente al soporte sólido de sílice), respectivamente.

La Figura I.16 muestra la distribución de FEQs utilizadas en HPLC para la determinación de enantiómeros, publicada en el *Journal of American Chemical Society* en 2005 y 2007 [80,81]. Estas estadísticas muestran que más del 90% de las determinaciones de enantiómeros por HPLC quiral emplean FEQs basadas en polisacáridos.

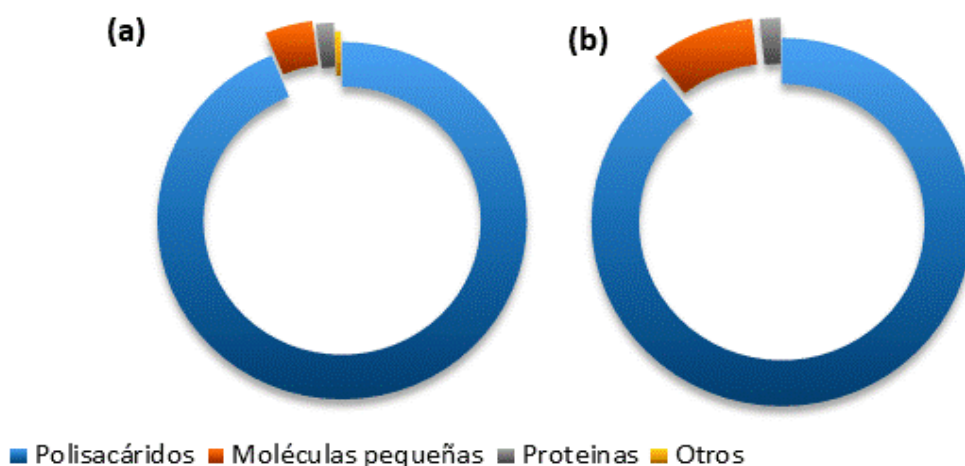


Figura I.16: Distribución porcentual de fases estacionarias quirales usadas en HPLC para la determinación de compuestos enantioméricos (a) en 2005 y (b) en 2007.

El mecanismo de reconocimiento quiral a nivel molecular en estas FEQs aún no ha sido completamente dilucidado. Esto se debe a que existe una amplia variedad de sitios de interacción con diferentes afinidades para los enantiómeros en las cadenas quirales del polímero.

Si bien los polisacáridos nativos son ópticamente activos [75,84], su capacidad de enantio-reconocimiento puede incrementarse por derivatización al convertirlos en carbamatos o ésteres mediante reacciones con isocianatos y cloruros de ácido, respectivamente [83]. Por ejemplo, la celulosa y la amilosa (Figura I.17 1 y 2) se convierten fácilmente en diversos derivados de fenilcarbamato (Figura I.17 3 y 4) al reaccionar con los correspondientes fenilisocianatos [85,86]. Las capacidades de reconocimiento de estos derivados pueden cambiar significativamente, dependiendo de los sustituyentes en los grupos fenilo.

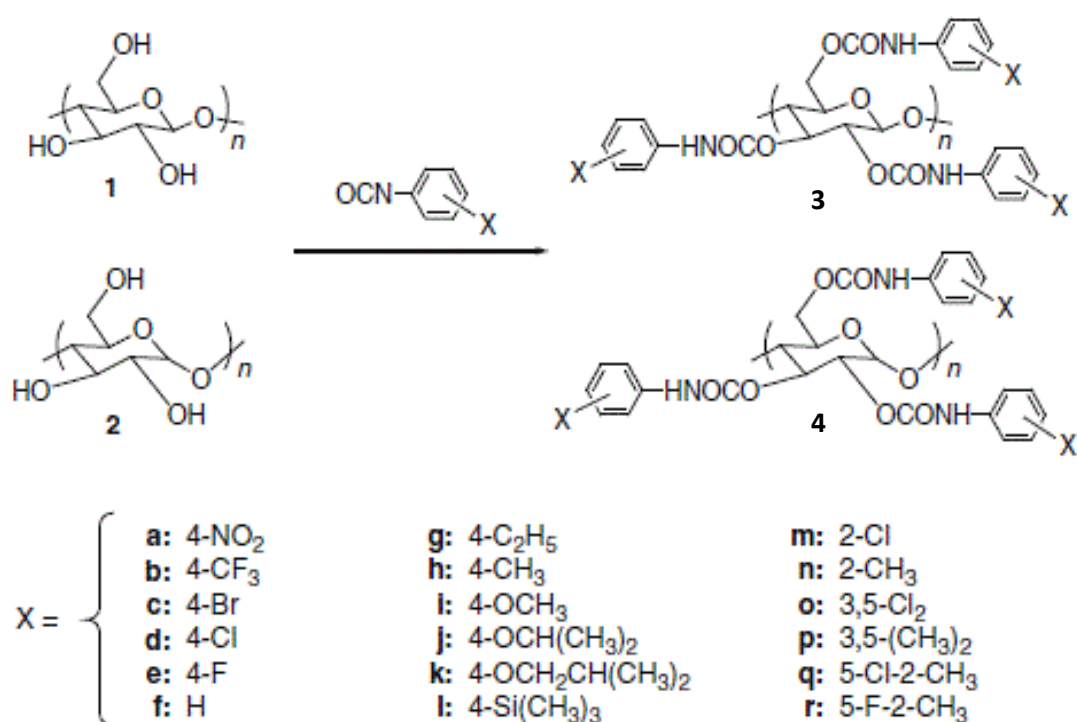


Figura I. 17: Estructura química de derivados de fenilcarbamato de celulosa (3) y amilosa (4).

En comparación con el derivado de celulosa no sustituido 3f, los fenilcarbamatos con sustituyentes que atraen electrones (halógenos y grupo $-\text{CF}_3$) o con sustituyentes dadores de electrones (grupos alquilo y alcoxi) presentan mayor capacidad de reconocimiento quiral. Estos sustituyentes parecen afectar la polaridad del grupo

carbamato a través de un efecto inductivo y modifican así la interacción entre los derivados de celulosa y los racematos.

El reconocimiento quiral en los fenilcarbamatos de celulosa está también influenciado por la posición de los sustituyentes en el grupo fenilo. Cuando un halógeno o grupo metilo se introduce en una posición orto (3m-3n), la capacidad de reconocimiento disminuye significativamente en comparación con el derivado de celulosa no sustituido (3f) [87]. La mayoría de los fenilcarbamatos de celulosa con alta capacidad de reconocimiento forman una fase cristalina líquida liotrópica en una solución altamente concentrada [84]. Esto indica que los fenilcarbamatos están probablemente dispuestos de una manera regular. Tal estructura ordenada parece ser importante para el reconocimiento quiral eficiente en las FEQs basadas en estos polímeros. Sin embargo, los derivados orto-sustituidos (3m-3n) no muestran tal cristalinidad líquida. Esto significaría que los derivados orto-sustituidos pueden no poseer una estructura regular de orden superior.

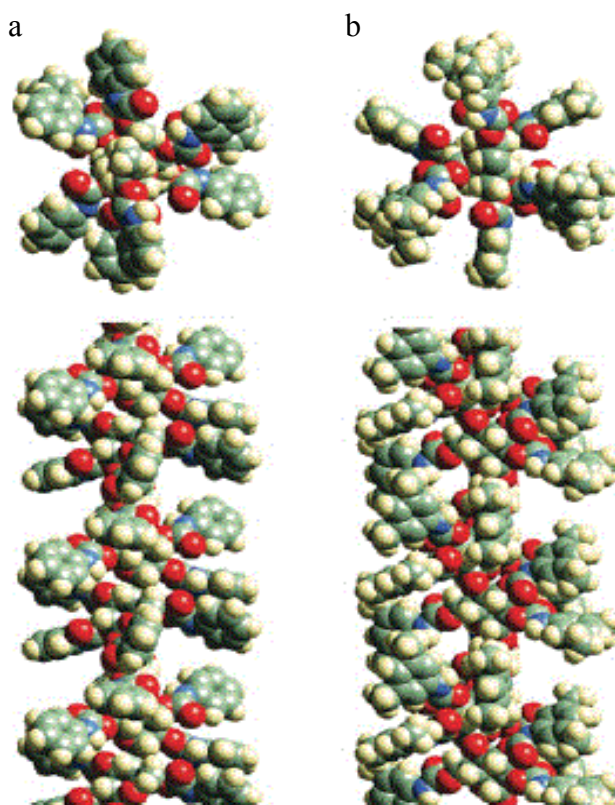


Figura I.18: Estructuras químicas optimizadas de (a) fenilcarbamato (**3f**) y (b) 3,5-dimetilfenilcarbamato (**3p**) de celulosa [87]. En la parte superior se muestran las vistas frontales de la hélice y en la parte inferior las vistas laterales.

El análisis estructural de los derivados de polisacáridos es fundamental para entender el mecanismo de reconocimiento quiral. La Figura I.18 muestra las estructuras estables de 3f y 3p, que fueron optimizadas por cálculos de mecánica molecular para la estructura cristalina propuesta a partir de estudios de rayos X de 3f [87].

Estos derivados tienen similares conformaciones helicoidales, y los residuos de glucosa se disponen regularmente a lo largo del eje helicoidal. Existe una ranura helicoidal quiral con grupos carbamato polares paralela a la cadena principal. Los grupos carbamato polares están situados preferentemente en el interior y los grupos aromáticos hidrófobos se colocan fuera de la cadena polimérica de manera que los racematos polares pueden interactuar predominantemente con los residuos de carbamato mediante interacciones de enlace de hidrógeno y dipolo-dipolo. Estas interacciones parecen ser significativas para el reconocimiento quiral, especialmente en HPLC en modo normal usando eluyentes no polares. Además de estas interacciones polares, las interacciones π - π entre los grupos fenilo de los fenilcarbamatos y un grupo aromático del racemato también pueden desempeñar un papel importante en sus reconocimientos, dado que se observó que varios compuestos aromáticos sin grupos polares pueden resolverse también, particularmente en HPLC en fase inversa [76].

I.4. Referencias

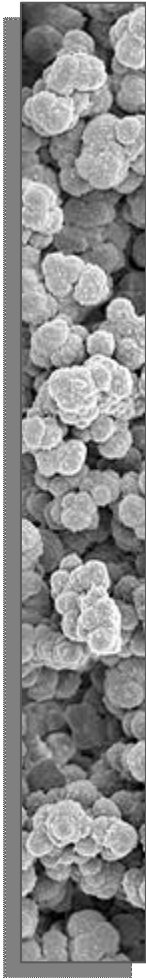
1. Aboul-Enein H.Y., Wainer I.W. *The Impact of Stereochemistry on Drug Development and Use*. New York: John Wiley & Sons; (1997).
2. Ali I., Aboul-Enein H.Y. *Introduction. Chiral Pollutants: Distribution, Toxicity and Analysis by Chromatography and Capillary Electrophoresis*: John Wiley & Sons, Ltd; (2004), 1-35.
3. Shannon, E.J., Morales, M.J., Sandoval, F., *Immunopharmacology* (1997); 35; 203- 212.
4. *Research B. Global Markets for Chiral Technology* (2012) ed: BCC.
5. Lämmerhofer, M., *J. Chromatogr. A* (2010);1217; 814- 856.
6. Francotte, E.R., *J. Chromatogr. A* (2001) ;906; 379-397.
7. Subramanian, G., *Chiral Separation Techniques*. (2da.Ed.). Weinheim: Wiley-VCH; (2007).
8. Guiochon G. *J. Chromatogr. A* (2007);1168(1-2):101-168.
9. Saunders, K.C., Ghanem, A., Boon Hon, W., Hilder, E.F., Haddad, P.R. *Anal. Chim. Acta* (2009),652, 22-31.
10. Liao J-L, Zhang R, Hjertén S. *J. Chromatogr. A* (1991);586;21-26.
11. Chirica, G.S., Remcho, V.T., *J. Chromatogr. A* (2001), 924, 223-232.
12. Shediac, R., Ngola, S.N., Throckmorton, D.J., Anex, D.S., Shepodd, T.J., Singh, A.K., *J. Chromatogr. A* (2001), 925, 251-263.
13. Gusev, I., Huang, X., Horváth, C., *J. Chromatogr. A* (1999), 855, 273-290.
14. Xie, S., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *J. Chromatogr. A* (1997), 775, 65-72.
15. Koide, T., Ueno, K., *J. High Resol. Chromatogr.* (2000), 23, 59-66.
16. Petro, M., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *J. Chromatogr. A* (1996), 752, 59-66.
17. Peters, E.C., Petro, M., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Anal. Chem.* (1998), 70, 2296-2302.
18. Fujimoto, C., Fujise, Z., Matsuzawa, E., *Anal. Chem.* (1996), 68, 2753-2757.
19. Tanaka, H. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, N. Ishizuka, *Anal. Chem.* (2001), 420A-429A.
20. Kato, M., Sakai-Kato, K., Matsumoto, N., Toyo'oka, T., *Anal. Chem.* (2002), 74, 1915-1921.

21. Allen, D., El Rassi, Z., *Electrophoresis* (2003), 24, 3962-3976.
22. Kanamori, K., Yonezawa, H., Nakanishi, K., Hirao, K., Jinnai, H., *J. Sep. Sci.* (2004), 27, 874-886.
23. Nakanishi, K., *J. Porous Mater.* (1997), 4, 67-112.
24. Siouffi, A.M., *J. Chromatogr. A* (2003), 1000, 801-818.
25. Shi, Z., Feng, Y., Da, S. J., *Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* (2003), 26, 2881-2896.
26. Kubín, M., Špaček, P., Chromeček, R., *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* (1967), 32, 3881-3887.
27. Hjerten, S., Liao, J.L., Zhang, R., *J. Chromatogr. A.* (1989), 473, 273.
28. Hjertén S, Nakazato K, Mohammed J, Eaker D.; *Chromatographia* (1993);37; 287.
29. Svec F., Fréchet J.M.J. *Adv Mater* (1994), 6, 242-41.
30. Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Chem. Mater.* (1995), 707-715.
31. Buchmeiser, M. R., *Polymer*, (2007), 48, 2187-2198.
32. Liao, J.L., Chen, N., Ericson, C., Hjertén, S., *Anal. Chem.* (1996), 68, 3468-3472.
33. Palm, A., Novotny, M.V., *Anal. Chem.* (1997), 69, 4499-4507.
34. Wang, Q.C., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Anal. Chem.* (1993), 65, 2243-2248.
35. Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Anal. Chem.*, (1992), 64, 820.
36. Xiong, B.H., Zhang, L.H., Zhang, Y.K., Zou, H.F., Wang, J.D., *J. High Resolut. Chromatogr.* (2000), 23, 67-72.
37. Huang, X.A., Zhang, S., Schultz, G.A., Henion, J., *Anal. Chem.* (2002), 74, 2336-2344.
38. Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Biotechnol. Bioeng.* (1995), 48, 476-480.
39. Svec, F., Fréchet, J.M.J., *J. Chromatogr. A* (1995), 702, 89-95.
40. Lukas, J., Svec, F., Kalal, J., *J. Chromatogr.* (1978), 153, 15-22.
41. Zhang, S.H., Huang, X., Zhang, J., C. Horvath, *J. Chromatogr. A* (2000), 887, 465-477.
42. Suarez, E., Paredes, B., Rubiera, F., Rendueles, M., Villa-Garcia, M.A., Diaz, J.M., *Sep. Purif. Tech.* (2002), 27, 1-10.
43. Bandilla, D., Skinner, C.D., *J. Chromatogr. A* (2003), 1004, 167-179.

44. Peterka, M., Glover, D., Kramberger, P., Banjac, M., Podgornik, A., Barut, M., Štrancar, A., *BioProcessing J.* (2005), March/April, 1-6.
45. Hjertén, S., *Ind. Eng. Chem. Res.*, (1999), 38, 1205.
46. Courtois, J., Bystrom, E., Irgum, K., *Polymer* (2006), 47, 2603-2611.
47. Tennikova, T.B., Bleha, M., Svec, F., Almazova, T.V., Belenkii, B.G., *J. Chromatogr.* (1991), 555, 97-107.
48. Wang, X., Lü, H., Lin, X., Xie, Z., *J. Chromatogr. A* (2008), 1190, 365-371.
49. Lämmerhofer, M., Svec, F., Fréchet, J.M.J., Lindner, W., *J. Chromatogr. A* (2001), 925, 265-277.
50. Yu, C., Xu, C., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *J. Chromatogr. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* (2002), 40, 755-769.
51. Nordborg, A., Svec, F., Fréchet, J.M.J., Irgum, K., *J. Sep. Sci.* (2005), 28, 2401-2406.
52. Hemstrom, P., Nordborg, A., Irgum, K., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *J. Sep. Sci.* (2006), 29, 25-32.
53. Aoki, H., Kubo, T., Ikegami, T., Tanaka, N., Hosoya, K., Tokuda, D., Ishizuka, N., *J. Chromatogr. A* (2006), 1119, 66-79.
54. Viklund, C., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *American Chemical Society* (1996), 744-750.
55. Viklund, C., Svec, F., Fréchet, J.M.J., Irgum, K., *Chem. Mater.* (1995) 7, 707-715.
56. Peters, E.C., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Adv. Mater.* (1999), 11, 1169-1181.
57. Mihelič, I., Koloini, T., Podgornik, A., *J. Appl. Polym. Sci.* (2003), 87, 2326-2334.
58. Dong, J., Xie, C., Tian, R., Wu, R., Hu, J., Zou, H., *Electrophoresis* (2005), 26, 3452-3459.
59. Jiang, Z., Smith, N.W., Ferguson, P.D., Taylor, M.R., *J. Biochem. Biophys. Methods* (2007), 70, 39-45.
60. Mihelič, I., Matjaz, K., Koloini, T., Podgornik, A., *Ind. & Eng. Chem. Research* (2001), 40, 3495-3501.
61. Du, K.F., Yang, D., Sun, Y., *J. Chromatogr. A* (2007), 1163, 212-218.
62. Easson, L.H., Stedman, E., *Biochem* (1933), 27, 1257-1266.

63. Feng, X.D., Guo, X.Q., Qiu, K.Y., *Makromol. Chem.* (1988), 189, 77-83.
64. Grasselli, M., Smolko, E., Hargittai, P., Sáfrány, A., *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B* (2001), 185, 254-261.
65. Odian, G., *Principles of Polymerization* (4th ed.) New York, Wiley-Interscience (2004).
66. Polymer Synthesis, Case Wester Reserve University (2010).
67. Peters, E.C., Petro, M., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Chem. Mater.* (1997), 9, 1898.
68. Štrancar, A., Podgornik, A., Barut, M., Necina, R., *Advances in Biochemical Engineering & Biotechnology*, Vol. 76: Modern Advances in Chromatography, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, (2002), 49-85.
69. Tennikova, T.B., Belenkii, B.G., Svec, F., *J. Liq. Chromatogr.* (1990), 13, 63-70.
70. Baeuml, F., Welsh, T., *J. Chromatogr. A* (2002), 961, 35-44.
71. Brunauer, S., Emmet, P.H., Teller E., *J. Am. Chem. Soc.* (1938), 60, 309-319.
72. Gregg, S.J., Sing, K.S.W., Adsorption, Surface Area and Porosity, Academic Press, London, (1991).
73. Curso de Posgrado: “Caracterización textural de sólidos porosos mediante adsorción de gases” (2014). Dictado en CETMIC, FCE, UNLP.
74. Eeltink, S., Herrero-Martínez, J.M., Rozing, G.P., Schoenmakers, P.J., Kok, W.T., *Anal. Chem.* (2005), 77, 7342-7347.
75. Dalglish, C.; *J Chem Soc* (1952) 3940–3942.
76. Berthod, A., Chiral recognition mechanisms. *Anal Chem* (2006), 78, 2093–2099.
77. Wainer, I. W., *A Practical Guide to the Selection and Use of HPLC Chiral Stationary Phases.* (1988).
78. Iredale, J.; Aubry, A. F.; Wainer, I., *Chromatographia* (1991), 31, 329-334.
79. Rogozhin, S.V., Davankov, V.A.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun* (1971), 490–493.
80. Chen X.M., Yamamoto C., Okamoto Y., *Pure Appl Chem* (2007) 79, 1561–1573.
81. Okamoto, Y., Ikai, T.; *Chem Soc Rev* (2008), 37, 2593–2608.
82. Armstrong, D.W.; *Anal Chem* (1987), 59, 84A–91 A.
83. Davankov, V.A., *Chirality* (1997), 9, 99–102.

84. Franco, P.; Senso, A.; Oliveros, L.; Minguillon, C., *J. Chromatogr. A* (2001), 906, 155.
85. Hess, H., Burger, G., Musso, H.; *Angew Chem Int* (1978) 17:612–614.
86. Okamoto, Y., Kawashima, M., Hatada, K.; *J Am Chem Soc* (1984), 106, 5357–5359.
87. Okamoto, Y., Kawashima, M., Hatada, K.; *J Chromatogr* (1986), 363, 173–186.



Capítulo II

Desarrollo de columnas capilares monolíticas quirales para HPLC

II.1. Introducción

II.1.1. Miniaturización en técnicas de separación

La miniaturización de los sistemas de cromatografía de líquidos fue impulsada por sus grandes beneficios y ventajas, entre los que se encuentran la capacidad de manipular muestras pequeñas, el bajo consumo de fases móviles y aditivos, con la consecuente reducción de los volúmenes de residuos generados, lo que concuerda con las tendencias actuales de una “química analítica verde” [1]. Los primeros pasos fueron dados por Horváth *y col.* en 1967 [2,3], quienes rellenaron columnas de 0,5-1,0 mm de diámetro interno con materiales particulados. Hacia 1980 aparecieron las primeras columnas capilares de menos de 1,0 mm de diámetro para micro-HPLC desarrolladas por Scott y Kucera [4].

Actualmente, se encuentran disponibles en el mercado columnas empaquetadas de entre 0,5 y 0,3 mm de diámetro interno, siendo su principal desventaja que generan caídas de presión muy elevadas. Este problema fue resuelto con el desarrollo de las fases estacionarias monolíticas, las cuales permiten obtener similares eficiencias con presiones que son unas tres veces menores. De esta manera, es posible aumentar la velocidad de la fase móvil, logrando así separaciones muy eficientes en tiempos de análisis significativamente más cortos. Estas ventajas han impulsado el desarrollo de columnas monolíticas para su uso tanto en micro-HPLC como en electrocromatografía capilar (CEC) con resultados muy prometedores [5].

En este sentido, junto con la disminución de las dimensiones de las columnas cromatográficas, fue necesario modificar los equipos convencionales de HPLC de manera de reducir radicalmente la dispersión extracolumna generada por los diversos componentes de los mismos. Es decir, se debió adaptar el sistema de inyección, las tuberías de conexión y el detector, reduciendo los tamaños estándar de estos componentes a escalas miniaturizadas [6]. Estas modificaciones llevaron a la comercialización de nuevos equipos de escala capilar/micro/nano-HPLC desarrollados con el fin de aprovechar las ventajas de las nuevas columnas y mejorar las distintas aplicaciones [7,8].

II.1.1.1. Sistemas de HPLC en escalas micro, capilar y nano

La clasificación de los diferentes sistemas de cromatografía de líquidos (CL) está basada principalmente en las dimensiones de las columnas empleadas. Si bien no hay completo acuerdo para las definiciones de “capilar-HPLC” y “nano-HPLC”, se ha sugerido [9,10] que “nano-HPLC” debe aplicarse a las separaciones cromatográficas realizadas en columnas de diámetro interno de 50 a 100 μm , mientras que “capilar-HPLC” debe reservarse cuando se emplean columnas de 100 a 500 μm . En el caso de utilizar columnas de diámetro interno de 500 a 1000 μm se acordó emplear la denominación “micro-HPLC”.

La elección de cada sistema determina tanto los caudales de trabajo, como el volumen de inyección adecuado, como se indica en la Tabla II.1.

Tabla II.1: Clasificación de los sistemas de HPLC según la dimensión de la columna [11].

HPLC	d. i.* (μm)	Caudal (nl/min)	Capacidad de carga (μg)
micro	1000 – 500	40.000 – 20.000	50-500
capilar	500 – 100	20.000 – 300	1-50
nano	100 –50	300 – 180	<1

*d.i.: diámetro interno de la columna

La disminución del diámetro interno de las columnas produce una mayor sensibilidad debida a una menor dilución o dispersión de las bandas cromatográficas dentro de la columna.

Estos diseños de columnas, requieren adaptaciones en los equipos de HPLC convencionales por medio de:

- a) divisores de flujo (“splits” activos o pasivos) que permiten reducir y regular el flujo de fase móvil que atraviesa la columna,
- b) microinyectores, cuyo volumen está determinado por un bucle de inyección o “loop” capilar del orden de los nanolitros y
- c) microceldas de detección o, alternativamente, detección en línea (“on-column”).

II.1.2. Columnas empleadas para cromatografía de líquidos

En base a la estructura de los soportes cromatográficos utilizados, se describen a continuación con mayor detalle, los distintos tipos de columnas para CL, poniendo énfasis en las columnas monolíticas.

II.1.2.1. Columnas particuladas convencionales

Las columnas tradicionalmente utilizadas en HPLC consisten en lechos empaquetados de partículas porosas de sílice (columnas particuladas). Estas partículas de sílice presentan excelentes propiedades cromatográficas, entre las que se encuentran su resistencia mecánica y su elevada área superficial, pudiendo ser derivatizadas para fijar grupos funcionales que permitan llevar a cabo separaciones basadas en diferentes mecanismos de interacción analito-fase estacionaria (hidrofílica o hidrofóbica, intercambio iónico, afinidad, etc.). Estas partículas porosas son sintetizadas parcial o totalmente mediante distintos procedimientos que permiten lograr tamaños uniformes y formas esféricas. Sin embargo, estas columnas empaquetadas poseen importantes limitaciones, como grandes volúmenes libres entre partículas y bajos coeficientes difusionales de los analitos en la fase móvil estanca presente en los poros, lo que genera una alta dispersión de los picos cromatográficos, principalmente para compuestos de alto peso molecular [12].

Por eso, se han desarrollado varias estrategias para reducir el tiempo de análisis manteniendo una buena performance cromatográfica en las separaciones, entre las que se encuentran la reducción en el diámetro promedio de partículas de relleno a valores inferiores a 2 μm (para su uso en UHPLC) [16,17] uso de partículas sub-2 μm de núcleo sólido y película porosa (“fused core” o “porous shell”) [20,21], el uso de elevadas temperaturas (80–200 °C) mediante columnas térmicamente estables [18,19] y finalmente el empleo de soportes monolíticos [13,15].

El análisis de muestras complejas en diversos ámbitos de la ciencia, como toxicología, química clínica, medicina forense, análisis ambiental y química alimentaria [22] que requiere altas capacidades de picos impulsó el desarrollo de las metodologías anteriormente mencionadas para lograr una resolución satisfactoria en un tiempo de análisis razonable.

Las columnas rellenas con partículas sub-2 μm y 5 cm de longitud [23], resultan incompatibles con los sistemas instrumentales convencionales debido a su permeabilidad extremadamente baja (muy altas caídas de presión). Esto dio origen al empleo de la técnica de UHPLC, cuyas bombas operan a mayores presiones ($\Delta P < 1200$ bares) que las bombas de HPLC convencionales ($\Delta P < 400$ bares).

Si bien el empleo de UHPLC permite acelerar el análisis o bien aumentar el poder de resolución, el instrumento posee un costo comercial muy elevado. Asimismo, las partículas empleadas presentan una gran dificultad en su empaque y las columnas resultan poco reproducibles y robustas.

II.1.2.2. Columnas monolíticas

Los materiales monolíticos para cromatografía, catálisis y otras aplicaciones derivan directamente de los polímeros macroporosos. Éstos se caracterizan por poseer estructuras porosas fijas, independientes del disolvente empleado e inclusive en estado seco. Su estructura interna consiste en un conjunto interconectado de microglóbulos de polímero separados por poros de diferente tamaño y su rigidez estructural está dada mediante una reticulación extensiva. Entre los primeros usos de estos materiales relativamente nuevos se pueden enumerar los siguientes: intercambiadores de iones para purificar el agua y los efluentes industriales, adsorbentes en procesos de purificación, soportes para síntesis en fase sólida, inmovilización de reactivos, etc [24,26].

En los años '50, estos materiales fueron desarrollados por polimerización en suspensión. Utilizando una mezcla compuesta por un monómero (derivado de vinilo), un agente entrecruzante o "cross-linker" (derivado de divinilo), un iniciador de la reacción y un disolvente porógeno (porógeno o formador de poros) que se dispersaban por agitación en una fase acuosa. La descomposición del iniciador era inducida térmicamente y la polimerización comenzaba dentro de las gotas dispersas, conduciendo finalmente a la generación de partículas esféricas de polímero. Después de la polimerización, el porógeno se eliminaba por lavado, revelando la morfología macroporosa típica.

Posteriormente, surgió la idea de obtener polímeros macroporosos dentro de un molde, constituyendo así una sola pieza más que un material disperso. Sin embargo, la tecnología para lograr altos rendimientos para la obtención de estos monolitos no se desarrolló hasta 1990 [27,28]. Las primeras separaciones cromatográficas exitosas

asociadas con polímeros macroporosos rígidos preparados por polimerización en masa (*bulk*) en un molde cerrado fueron logradas por Hjertén y *col.* a principios de 1990 [29]. Los primeros materiales suficientemente rígidos en formato de columna analítica se deben a Svec y Fréchet, que describen a la fase estacionaria como un “bastón macroporoso” basado en un copolímero de metacrilato [27,30].

La expresión “*monolítico*” fue introducida por Viklund y *col.* [31] y se hizo rápidamente popular. Deriva de la palabra griega “*monolithos*”, que significa “una sola piedra”, a menudo con forma de pilar. Dicho nombre se aplicó a los monumentos antiguos, antes que a estos nuevos materiales, como la piedra denominada “Torre Humana” ubicada en el Museo de Vigeland, Oslo, Noruega (Figura II.1) o muchos monolitos egipcios, incluyendo obeliscos de una piedra única. A finales de los años 90, el grupo de Tanaka en Kyoto (Japón) introdujo los monolitos inorgánicos basados en sílice. Estos polímeros macroporosos también tienen una estructura de poros jerárquica [32,33].



Figura II.1: Fotografía de la Torre Humana, monumento monolítico que se encuentra en el Museo de Vigeland (Noruega).

Estas estructuras monolíticas conteniendo canales interconectados son capaces de soportar el flujo a presiones elevadas. Se caracterizan por una distribución de tamaño de poro bimodal constituida por poros del tamaño de las micras y poros mucho más pequeños.

Los poros de mayor tamaño se denominan “*macroporos*” y tienen un promedio de 2 μm , interconectados formando los canales por los que circula prácticamente la totalidad de la fase móvil. Los macroporos, controlan la permeabilidad de la columna, junto con la tortuosidad y la constricción del lecho. El otro tipo de poros que conforma la distribución son los “*mesoporos*” ($\cong 13 \text{ nm}$), en ellos se producen los fenómenos de adsorción-desorción y partición de los analitos, es decir, son los responsables de la retención cromatográfica. Tallarek y Leinweber, demostraron que las columnas monolíticas de sílice poseen elevadas permeabilidades, equivalentes a columnas rellenas con partículas de 11 μm [34]. En el caso de los monolitos de sílice, también pueden aparecer “*microporos*” ($< 2 \text{ nm}$), pero estos tienen un tamaño demasiado pequeño para permitir el acceso de la mayoría de las moléculas de interés.

Si bien en un principio, los materiales monolíticos no atrajeron la atención de la comunidad cromatográfica, aproximadamente a partir del año 2000 esto cambió, lo cual se evidencia en el significativo aumento del número de publicaciones relativas al tema, en el período 2000-2006 y que actualmente se mantiene, como se observa en la Figura II.2.

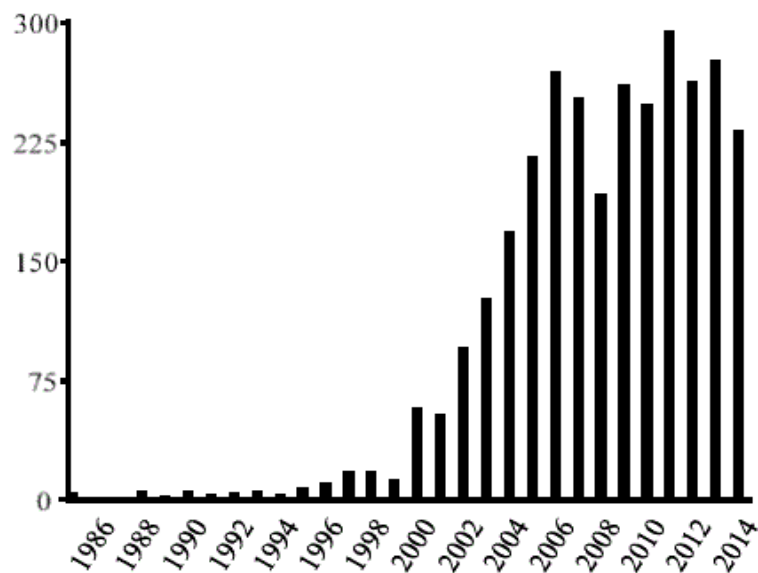


Figura II.2: Evolución en el tiempo de la cantidad de publicaciones periódicas relacionadas con el desarrollo de columnas monolíticas.

La popularidad de estos materiales ahora es apoyada por la existencia de columnas monolíticas comerciales basadas en sílice, como Chromolith de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) y Onyx de Phenomenex (Torrance, CA, Estados Unidos) [32]. La variedad de opciones para el desarrollo de columnas, junto con la diversidad de análisis de matrices complejas, hace que sea difícil la elección del producto comercial más exitoso. Las columnas monolíticas comerciales actuales poseen eficiencias similares a la de las columnas rellenas con partículas de 5 μm , aunque menores a las de las columnas rellenas con la nueva generación de partículas sub-2 μm para UHPLC.

Las columnas monolíticas poseen dos grandes ventajas sobre las columnas rellenas: una alta permeabilidad y una baja resistencia a la transferencia de masa [35]. En este sentido, los materiales monolíticos, a diferencia de los particulados, prácticamente no presentan poros con fase móvil estanca, produciendo así una gran disminución a la resistencia a la transferencia de masa del analito, lo que se traduce en una significativa disminución en la incidencia del término C de van Deemter. De esta manera, se puede trabajar a caudales mayores al óptimo sin observar un aumento significativo en la altura equivalente de plato teórico (H), lográndose así separaciones mucho más rápidas, sin sacrificar la eficiencia de las mismas. En la Figura II.3 se pueden observar comparativamente los gráficos de van Deemter para columnas particuladas y monolíticas donde se aprecia claramente el efecto de la estructura monolítica en el término C .

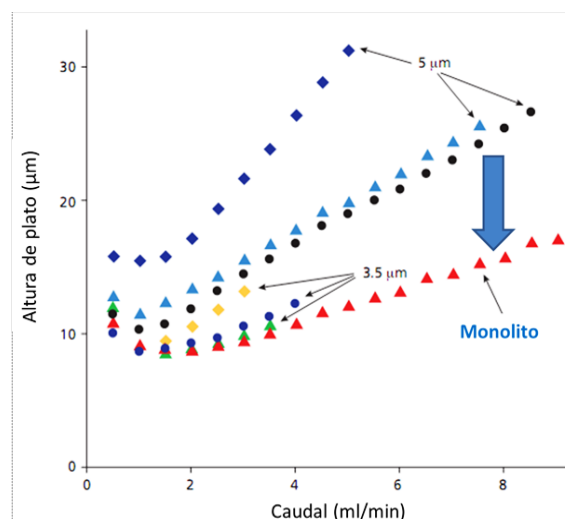


Figura II.3: Gráficos de van Deemter para columnas empaquetadas convencionales (con partículas de 5 y 3,5 μm) y para una columna monolítica.

Otra ventaja de las columnas monolíticas es que, debido a su estructura continua, no necesitan fritas terminales para la retención del relleno, como ocurre con las columnas particuladas. Además, las técnicas de empaquetado de partículas son complejas, mientras que los monolitos (principalmente los poliméricos orgánicos) son fácilmente sintetizados *in situ* independientemente de la forma y naturaleza del soporte, lo que es una gran ventaja en el llenado de dispositivos microfluídicos, particularmente cuando el molde tiene una geometría compleja. Además, la variedad de procedimientos de síntesis y los diferentes monómeros funcionales que se pueden emplear proporcionan una gran flexibilidad en relación a la funcionalización química superficial que se puede obtener y de esta forma, permiten la aplicación de una amplia gama de metodologías de separación.

Sin embargo, las columnas monolíticas también poseen algunas desventajas, entre ellas, la baja reproducibilidad, en algunos casos, del proceso de síntesis. Dado que la síntesis de la fase estacionaria se realiza individualmente, se genera mayor variabilidad en comparación con la síntesis de las partículas de relleno de las columnas tradicionales que se produce en “batch”. Si además se tiene en cuenta que algunos monolitos requieren etapas de funcionalización posteriores, la reproducibilidad es aún más difícil de garantizar. Sin embargo, estas técnicas de síntesis evitan el empaquetamiento de columnas, principal causa de variabilidad de las columnas conteniendo material particulado. Fretchet *y col.* (2007) muestran un estudio de la reproducibilidad de columnas monolíticas orgánicas, comparando tiempos de retención entre columnas y diferentes “batches” a lo largo del tiempo, mostrando resultados prometedores siempre y cuando se realice un control muy meticuloso de las variables de polimerización [36].

II.1.3. Referencias

1. Hernández-Borges, J., Artuki, Z., Rocco, A., Fanali, S., *J. Sep. Sci.*, (2007), 30, 1589.
2. Horváth, C.; Preis, B. A.; Lipsky, S. R., *Anal. Chem.* (1967), 39, 1422.
3. Horváth, C.; Lipsky, S. R., *Anal. Chem.* (1969), 41, 227.
4. Scott, R. P. W.; Kucera, P., *J. of Chromatogr.*, (1976), 125, 251.
5. Legido-Quigley, C., Marlin, N. D., Melin, V., Manz, A., & Smith, N. W. *Electrophoresis*, (2003), 24, 917–944.
6. Vissers, J. P., *J. Chromatogr. A*, (1999), 856, 117–43.
7. Karlsson, K.E., Novotny, M., *Anal. Chem.*, (1988), 60, 1662.
8. Rapp, E., Tallarek, U., *J. Sep. Sci.* (2003), 26, 453–470.
9. Vissers, J.P.C., Ursem M., Salzmann J.P., *Anal. Chem.*, (1996), 68,1507.
10. Saito, Y., Jinno, K., Greibrokk, T.J., *J. Sep. Sci.*, (2004), 27, 1379.
11. Smith, N. W., Legido-Quigley, C., Marlin, N. D., Melin, V., *Capillary Liquid Chromatography. Capillary and Micro-High Performance Liquid Chromatography*, (1967), 1–22.
12. Oberacher, H., Premstaller, A., Huber, C. G., *J. Chromatogr. A*, (2004), 1030, 201–208.
13. Zou, H., Huang, X., Ye, M., Luo, Q., *J. Chromatogr. A*. (2002) 954, 5–32.
14. Tanaka, N., Kobayashi, H., Ishizuka, N., Minakuchi, H., Nakanishi, K., Hosoya, K., *J. Chromatogr. A*. (2002), 965, 35–49.
15. Svec, F., Frechet, J.M.J., *Ind. Eng. Chem.* (1999), 38, 34–48.
16. Wu, N., Clausen, A.M., *J. Sep. Sci.* (2007), 30, 1167–1182.
17. Nguyen, D.T-T., Guillarme, D., Rudaz, S., Veuthey, J-L., *J. Sep. Sci.* (2006), 29, 1836–1848.
18. McNeff, C. V., Yan, B., Stoll, D.R., Henry, R.A., *J. Sep. Sci.* (2007) 30, 1672–1685.
19. Dunlap, C.J., Carr, P.W., McNeff, C.V., Stoll Peer, D., *Anal. Chem.* (2001), 73, 598 A–607 A.
20. Guiochon, G., Gritti, F., *J. Chromatogr. A*. (2011), 1218, 1915–1938.

21. Destefano, J.J., Schuster, S., Lawhorn, J.M., Kirkland, J.J., *J. Chromatogr. A.* (2012), 1258, 76–83.
22. Grata, E., Boccard, J., Guillarme, D., Glauser, G., Carrupt, P.-A., Farmer, E.E., *J. Chromatogr. B.* (2008), 871, 261–270.
23. MacNair, J.E., Lewis, K.C., Jorgenson, J.W., *Anal. Chem.* (1997), 69, 983–989.
24. Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Chem. Mater.* (1995), 707-715.
25. Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Macromolecules* (1995), 7580-7582.
26. Viklund, C., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *American Chemical Society* (1996), 744-750.
27. Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Anal. Chem.*, (1992), 64, 820.
28. Kubín, M., Špaček, P., Chromeček, R., *Collect. Czechoslov., Chem. Commun.* (1967), 32, 3881–3887.
29. Hjerten, S., Liao, J.L., Zhang, R., *J. Chromatogr. A*, (1989), 473, 273.
30. Svec, F., Fréchet, J.M.J., *US patent* (1994) 5,334,310.
31. Viklund, C., Svec, F., Fréchet, J.M.J., Irgum, K., *Chem. Mater.* (1995) 7, 707-715.
32. Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N., Tanaka, N., *Anal. Chem.*, (1996), 68, 3498.
33. Nakanishi, K., Minakuchi, H., Soga, N., Tanaka, N., *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, (1997) 8, 547.
34. Leinweber, F.C., Tallarek, U., *J. Chromatogr. A.* (2003), 1006, 207–228.
35. Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N., Tanaka, N. *J. Chromatogr. A*, (1997) 762,135.
36. Geiser, L., Eeltink, S., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *J. Chromatogr. A.* (2007), 140–146. 2, 135–146.

II.2. Objetivos

El objetivo del presente capítulo es preparar columnas capilares monolíticas quirales para ser empleadas en el desarrollo de métodos de análisis rápidos y robustos de separación y análisis enantiomérico de compuestos quirales de interés farmacéutico, ambiental y/o toxicológico empleando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en escala capilar.

Para ello, se proponen los siguientes *objetivos específicos*:

1. Optimizar las condiciones de síntesis de diferentes monolitos poliméricos de metacrilato mediante polimerización controlada en el interior de tubos capilares de sílice.
2. Caracterizar morfológica y cromatográficamente las columnas monolíticas obtenidas.
3. Sintetizar el selector quiral *tris*(3,5-dimetilfenil) carbamato de celulosa a partir del polisacárido natural, y caracterizarlo química y espectroscópicamente.
4. Funcionalizar las columnas capilares con el derivado de celulosa mediante adsorción física sobre la superficie monolítica.
5. Estudiar el efecto del procedimiento de funcionalización sobre la capacidad de discriminación quiral del material resultante.
6. Optimizar las condiciones cromatográficas (composición de la fase móvil, incorporación de aditivos) para la enantioresolución de compuestos de interés biológico ópticamente activos.

II.3. Experimental

II.3.1. Preparación de las CCMQs para HPLC-capilar

II.3.1.1. Acondicionamiento del capilar

Se emplearon capilares de sílice fundida de entre 10 y 25 cm de largo, de 788 μm d.e. y 400 μm d.i., recubiertos de poliimida (Polymicro Technologies, Estados Unidos).

Antes de la polimerización se modificó la superficie interna del capilar de sílice con metacrilato de 3-(trimetoxisilil)propilo (γ -MAPs) (98%, Sigma-Aldrich, Alemania) para favorecer el anclaje covalente del monolito (Figura II.4).

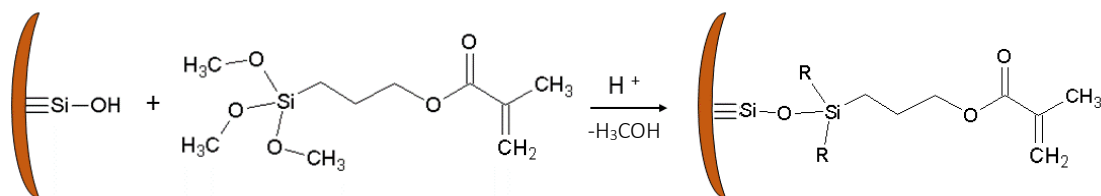


Figura II.4: Reacción de silanización de la superficie interna de los tubos capilares.

Para ello se siguió el procedimiento descrito por Frechet *y col.* [1] que consiste en el pasaje sucesivo de las siguientes disoluciones/solventes:

- 1 Acetona (98%, Biopack, Argentina) 5 minutos, para asegurar la limpieza de la pared interna.
- 2 Agua desionizada MilliQ (Millipore, Estados Unidos) 5 minutos, hasta eliminación completa de la acetona.
- 3 NaOH (97%, Analar, Inglaterra) 0,2 M, hasta pH básico a la salida del capilar. Se continuó el tratamiento durante 30 minutos más para conseguir la ruptura de los enlaces siloxano, dejando libres los grupos silanoles.
- 4 Agua desionizada, hasta pH neutro a la salida del capilar, para eliminar los restos de la solución básica.

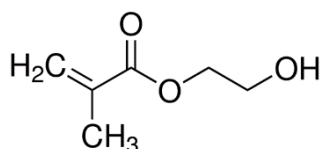
- 5 HCl (37%, Anedra, Argentina) 0,2 M, hasta pH ácido a la salida del capilar. Se continuó el tratamiento durante 30 minutos más para protonar los grupos silanoles.
- 6 Agua desionizada, hasta pH neutro a la salida del capilar, para eliminar los restos de ácido.
- 7 Etanol (99%, Merck, Argentina), ajustado a pH = 5 con ácido acético glacial (99,7%, Sigma-Aldrich, Alemania) durante 15 minutos, con el fin de eliminar el agua y evitar la hidrólisis del reactivo silanizante que se adiciona en la siguiente etapa.
- 8 Disolución del reactivo silanizante γ -MAPs al 30 % p/p en etanol pH = 5, (60 minutos), que incorpora un grupo vinilo que permite el anclaje covalente al polímero monolítico.
- 9 Acetona (15 minutos), para eliminar el exceso del reactivo silanizante.

A continuación, se aplicó una corriente de nitrógeno para secar el capilar, dejándose en estas condiciones durante 24 hs hasta completar la reacción de condensación de los grupos silanoles. Finalmente se taparon los extremos del capilar con septas de goma.

II.3.1.2. Composición de las mezclas de polimerización

Monómero Funcional

Con el fin de favorecer una posterior adsorción del selector quiral, se empleó 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) (98%, Sigma-Aldrich, Alemania). La estructura química se muestra a continuación:

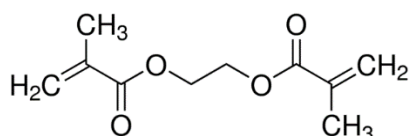


Este reactivo líquido fue purificado mediante extracción líquido/líquido para quitar el reactivo estabilizante monometil-éter de hidroquinona, para lo cual se solubilizó

en agua y se extrajo 3 veces con 10 mL de n-heptano. Finalmente, la fracción acuosa conteniendo el monómero funcional se destiló a presión reducida (2 mmHg, 57°C) y el destilado se guardó en atmósfera inerte hasta su uso [2].

Agente Entrecruzante

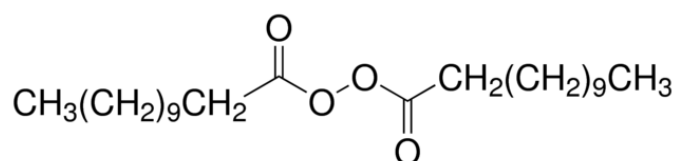
Se utilizó dimetacrilato de etilenglicol (EDMA) (99%, Sigma-Aldrich, Alemania), como reactivo entrecruzante de las cadenas del monómero HEMA, cuya estructura química es la siguiente:



Dicho reactivo fue purificado por destilación a presión reducida, en presencia de un 3% p/p de fenil-2-naftilamina y guardado en atmósfera de nitrógeno [2].

Iniciador térmico

Como iniciador térmico de la reacción de polimerización, se empleó peróxido de laurilo (LPO) (97%, Sigma-Aldrich, Alemania) que fue recristalizado desde benceno, a 30°C [2].



Solventes Porogénicos

Como solventes formadores de la estructura macroporosa del monolito, se emplearon dos mezclas diferentes de solventes en la polimerización de los monómeros de metacrilato: ciclohexanol (98%, Carlo Erba, Italia) /1-dodecanol (99%, Sigma-Aldrich, Alemania) y 1,4-butanodiol (Sigma-Aldrich, Alemania) / n-propanol (98%, Analar, Inglaterra).

Los polímeros monolíticos macro/mesoporosos se prepararon a partir de la polimerización de mezclas del monómero funcional HEMA con el agente entrecruzante EDMA, en una mezcla de disolventes porogénicos (1,4-butanodiol/1-propanol o 1-dodecanol/ciclohexanol) [3,4] y el iniciador térmico LPO.

Las mezclas se prepararon con una relación fija de monómeros/solvente porogénico 40/60 % p/p y 0,3% p/p de LPO variando la composición relativa de la mezcla porogénica. La polimerización se realizó a temperatura y tiempo de reacción constantes, 70°C y 20 hs, respectivamente. En la Tabla II.2 se muestra la composición de las mezclas porogénicas estudiadas.

Tabla II.2: Composición de las dos mezclas de solventes porogénicos empleados en la preparación de los polímeros monolíticos conteniendo 24% p/p de HEMA, 16% p/p de EDMA y 0,3% de LPO polimerizadas a T = 70 °C durante 20 hs.

Mezclas	solventes porogénicos (% p/p)	
	1-propanol	1,4-butanodiol
M 1	45	15
M 2	50	10
M 3	42	18

Mezclas	solventes porogénicos (% p/p)	
	1-dodecanol	ciclohexanol
M 4	20	40
M 5	30	30
M 6	35	25
M 7	38	22
M 8	40	20
M 9	42	18
M 10	45	15
M 11	50	10
M 12	55	5
M 13	60	0

II.3.1.3. Síntesis de monolitos en “*bulk*”

Las primeras pruebas de polimerización se realizaron en tubos eppendorf, para poder visualizar fácilmente la formación completa del polímero y además poder contar con cantidad suficiente de material para los estudios posteriores de caracterización (BET, MIP, solubilidad, etc).

Las polimerizaciones en masa o “*bulk*” se hicieron a partir del siguiente procedimiento [5] (cada ensayo se realizó por duplicado):

- i) bajo campana se pesaron en tubos eppendorf los componentes de la mezcla de polimerización (según se detalla en la Tabla II.2) en balanza analítica modelo Adventurer Pro (Ohaus, Estados Unidos),
- ii) la mezcla se sonicó durante 10 minutos hasta disolución completa de los componentes empleando un baño de ultrasonido modelo 8890 (Cole Parmer, Estados Unidos),
- iii) se burbujeó con nitrógeno durante unos 10 minutos para eliminar el oxígeno disuelto, el cual reacciona con el iniciador radicalario LPO;
- iv) se taparon los tubos eppendorf y se los dejó en estufa (Fisher Scientific Co., Estados Unidos) a 70°C durante 20 hs.

II.3.1.4. Fabricación de las CCMs

Las mezclas preparadas de acuerdo a lo explicitado en el inciso anterior que resultaron en una polimerización completa y homogénea, se emplearon para llenar capilares de sílice fundida de 400 μm d.i. cortados a distintas longitudes (10; 15 y 20 cm) previamente tratados. La polimerización completa se verificó por ausencia de huecos mediante una lupa binocular estereoscópica modelo ST 30 2L (Arcano, Argentina) con aumento máximo de 60X.

Se llenaron los capilares con la mezcla de polimerización correspondiente mediante una jeringa Hamilton tipo luer-lock modelo 5190-1530 (Agilent, Estados Unidos) de 1mL, con un émbolo con punta de polímero (PTFE) y se taparon las puntas con septas de goma. Se verificó la ausencia de burbujas en su interior por medio de una lupa y se los colocó en estufa a 70°C durante 20 hs.

Una vez finalizado el proceso de polimerización, a las columnas obtenidas se les cortaron ligeramente y en forma recta sus extremos para liberar restos adheridos de las septas de goma y para que puedan ser ajustadas sin pérdidas al cromatógrafo.

Se lavaron con metanol durante 30 min con presiones comprendidas entre 50 y 200 bar mediante una bomba de HPLC (Serie 1100, Agilent Technologies, Estados Unidos), para eliminar los restos de los disolventes porogénicos y monómeros que pudieron haber quedado sin reaccionar.

II.3.1.5. Caracterización de las CCMs

Se evaluaron las propiedades morfológicas y estructurales (área superficial, volumen y distribución de tamaño de poros) del lecho monolítico obtenido mediante técnicas de adsorción/desorción de nitrógeno (BET), porosimetría de intrusión de mercurio (MIP), microscopía electrónica de barrido (SEM) y determinación de la permeabilidad cromatográfica (B_0). Se evaluó también, la performance cromatográfica de las columnas (eficiencia, selectividad, resolución) a partir de la inyección de mezclas de analitos neutros (alquilbencenos).

II.3.1.5.1. Propiedades morfológicas

Simultáneamente a la preparación de las columnas, se llevó a cabo la polimerización de la porción restante de cada mezcla (en tubos eppendorf de 1,5 mL) para estimar el área superficial, el volumen de poro y la distribución de tamaños de poro de los materiales monolíticos. Finalizada la polimerización (70°C-20 hs), el material monolítico se extrajo de los tubos eppendorf, se cortó en pequeñas porciones, se lavó mediante Soxhlet durante 24 hs con MeOH y finalmente se secó a 50° C en estufa durante 6 hs. Tras este tratamiento, se realizaron las determinaciones de área superficial y volúmenes de poros mediante adsorción/desorción de nitrógeno (ASAP 2020, Micromeritics) y MIP (AutoPore III, Micromeritics), respectivamente.

El análisis de la morfología se realizó sobre pequeños segmentos de columnas colocados en forma vertical en septas de goma que permitieron la observación de la sección transversal del lecho cromatográfico (morfología y adhesión del lecho monolítico

en la pared del capilar), tomadas con un microscopio electrónico de barrido (SEM) Quanta 200 (FEI, Tokio, Japón).

II.3.1.5.2. Propiedades cromatográficas

La permeabilidad cromatográfica (B_0) del lecho monolítico se determinó midiendo el caudal a la salida de la columna a medida que se modifica la caída de presión aplicada en la entrada de la misma. Se utilizó como fase móvil una mezcla de metanol/agua (80:20). En primera instancia, se aplicaron distintos caudales desde la bomba binaria que determinaron las caídas de presión. Luego, se procedió a medir el flujo real en la columna, manteniendo la contrapresión de la válvula divisora de flujo. Se determinó la masa de fase móvil acumulada en un matraz de 1 mL durante un período de tiempo determinado, y se la convirtió a volumen por medio de su densidad a la temperatura de trabajo. Los detalles del equipamiento empleado se dan en la Sección II.3.4. Con los datos obtenidos se graficó la ecuación de Darcy (Ec.4). Los valores de B_0 así obtenidos corresponden a las pendientes de las rectas de velocidad lineal de fase móvil en función de la relación entre la presión generada, viscosidad de la mezcla de solventes y longitud de la columna, como se indica en la sección I.2.2.2 del Capítulo I (pág.26).

II.3.2. Síntesis del selector quiral

Para la síntesis del selector quiral *tris*(3,5-dimetilfenil) carbamato de celulosa (CDMPC), los siguientes reactivos y solventes fueron previamente tratados para su uso:

- 1) celulosa microcristalina AVICEL (Ph 101, Merck, Alemania) secada en vacío a 50°C con pentóxido de fósforo durante 34 hs.
- 2) piridina (99%, Aldrich, Estados Unidos) secada por calentamiento a reflujo (18 hs) con agitación constante en presencia de óxido de calcio anhidro en atmósfera de nitrógeno. Posteriormente purificada por destilación fraccionada (85°C) y guardada en desecador al vacío y oscuridad hasta su uso [2].

En la Figura II.5 se indica la reacción de síntesis del derivado de polisacárido CDMPC descrito en la literatura por Frechet *y col.* [6].

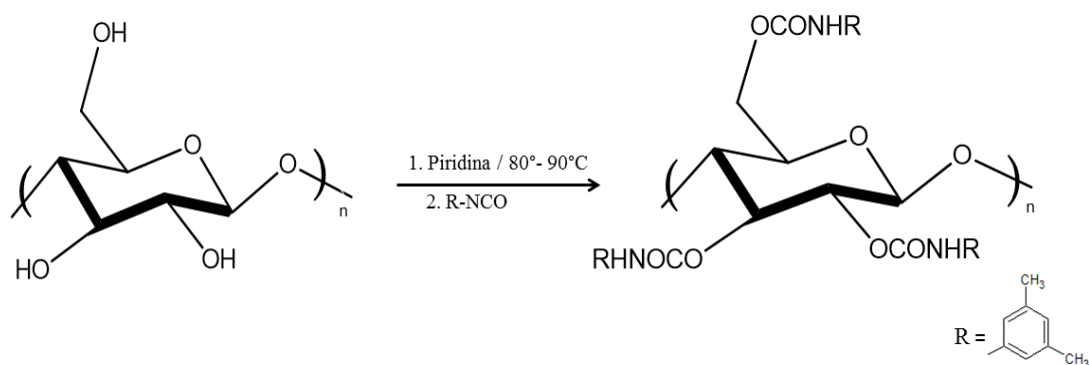


Figura II.5: Esquema de síntesis de *tris*(3,5-dimetilfenil) carbamato de celulosa (CDMPC).

En la Figura II.6, se muestra un esquema del equipamiento utilizado para realizar la reacción de derivatización.

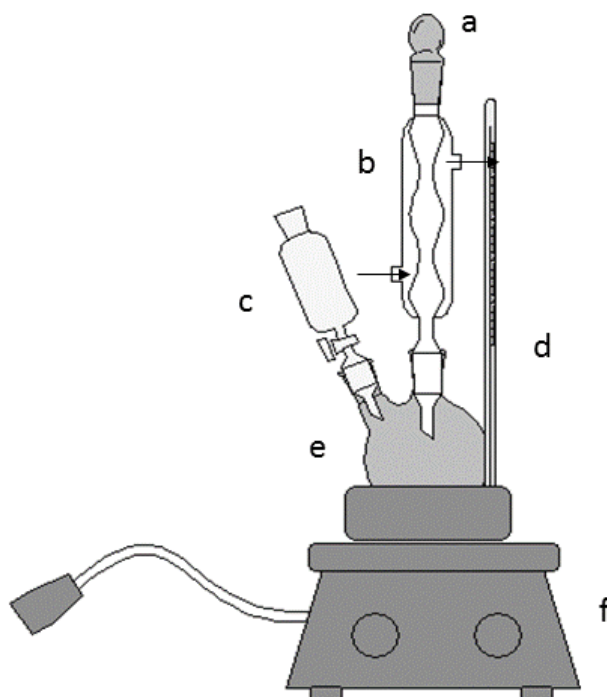


Figura II.6: a) Esfera conteniendo sílica gel (previamente secada en mufla a 150°C durante 2 hs) para absorber la humedad; b) Tubo refrigerante; c) Ampolla conteniendo el reactivo derivatizante; d) Termómetro; e) Balón de dos bocas, conteniendo la mezcla de reacción; f) Placa de calentamiento y agitador magnético.

Se sometió a reflujo (en un baño de propilenglicol) 1,15 g de celulosa microcristalina seca con 30 mL de piridina anhidra en un balón de vidrio con dos bocas, en una de ellas se colocó un refrigerante (en el extremo del mismo una esfera de vidrio conteniendo gel de sílice para mantener las condiciones anhidras) y en la otra, una ampolla con robinete para el agregado del reactivo derivatizante.

Luego de 8 hs de reflujo, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se le adicionó gota a gota una disolución del reactivo derivatizante 3,5-dimetilfenilisociano (5g) (99%, Aldrich, Alemania). La mezcla de reacción de color ámbar y aspecto viscoso se mantuvo a reflujo a 80-90°C, con agitación permanente (placa de calentamiento y agitación Thermolyne Cimanec 1, Estados Unidos) y un leve burbujeo de nitrógeno durante 28 hs. A continuación, la mezcla se enfrió, se vertió en 200 mL de metanol grado HPLC (J.T. Baker, México) y se agitó durante 30 minutos. El sólido blanco obtenido fue filtrado, lavado varias veces con metanol y secado en vacío a 30°C [6,8].

II.3.3. Adsorción del selector quiral en las CCMs

Se prepararon soluciones de distinta concentración del derivado CDMPC (40-60 mg/mL) en acetona grado HPLC (Macron Chemicals, Estados Unidos) [2]. Cada solución se sonicó hasta la disolución total del sólido. Las columnas capilares monolíticas se lavaron con acetona empleando una bomba de HPLC convencional durante 60 minutos a un caudal de 0,05 mL/min.

Luego, para introducir las distintas disoluciones del selector quiral se empleó una bomba de jeringa Modelo 100, KD Scientific (New Hope, Estados Unidos) operada a un caudal de 60 µL/h durante 2 hs a temperatura ambiente. Para ello, se conectó la columna capilar monolítica a la jeringa Hamilton de 1mL, la cual se mantenía inmóvil mediante el acople de la bomba de jeringa.

Las columnas capilares monolíticas con el selector quiral así adsorbido fueron secadas en estufa a 40°C durante 24 hs para eliminar el solvente.

II.3.4. Sistema cromatográfico

Las columnas capilares monolíticas quirales fabricadas fueron utilizadas en un cromatógrafo de líquidos Agilent Serie 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, Estados Unidos) especialmente adaptado en nuestro laboratorio a microescala (“micro-HPLC”) como se muestra en la Figura II.7.

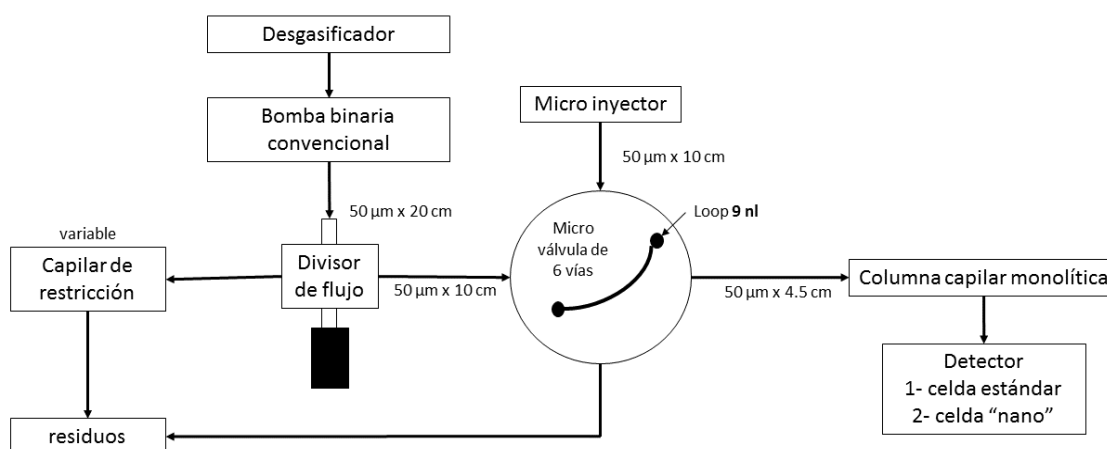


Figura II.7: Diagrama del sistema de HPLC convencional adaptado a un sistema para micro-HPLC.

El sistema cromatográfico está conformado por una bomba binaria y detector UV-Vis de longitud de onda variable (VWD). Dado que el caudal mínimo suministrado por la bomba estándar es 0,05 mL/min, muy elevado para tubos capilares, fue necesario disminuir el caudal en el orden de 10 veces. Para ello se empleó un divisor de flujo modelo P470 (Upchurch, Chromtech, Estados Unidos) que permite emplear caudales del orden de los 5 µL/min. Así mismo, se empleó una válvula de seis vías MXT Series II (Rheodyne, IDEX, Estados Unidos), equipada con un adaptador para micro inyección M432 (Rheodyne, IDEX, Estados Unidos), un filtro “in-line” de PEEK de porosidad 0,5µm (Upchurch, IDEX, Estados Unidos) y un loop de inyección construido en nuestro laboratorio de 9 nL realizado con un capilar de sílice fundida (Figura II.8). Todas las

conexiones se realizaron con capilares de 50 μm d.i. de distintas longitudes (Figura II.7) y acoples (end-fittings) para tuberías de diámetros a escala micro.

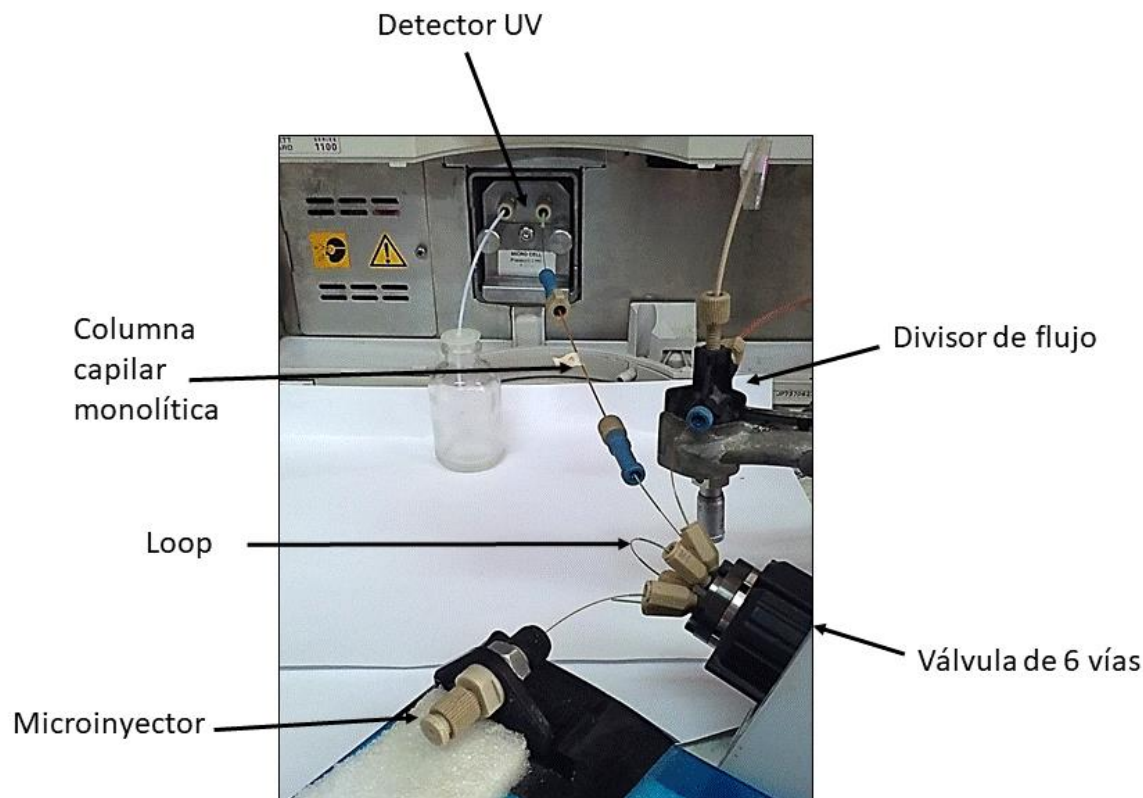


Figura II.8: Fotografía del equipo de HPLC convencional adaptado a escala miniaturizada.

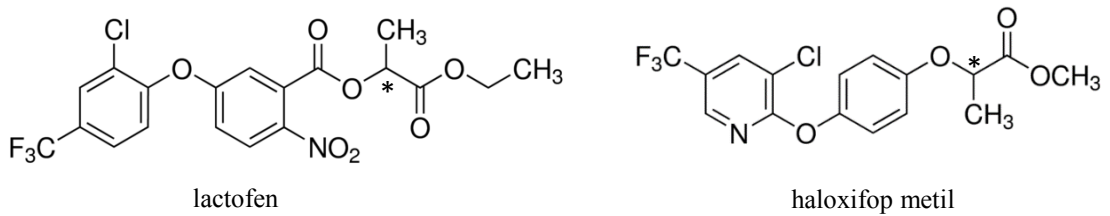
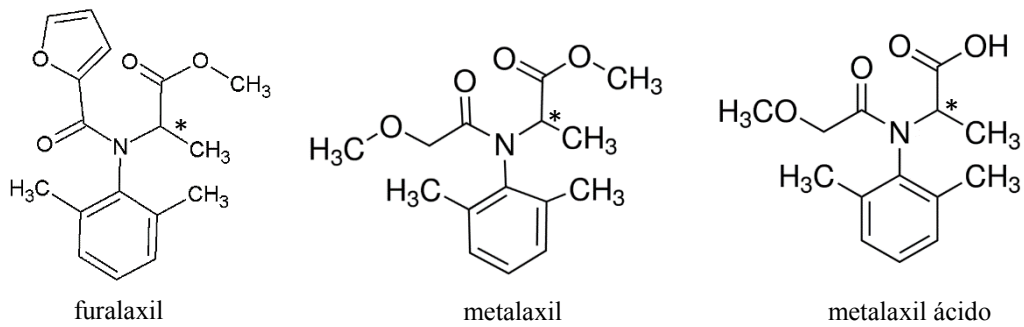
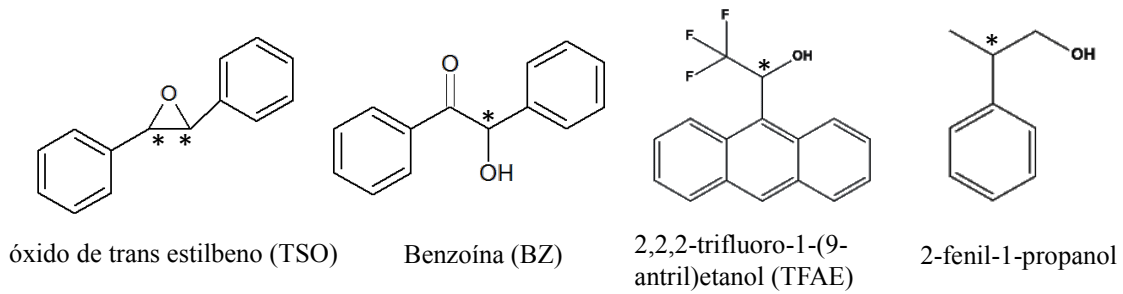
Dadas las dimensiones y la fragilidad de la columna la conexión en el equipo debió ser muy cuidadosa para evitar rupturas y/o pérdida de líquido. Se equilibró con la fase móvil a temperatura ambiente durante 60 minutos, aplicando un caudal de 0,08 mL/min, ajustado desde la bomba binaria.

Las separaciones cromatográficas en fase inversa se realizaron empleando metanol grado HPLC (J.T. Baker, México) y agua desionizada MilliQ (Millipore).

Para las separaciones quirales se empleó el modo normal de cromatografía de líquidos (NP-HPLC), utilizando mezclas de n-hexano grado HPLC (Merck, Alemania) y

2-propanol grado HPLC (Sintorgan, Argentina). Como aditivos ácidos de la fase móvil se emplearon ácido trifluoroacético (99%, Reidel-de Haën) y ácido fórmico (85%, Sigma-Aldrich, Alemania), y como aditivo básico se utilizó dietanolamina (98%, Fluka, Alemania).

Las estructuras químicas de los analitos racémicos estudiados [9-10], se muestran en la Figura II.9. Soluciones de 1000 ppm de todos los analitos racémicos se prepararon en el mismo solvente de la fase móvil.



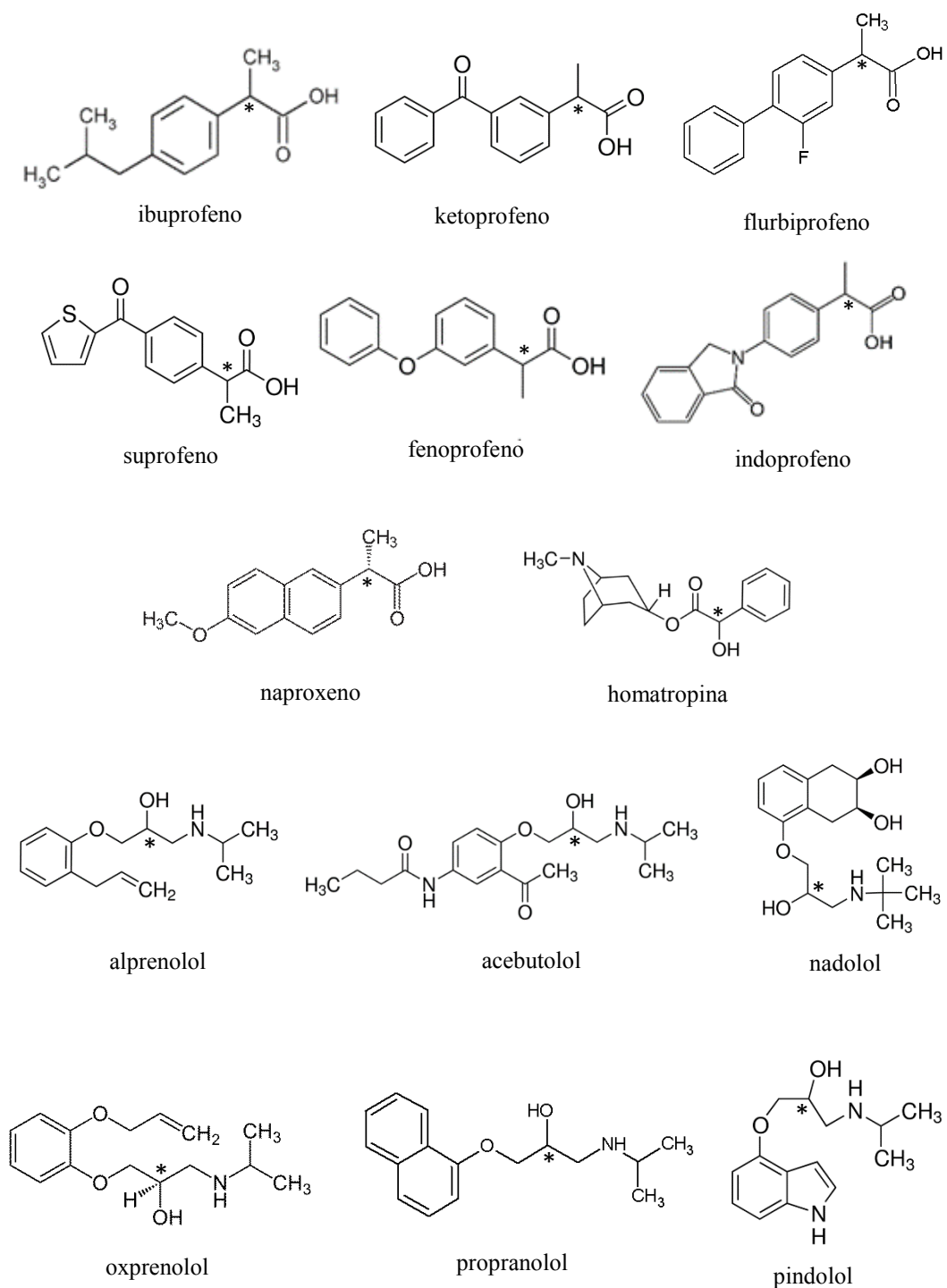


Figura II.9: Estructura química de los analitos quirales utilizados. El centro quiral se indica con “*”.

II.3.5. Referencias

1. Yu, C., Davey, M. H., Svec, F., Fréchet, J. M. J., *Anal. Chem.* (2001), 73, 5088–5096.
2. Perrin, D. D., Armarego W. L. F., *Purification of laboratory chemicals*, 6^{ta} edición, Pergamon Press, Oxford, (1988).
3. Lämmerhofer, M., Peters, E.C., Yu, C., Svec, F., Fréchet, J. M. J., Linder W., *Anal. Chem* (2000), 72, 4614-4622.
4. Lämmerhofer, M., Peters, E.C., Yu, C., Svec, F., Fréchet, J. M. J., Linder W., *Anal. Chem* (2000), 72, 4623-4628.
5. Svec F., Geiser, L., *LC column technology supplement*, (2006), 22–27.
6. Ling., F., Brahmachary, E., Xu, M., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *J. Sep. Sci.* (2003), 26, 1337-1346.
7. Liu, Y., Zou, H., *J. Chromatogr. A.* (2008), 1178, 118-125.
8. Ikai, T., Yamamoto, C., Kamigaito, M., Okamoto, Y., *Polymer Journal Review* (2006), 38, 91–108.
9. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/search.cgi>
10. <https://www.drugbank.ca/>

II.4. Resultados y discusión

La introducción de fases estacionarias monolíticas en las separaciones a escala miniaturizada utilizando columnas capilares, resulta muy atractiva en química analítica dado que permite alcanzar alta eficiencia y sensibilidad, menor tiempo de análisis, utilizar menor cantidad de muestra y menor consumo de solventes.

Las separaciones quirales constituyen un gran desafío para los métodos de separación convencionales. Los polisacáridos ocupan un lugar único como selectores quirales, permitiendo la enantioseparación de un gran número de compuestos, ya sea adsorbidos y/o ligados al soporte.

II.4.1. Preparación de las columnas monolíticas poliméricas

II.4.1.1. Composición de la mezcla de polimerización

La mayor parte de las publicaciones que se ocupan del desarrollo de columnas monolíticas se centran en la optimización de la composición de la mezcla de polimerización. Se evalúan factores tales como la composición y concentración de los solventes porogénicos, el entrecruzante, el tipo de monómero funcional y el tipo de iniciador. Estas variables han demostrado tener influencia sobre las propiedades porosas de los monolitos y por consiguiente, en su rendimiento cromatográfico [1,2]. En el caso de la elección del monómero funcional, los restos hidrófobos son necesarios para la cromatografía en fase inversa, los grupos ionizables deben estar presentes para la separación en el modo de intercambio iónico, los grupos con una reactividad específica son necesarios para los modos de afinidad, y las enantioseparaciones requieren selectores quirales.

Además de la selección de monómeros, se puede obtener la química superficial deseada incorporando aditivos a la mezcla de polimerización (por ejemplo, nanopartículas) o derivatizando la superficie del monolito después de la polimerización. Los monómeros funcionales GMA y HEMA se han utilizado para controlar la polaridad de la superficie, así como para derivatizar el lecho monolítico [3].

En este trabajo, se utilizó HEMA como monómero funcional hidrofílico para la fabricación de las CCMQs, dado que la presencia de grupos hidroxilo en el lecho

monolítico podría favorecer la adsorción del selector quiral *tris*(3,5-dimetilfenil) carbamato de celulosa a través de interacciones puente H, además de las dispersivas y dipolares. En este sentido, se tomó como punto de partida, una relación de composición nominal de monómeros/solventes (40/60 %p/p) utilizada por Lämmerhofer *y col.* [4].

Como se mencionó anteriormente, uno de los factores que permite controlar la morfología y porosidad de los monolitos es la mezcla de solventes porogénicos, ya que afecta a la solvatación de las cadenas de polímero durante las primeras etapas de la polimerización [2,5]. En el caso de usar disolventes menos solvatantes, como resultado se obtienen poros más grandes debido a un inicio más temprano en la separación de fases del polímero [6].

En este sentido, se estudió el efecto que produce la relación de solventes porogénicos en las propiedades estructurales, morfológicas y cromatográficas de las columnas monolíticas. Como primera instancia, los monolitos se prepararon con dos mezclas binarias distintas de solventes porogénicos como se indica en la Tabla II.3. Se pesaron las cantidades especificadas de cada reactivo en tubos eppendorf (monolitos en “*bulk*”), para observar de manera directa la polimerización de las distintas mezclas, siguiendo el procedimiento descrito en la Sección Experimental del Capítulo II.

Tabla II.3: Composición de las mezclas estudiadas en *bulk*, para la preparación de los monolitos conteniendo valores nominales de 24% p/p de HEMA, 16% p/p de EDMA; variando el tipo y relación de solventes orgánicos (60% p/p); y 0,3%p/p de LPO a T = 70 °C durante 20 hs.

Mezclas	Monómeros (% p/p)		Solventes porogénicos (% p/p)		Iniciador térmico (% p/p)
	HEMA	EDMA	1-propanol	1,4-butanodiol	LPO
M 1	23,85	16,03	44,81	14,84	0,36
M 2	23,86	15,97	49,89	9,91	0,36
M 3	23,99	15,90	41,62	18,15	0,35
Mezclas	Monómeros (% p/p)		Solventes porogénicos (% p/p)		Iniciador térmico (% p/p)
	HEMA	EDMA	1-dodecanol	ciclohexanol	LPO
M 1*	24,11	16,07	44,97	14,49	0,36
M 2*	23,97	15,83	50,08	9,74	0,37
M 3*	23,64	16,06	41,86	18,05	0,36

Las mezclas en las que se emplearon como porógenos distintas proporciones de 1-propanol/1,4-butanodiol, manteniendo las mismas condiciones de reacción, mostraron una polimerización incompleta del monolito al tiempo estipulado, observándose a simple vista una leve película líquida que envolvía al polímero; mientras que las mezclas 1-dodecanol/ciclohexanol, manteniendo las mismas relaciones de composiciones, dieron una completa polimerización.

Para evaluar si el proceso de polimerización transcurría de la misma manera que en los tubos eppendorf, todas las mezclas estudiadas en “*bulk*” (Tabla II.3) se ensayaron en capilares de 400 μm d.i. Los monolitos obtenidos fueron observados por medio de una lupa binocular, de manera de determinar si la polimerización había sido completa a lo largo de toda la columna (ausencia de espacios vacíos).

Las mezclas que contenían 1-propanol/1,4-butanodiol dieron una formación irregular del monolito dentro de los capilares. Como puede observarse en la Figura II.10, estas mezclas presentaron una incompleta polimerización dando un aspecto tipo gel, por lo que fueron excluidas del estudio. En comparación, las mezclas mostradas en la Figura II.11 presentaron una formación homogénea y completa del monolito dentro del capilar.

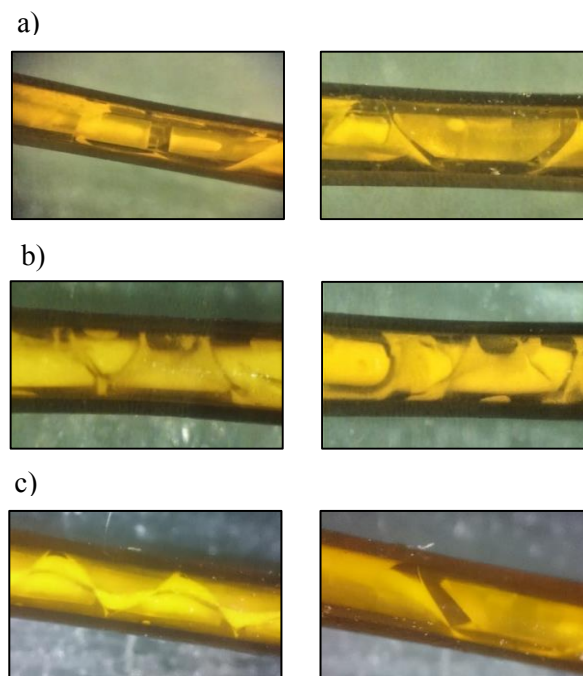


Figura II.10: Fotografías de las columnas capilares monolíticas obtenidas a partir de las mezclas M1(a), M2(b) y M3(c) de Tabla I. 4.

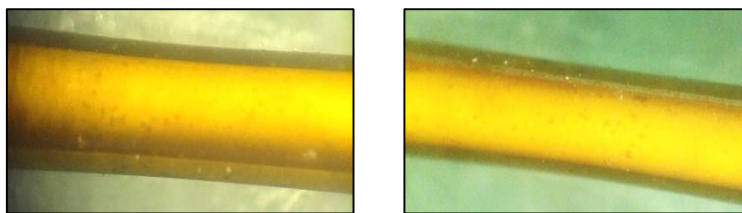


Figura II.11: Fotografía de la CCM obtenida a partir de la mezcla M1* de la Tabla I.4 en la que se observa polimerización completa.

De los resultados mostrados podemos concluir que la elección de la mezcla porogénica es crucial para la formación del monolito orgánico. Siendo la solubilidad, el parámetro clave para la selección de los porogénos, debido a que interviene en la solvatación, la miscibilidad y el hinchamiento de estos polímeros [7].

II.4.1.2. Fabricación de las CCMs

En base al estudio previo de elección del sistema porogénico, se emplearon mezclas con 1-dodecanol y ciclohexanol para la optimización de las propiedades morfológicas del soporte monolítico. Para ello, se varió el porcentaje de 1-dodecanol en la mezcla binaria desde un 30 hasta un 55%p/p (Tabla II.4), manteniendo constante el porcentaje de HEMA, EDMA y LPO.

Tabla II.4: Composición de las mezclas poliméricas utilizadas en la preparación de las columnas monolíticas.

Mezclas	Monómeros (% p/p)		Solventes porogénicos (% p/p)		Iniciador (%p/p)
	HEMA	EDMA	1-dodecanol	ciclohexanol	LPO
M 5	23,81	16,19	29,77	29,70	0,31
M 6	23,83	16,28	34,60	25,18	0,31
M 7	23,76	15,86	37,69	21,91	0,34
M 8	24,18	15,95	39,63	19,91	0,32
M 9	23,81	16,06	41,47	17,94	0,31
M 10	24,12	16,07	44,97	14,49	0,36
M 11	23,98	15,83	50,08	9,74	0,37
M 12	23,98	15,77	54,55	4,89	0,35

Se emplearon capilares de 10 cm de largo y 400 μm d.i. (previamente tratados como se indica en la Sección II.3.1.1). Empleando las mezclas porogénicas de la Tabla II.4, se llevó a cabo la polimerización obteniéndose en todos los casos un lecho monolítico completo y uniforme.

II.4.1.3. Caracterización de las CCMs

Para llevar a cabo la optimización de la mezcla porogénica, a las distintas columnas monolíticas poliméricas obtenidas se les determinaron las propiedades morfológicas y cromatográficas.

Microscopia electrónica de barrido

Se utilizó microscopia electrónica de barrido (SEM) con el fin de observar si el monolito estaba bien adherido a la pared del capilar, como así también para tener una primera aproximación de la estructura porosa obtenida. Para la obtención de las imágenes se utilizó el modo de alto vacío. Para ello, fue necesario realizar un lavado de las columnas

monolíticas haciendo circular metanol, por medio del equipo HPLC adaptado a escala miniaturizada.

Se cortaron secciones de aproximadamente 1cm de las columnas a estudiar y se las insertó verticalmente en septas de goma para poder analizar la sección transversal del lecho monolítico (Figura II.12). Posteriormente, fueron cubiertas con una fina capa de oro, para permitir obtener imágenes de mejor calidad. Los análisis se hicieron con aumentos de 400, 1600, 3000 y 9000X, permitiendo observar las diferencias morfológicas que producen las distintas mezclas.

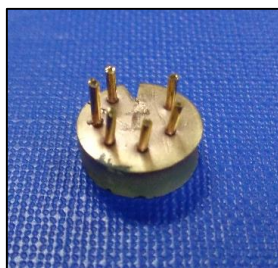


Figura II.12: Fotografía de las columnas monolíticas preparadas para ser observadas mediante SEM.

En la Figura II.13, se pueden observar imágenes SEM de las columnas monolíticas poliméricas obtenidas empleando las mezclas detalladas en la Tabla II.4. En todos los casos se observa una la estructura típica de monolitos poliméricos orgánicos, con los característicos glóbulos en forma de racimos. Las micrografías de las columnas presentan una clara diferencia en las propiedades morfológicas, observándose que mientras aumenta el porcentaje de 1-dodecanol en la mezcla porogénica (1-dodecanol/ciclohexanol), los glóbulos se hacen más grandes y compactos.

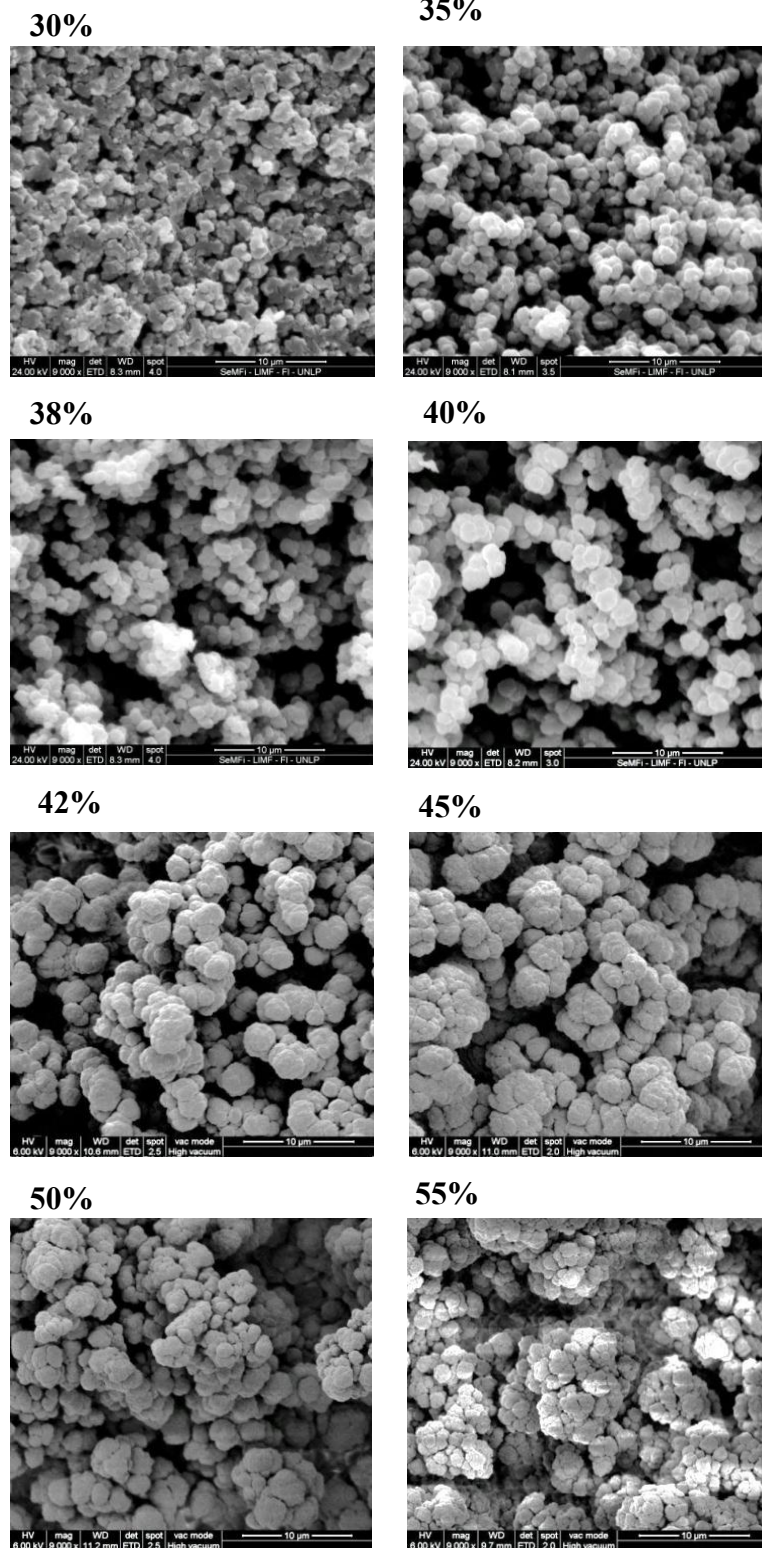


Figura II.13: Fotografías SEM de cortes transversales de columnas obtenidas variando el porcentaje de 1-dodecanol en la mezcla M5 (30%p/p) a la M12 (55%p/p). Fotografías tomadas con una ampliación de 9000X.

Esto puede interpretarse en base a la capacidad de solvatación de los dos solventes porogénicos. El efecto de agregar un menor contenido del solvatante “*más pobre*” (1-dodecanol) da lugar a una competencia entre el mejor solvatante (ciclohexanol) con los monómeros en la solvatación de los núcleos. Por lo que, la separación de fases es tardía generando glóbulos más pequeños. Como resultado, los polímeros formados tienen mesoporos. A medida que se incrementa el contenido de 1-dodecanol al sistema de polimerización se obtiene como resultado una separación de fases más temprana del polímero. En general, los glóbulos que se forman en un sistema de este tipo son más grandes y los vacíos entre ellos (poros) también lo son [10].

Como conclusión de lo observado anteriormente, el tamaño de los glóbulos y, por ende, la porosidad total del lecho monolítico va a depender en gran medida de la naturaleza del sistema porogénico [2,8].

En la Figura II.14 se muestran dos columnas capilares obtenidas a partir de la mezcla M7 (38%p/p 1-dodecanol). Se puede observar que ambos lechos monolíticos están adheridos a la pared del capilar. Lo mismo se pudo observar con las demás mezclas.

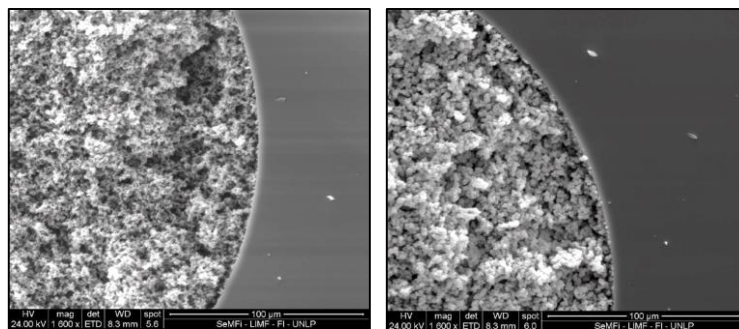


Figura II.14: Adhesión del monolito M7 (38%p/p 1-dodecanol) al capilar de sílice (ampliación 1600X) observada a través de micrografías SEM.

Sin embargo, en la mezcla M5 conteniendo un 30%p/p de 1-dodecanol se observó una cavidad entre el lecho monolítico y la pared del capilar (Figura II.15). Esto puede deberse a una contracción del lecho. Si bien, en algunos trabajos se describe el mecanismo de formación de poros durante el proceso de polimerización, no se explica completamente

el proceso de contracción radial y longitudinal que se observan en los distintos moldes [8,9].

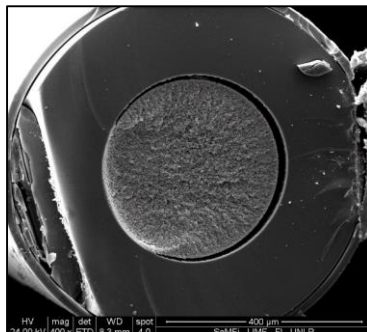


Figura II.15: Micrografía SEM observando un monolito no adherido a la pared del capilar (ampliación 400X).

Permeabilidad cromatográfica

La permeabilidad del lecho debe ser alta para poder conducir la fase móvil rápidamente a través de la columna y así disminuir los tiempos de análisis y, además, evitar generar altas presiones en el sistema. Esto puede lograrse con materiales monolíticos que contengan poros grandes, aunque de esta forma también disminuye el área superficial [10,11] que necesitamos para tener factores de retención aceptables.

Se determinaron las permeabilidades de las columnas monolíticas utilizando una mezcla de MeOH/agua 80/20 %v/v como fase móvil. Se estudió este comportamiento sólo en las columnas que mostraron una permeabilidad suficientemente alta durante el lavado. Esto ocurrió con aquellas columnas fabricadas con un porcentaje de 1-dodecanol entre 35 y 55% p/p en la mezcla de polimerización.

El procedimiento experimental para la determinación se detalló en la Sección II.3.1.5.2. de este capítulo. Se determinaron los factores de permeabilidad cromatográfica (B_0) para todas las columnas monolíticas preparadas empleando la ecuación de Darcy (Ec. 4).

Si bien los monolitos poliméricos orgánicos pueden presentar diferencias en la solvatación según la FM empleada, y en consecuencia puede haber variación en el tamaño de los poros y por lo tanto en la permeabilidad (B_0), el objetivo de esta Sección fue estudiar la variación relativa de la misma en función de la composición de la mezcla porogénica utilizada en la preparación del monolito.

En la Figura II.16, se grafica la ecuación de Darcy para los monolitos obtenidos con las distintas composiciones de solvente porogénico y en Tabla II.5 se muestran los valores obtenidos de permeabilidad para cada CCMs.

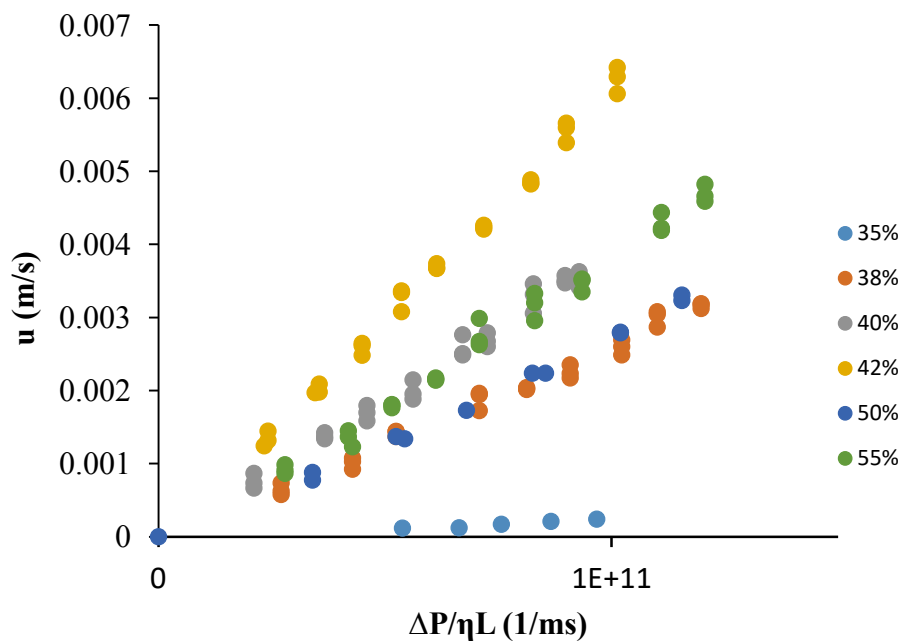


Figura II.16: Gráficos de la ecuación de Darcy para las columnas obtenidas con distinta composición de la mezcla porogénica, fase móvil empleada MeOH/agua 80/20 v/v.

Estos valores muestran un máximo de permeabilidad ($B_0=6,9 \times 10^{-14} \text{ m}^2$) en la mezcla que contiene 42% de 1-dodecanol. Esta columna se pudo operar con el flujo más alto (47 $\mu\text{L}/\text{min}$) con una caída de presión $\Delta P=120 \text{ bar}$. Esta presión no es tan grande si consideramos que la columna es capilar (400 μm), con una longitud de 10 cm y que la

viscosidad de la fase móvil es alta. Por lo tanto, el monolito fabricado presenta una permeabilidad que es en promedio 10 veces más alta, en comparación con las columnas convencionales particuladas de 5 μm .

Tabla II.5: Datos obtenidos de permeabilidad cromatográfica de las distintas CCMs.

	Mezclas de polimerización % (p/p)				$Bo(m^2)10^{-14}$
	HEMA	EDMA	1-dodecanol	ciclohexanol	
M5	23,81	16,19	29,77	29,70	n.r.
M6	23,83	16,28	34,60	25,18	0,2
M7	23,76	15,86	37,69	21,91	2,6
M8	24,18	15,95	39,63	19,91	3,7
M9	23,81	16,06	41,47	17,94	6,9
M10	24,12	16,07	44,97	14,49	2,5
M11	23,98	15,83	50,08	9,74	2,3
M12	23,98	15,77	54,55	4,89	3,6

*n.r (no registrado)

En la Figura II.17, se observa la relación entre las permeabilidades obtenidas en función del contenido de 1-dodecanol en la mezcla de polimerización: la permeabilidad aumenta con el contenido de 1-dodecanol en la mezcla de polimerización hasta alcanzar el valor máximo correspondiente a un 42%p/p de 1-dodecanol. Este comportamiento se debe que el aumento del contenido de 1-dodecanol, genera poros cada vez más grandes como consecuencia de la temprana separación de fases del polímero, como se explicó en la sección II.4.1.3. (pág.79).

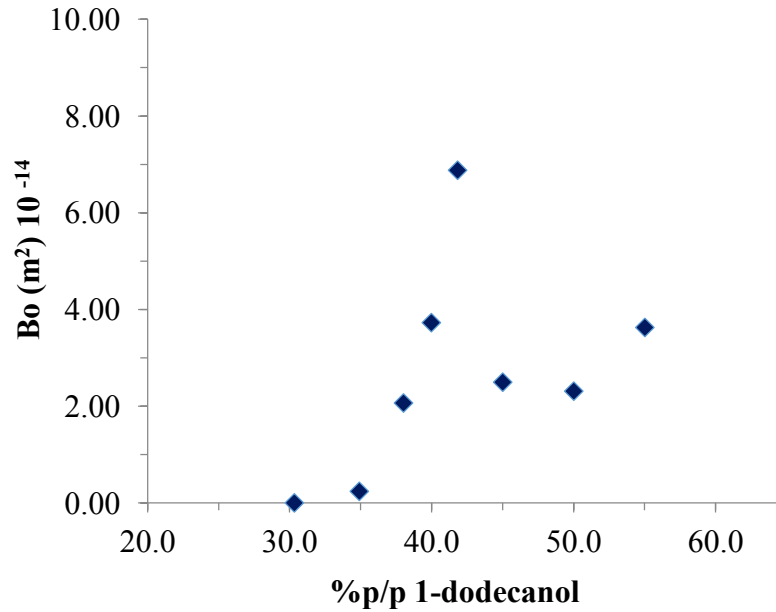


Figura II.17: Efecto del aumento del contenido de 1-dodecanol en la permeabilidad de las distintas columnas capilares poliméricas.

Sin embargo, para las columnas con 45 a 55%p/p de 1-dodecanol, se observa que la permeabilidad disminuye. La causa de esta disminución no está clara, pero podría deberse, como sugieren algunos autores a algún cambio en el mecanismo de polimerización por el cual se obtendrían aglomerados en el lecho monolítico [7].

Observando las micrografías SEM correspondientes para cada columna, se puede corroborar que la morfología macroporosa coincide con la tendencia en los datos de permeabilidad obtenidos.

Adsorción/desorción de nitrógeno

Dado que es imposible aplicar la técnica de adsorción/desorción de nitrógeno directamente a las CCMs, las características morfológicas obtenidas mediante esta técnica se obtuvieron a partir de monolitos sintetizados en eppendorf (*bulk*). Se lavaron mediante Soxhlet, se secaron en estufa y se trituraron para su análisis final, como se indicó en la sección experimental II.3.1.5.1. Es importante aclarar que un lavado por otros métodos,

tales como sonicación o permeación directa del solvente, no fue suficiente para extraer completamente los restos de monómeros que quedaron retenidos en los poros del material, por lo que únicamente la técnica Soxhlet fue eficiente para este fin.

En la Figura II.18 a), se muestran comparativamente los gráficos de las isotermas de adsorción-desorción de todas las muestras. Para mayor claridad en la Figura II.18 b), se muestra un gráfico expandido para muestras con un contenido de 1-dodecanol mayor al 40%p/p.

Del análisis de los mismos, y de las Figuras I.12 B y I.13, se puede observar que las isotermas son similares y corresponden al Tipo II, es decir, son características de materiales sólidos de baja porosidad relativa, con meso/macroporosidad y ausencia de microporos.

En los gráficos mostrados se puede observar que a medida que disminuye el contenido de 1-dodecanol en la mezcla de polimerización, se incrementa el volumen de nitrógeno adsorbido dentro de la estructura meso/macroporosa desde 3 a 140 cm³STP/g, es decir, que disminuyen los macroporos y aumentan los mesoporos con el consecuente aumento de la porosidad. Para el rango entre 20 y 42% p/p 1-dodecanol estos datos concuerdan con las imágenes SEM y los datos de permeabilidad cromatográfica.

Las propiedades morfológicas mostradas en la Tabla II.6, indican que empleando el procedimiento propuesto en la presente Tesis para fabricar monolitos de metacrilato, es posible controlar el tamaño de poro o las áreas superficiales seleccionando apropiadamente la composición de la mezcla porogénica.

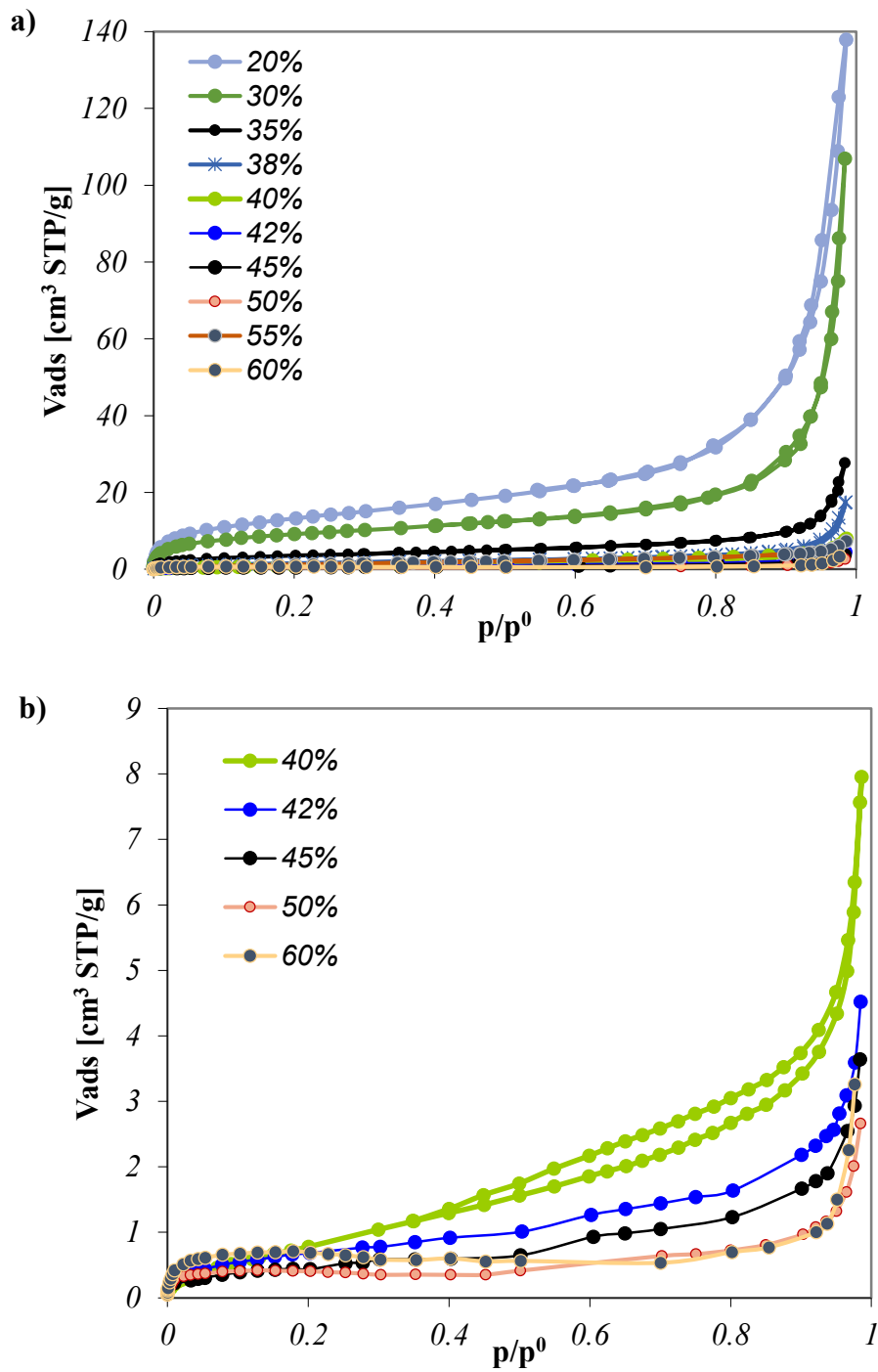


Figura II.18: a) Gráficos comparativos de adsorción-desorción de N_2 para todas las mezclas polimerizadas en *bulk* con diferente contenido de 1-dodecanol, b) gráfico expandido para las muestras con un contenido superior al 40%p/p de 1-dodecanol.

Tabla II.6: Propiedades morfológicas de los monolitos obtenidos en “bulk” a partir de las distintas mezclas de polimerización determinadas mediante adsorción-desorción de N₂.

Mezclas	Mezcla de polimerización % (p/p)*				Sg ^a [m ² /g]	Vtp ^b [mL/g]
	HEMA	EDMA	ciclohexanol	1-dodecanol		
M4	23,88	16,18	40,13	20,99	37,00	0,20
M5	24,47	16,19	31,65	29,37	27,00	0,15
M6	24,91	15,87	24,93	36,28	10,00	0,039
M7	23,88	16,29	22,35	39,07	6,00	0,024
M8	23,76	15,83	20,03	41,33	2,00	0,011
M9	24,49	15,93	18,07	42,19	2,00	0,006
M10	23,61	16,18	14,89	44,90	1,00	0,005
M11	24,00	15,90	10,10	50,00	2,00	0,004
M12	24,20	15,90	4,90	55,00	2,00	0,010
M13	23,97	15,83	0,00	60,27	3,00	0,004

*0,3%p/p LPO.

^a Sg (área específica calculada con BET $0.05 < p/p_0 < 0.35$);

^b Vtp (volumen total de poro determinado por la regla de Gurvich)

Porosimetría de intrusión de mercurio

Como la técnica de adsorción/desorción de nitrógeno no es destructiva y la técnica MIP podría serlo si la presión que se aplica a las muestras es muy alta, se realizaron primero los análisis BET y posteriormente, los análisis MIP a las mismas muestras.

En este caso, cada muestra fue colocada en un penetrómetro que fue introducido en el equipo. El proceso consiste en dos etapas sucesivas de intrusión del mercurio. En la primera, sólo se introduce el mercurio hasta una presión que se corresponde con el llenado de los macroporos de la muestra. En la segunda etapa, al picnómetro se lo somete a una mayor presión, para que ingrese el Hg hasta los mesoporos del polímero.

En la Figura II.19, se muestran los gráficos correspondientes a la distribución de tamaño de poro de los distintos monolitos poliméricos sintetizados en “bulk”.

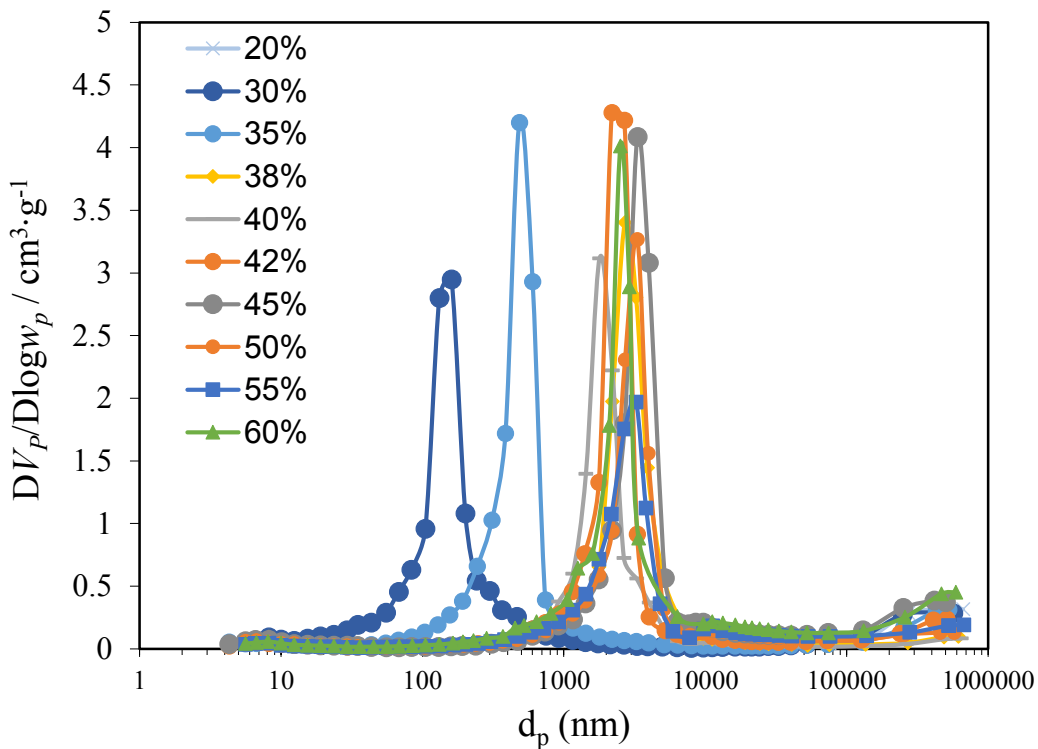


Figura II.19: Distribución de tamaño de poro para las mezclas estudiadas en función del contenido de 1-dodecanol.

Estos gráficos muestran la derivada primera del volumen de poro (V_p) respecto del logaritmo del diámetro de poro, $\log d_p$, para abarcar en la misma escala los poros más pequeños y los más grandes. El gráfico de la derivada primera permite definir más claramente la distribución de tamaño de los diferentes poros que si se graficara directamente V_p vs. $\log d_p$.

En la Figura II.20 se grafica el valor máximo obtenido de la distribución de los diámetros de poro para los diferentes monolitos en función del contenido de 1-dodecanol en la mezcla porogénica. Se puede observar que, a medida que aumenta el contenido de 1-dodecanol, se incrementa el diámetro de los poros en la estructura del monolito hasta un 45%p/p de dicho solvente y luego hay una pequeña disminución. Esta tendencia coincide con lo observado en el estudio de la permeabilidad cromatográfica, B_o , donde se observa (ver Figura II.17) que la permeabilidad baja con un 45%p/p de 1-dodecanol.

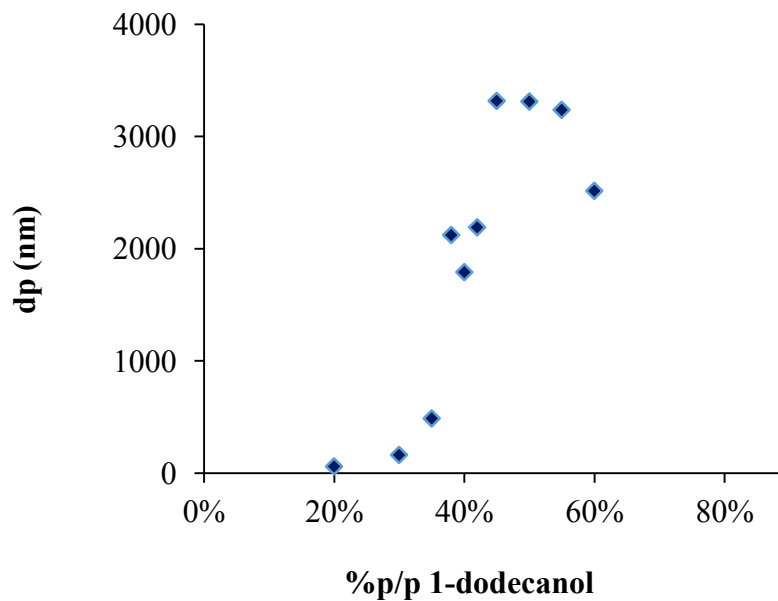


Figura II.20: Efecto del contenido de 1-dodecanol en el diámetro de poro de los distintos monolitos.

Tanto en estado seco (técnicas BET y MIP) como en estado solvatado con una mezcla de metanol/agua (determinación de B_o), se observa la misma tendencia en términos de porosidad en función de la composición de la mezcla porogénica.

Es importante aclarar que la polimerización térmica de la mezcla en *bulk* es diferente a la obtenida en el capilar, debido a que la transferencia de calor depende del tamaño, geometría y material del molde en el que se realiza la reacción de polimerización. En este sentido, los datos obtenidos mediante MIP o BET (monolitos en *bulk*) pueden no reflejar exactamente la morfología del lecho sintetizado dentro del capilar.

En la Tabla II.7, se resumen los datos obtenidos para las propiedades morfológicas determinadas por la técnica MIP para todas las muestras monolíticas. En todos los casos la porosidad total es aproximadamente 60%, esto concuerda muy bien con la composición de la mezcla de polimerización utilizada en todos los casos (40% monómeros/60% porogénos) [8].

Se observa una disminución inicial (hasta 40%p/p) en la superficie específica de los materiales monolíticos con el incremento de 1-dodecanol. A diferencia de los datos obtenidos por BET (que permiten determinar las áreas de los micro/mesoporos), estas áreas presentan valores entre los 11 y los 68 m²/g, indicándonos conjuntamente la contribución en el área superficial específica de los mesoporos y los macroporos.

Con un aumento progresivo del contenido de 1-dodecanol, el tamaño promedio de diámetro de poro va incrementando, como se observó en la sección II.4.1.3. para la técnica BET.

Podemos concluir que para el análisis del sistema poroso se debe tener en cuenta ambas técnicas MIP y adsorción/desorción de nitrógeno. Aunque empleen diferentes procesos físicos, estas técnicas son complementarias para determinar de las propiedades morfológicas de este tipo de materiales monolíticos.

Tabla II.7: Propiedades morfológicas de los monolitos obtenidos en “bulk” a partir de las distintas mezclas de polimerización determinadas mediante MIP.

Mezclas	Mezcla de polimerización % (p/p)*				Sg ^a [m ² /g]	Vp ^b [mL/g]	P ^c [%]	dp ^d [nm]
	HEMA	EDMA	ciclohexanol	1-dodecanol				
M4	23,88	16,18	40,13	20,99	51,6	1,26	54	54
M5	24,47	16,19	31,65	29,37	68,2	1,39	53	161
M6	24,91	15,87	24,93	36,28	34,3	1,50	65	486
M7	23,88	16,29	22,35	39,07	19,0	1,26	60	2704
M8	23,76	15,83	20,03	41,33	12,2	1,08	64	1789
M9	24,49	15,93	18,07	42,19	19,6	1,43	64	2190
M10	23,61	16,18	14,89	44,90	24,7	1,54	67	3317
M11	24,00	15,90	10,10	50,00	15,1	1,18	60	3309
M12	24,20	15,90	4,90	55,00	11,2	1,07	54	3238
M13	23,97	15,83	0,00	60,27	15,2	1,55	64	2513

*0,3%p/p LPO

^a Sg (área específica); ^b Vp (volumen de poro);

^c P (porosidad total); ^d dp (diámetro de poro en el máximo de la curva de distribución).

II.4.2. Síntesis del selector quiral

La síntesis del derivado de celulosa que se empleará en la fabricación de la FEQ se realizó dos veces utilizando 3,5-dimetilfenilisocianato como reactivo derivatizante y piridina anhidra como solvente de reacción [13,14].

En Figura II.21, se muestran fotografías de las etapas de síntesis. En la primera etapa (Figura II.21 a), se puede observar la mezcla a reflujo de la celulosa microcristalina y del solvente de reacción (piridina). En Figura II.21 b) se observa luego del agregado de 3,5-dimetilfenilisocianato y 12 hs de reacción, una solución viscosa color ámbar. Por último, se mezcló la solución obtenida con MeOH generándose un precipitado blanco, correspondiente al derivado *tris*(3,5-dimetilfenil) carbamato de celulosa (CDMPC) (Figura II.21 c).

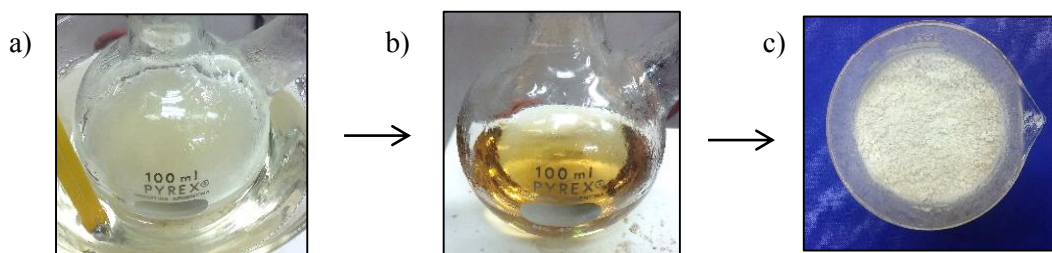


Figura II.21: Esquema de las etapas de la síntesis: a) balón de dos bocas, conteniendo celulosa microcristalina disuelta en piridina; b) mezcla de reacción viscosa color ámbar obtenida a partir del agregado de 3,5-dimetilfenilisocianato; c) sólido blanco de CDMPC.

II.4.2.1. Caracterización del producto

La celulosa es un polisacárido natural constituido por una larga cadena de peso molecular variable, con fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$ (valor de “n” entre 200 y 300) formada por la unión de moléculas de β -D-glucosa mediante enlaces β -1,4-O-

glucosídicos. Tiene una estructura lineal, en la que se establecen múltiples enlaces de puentes de hidrógeno entre las distintas cadenas, haciéndola insoluble en agua y en distintos solventes orgánicos. Sin embargo, los derivados de fenilcarbamato de celulosa son solubles en ciertos solventes orgánicos, como consecuencia de la incorporación de grupos fenilo a la estructura original del polisacárido [14].

Esta diferencia de solubilidad entre la celulosa nativa y su derivado puede utilizarse en principio, como un indicio de que la reacción de derivatización se ha producido. En la Tabla II.8 se muestran los resultados de los ensayos de solubilidad realizados sobre las muestras de CDMPC obtenidas en las dos reacciones de síntesis realizadas.

Tabla II.8: Determinación de la solubilidad de las muestras de CDMPC en distintos solventes orgánicos.

Solventes	<i>Solubilidad</i>		
	celulosa	CDMPC-1	CDMPC-2
MeOH	-	-	-
IPA	-	-	-
Tolueno	-	+ -	+
Acetona	-	+ -	+
Cloroformo	-	+	+
THF	-	+	+

Para la confirmación de la estructura química del producto obtenido, se realizaron estudios de análisis elemental (C, H, N y por diferencia O) y espectroscopia infrarroja FTIR. En la Tabla II.9 se detallan los resultados obtenidos para el análisis elemental.

Tabla II.9: Resultados del análisis elemental del derivado de celulosa, realizado por duplicado.

Producto	muestra (mg)	% C	% H	% N	% O	Fórmula Molecular
CDMPC 1	0.871	63,87	6,32	6,92	22,89	C ₃₃ H ₃₉ N ₃ O ₉
	0.947	63,54	6,41	6,75	23,30	
CDMPC 2	1.364	64,54	6,08	6,77	22,61	C ₃₃ H ₃₇ N ₃ O ₈
	1.340	64,54	6,13	6,64	22,69	

Estos resultados indican que se ha incorporado el 3,5-dimetilfenilisociano al polímero de celulosa. El rendimiento de la reacción fue del 72% para la primera síntesis del selector quiral (CDMPC-1) y un 87% para la segunda síntesis (CDMPC-2). Como se observa en la Tabla II.9 las fórmulas moleculares son diferentes para ambos productos. El derivado obtenido en la primera síntesis (CDMPC-1) podría estar hidratado al momento del análisis elemental, razón por la cual en la fórmula molecular determinada para el mismo se encuentra que contiene adicionalmente, una molécula de agua (un átomo más de O y dos átomos más de H) [13,14, 26].

En cuanto al análisis de los espectros IR, se comparó el espectro obtenido para el producto CDMPC con el espectro de la celulosa de partida (celulosa microcristalina AVICEL PH 101) (Figura II.22). Para evitar la interferencia de las bandas de absorción de agua, las muestras se secaron en estufa a 50°C durante 48 hs y se prepararon las pastillas a presión usando KBr como soporte en un pastillero de acero inoxidable. Las muestras fueron colocadas en el porta-muestras vertical para pastilleros adquiriendo 32 barridos en modo de transmisión.

En el segundo espectro de IR, perteneciente al producto de la reacción, se observan las siguientes bandas características de absorción: (>C=O) 1750 cm⁻¹; (N-H) 3310 cm⁻¹, correspondientes a esos grupos funcionales presentes en CDMPC que no están en la celulosa de partida. Además, se observa que la banda de absorción a 3500 cm⁻¹ correspondiente a los grupos OH de la celulosa [15] se encuentra modificada, indicando que al menos algunos grupos OH han reaccionado con el reactivo derivatizante (Tabla II.10).

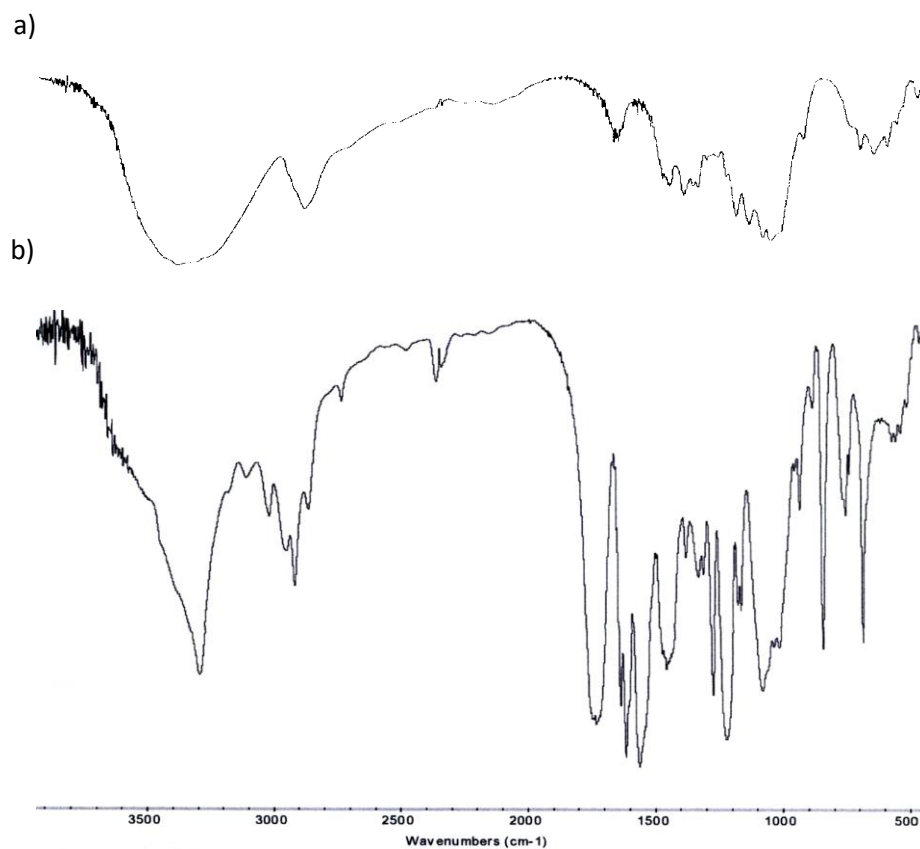


Figura II.22: Espectros IR comparativos de a) celulosa y b) su derivado CDMPC.

Tabla II.10: Asignación de picos de IR correspondientes a celulosa y su derivado.

Número de onda (cm^{-1})	Asignación	
	Celulosa	CDMPC 1-2
3600-3200	-OH	
3500-3300		-NH-
3000-2800	-CH ₂ -	-CH ₂ -
1750-1735		>C=O

II.4.3. Funcionalización de las CCMs con el selector quiral

Con la finalidad de realizar el depósito del selector quiral, se seleccionaron aquellas columnas monolíticas que mostraban buena permeabilidad cromatografía (B_0) y una adecuada estructura de los macro/mesoporos (volumen y diámetro de los poros) para poder introducir el derivado de polisacárido.

La celulosa microcristalina Avicel utilizada en este caso tiene un número de polimerización entre 200 a 300 unidades. Si consideramos como 300 el grado máximo de polimerización y que cada unidad de CDMPC tiene un largo aproximado de 0,5 nm, el tamaño total del derivado de celulosa tendría 150 nm de largo, aproximadamente [32]. Para que el selector quiral tenga libre acceso a los poros del monolito, estos deberían tener un tamaño 10 veces mayor al del selector quiral, lo cual da un tamaño mínimo de 1500 nm. Por lo tanto, se seleccionaron monolitos que fueron obtenidos a partir de la mezcla M7 (38%p/p de 1-dodecanol). Estos monolitos poseen un tamaño de poro promedio de 2700 nm, tamaño suficiente para permitir el libre ingreso de CDMPC. Estos monolitos, además poseen buena permeabilidad ($B_0 \sim 3 \times 10^{-14} \text{ m}^2$) y un área superficial de unos 19 m^2/gr .

El fenilcarbamato de celulosa, CDMPC, es soluble en THF, acetona, cloroformo y acetato de etilo, por la incorporación de grupos fenilo a la estructura original. Se prepararon soluciones de CDMPC en THF y acetona, y se depositó el selector quiral de acuerdo al procedimiento descrito en la Sección Experimental. En la Figura II.23, se muestran las micrografías SEM para el soporte monolítico “desnudo” y luego del depósito de CDMPC a partir de una disolución del mismo en acetona y en THF. Se puede observar que el solvente THF modifica la estructura porosa del monolito poli(HEMA-co-EDMA), aumentando el tamaño de los canales de flujo (porosidad). Esto puede deberse a una diferente solvatación del polímero o a una degradación parcial del mismo.

Sin embargo, al utilizar acetona como disolvente del selector quiral, la morfología estructural permaneció sin cambios apreciables. Por lo tanto, se eligió este solvente para el depósito de CDMPC.

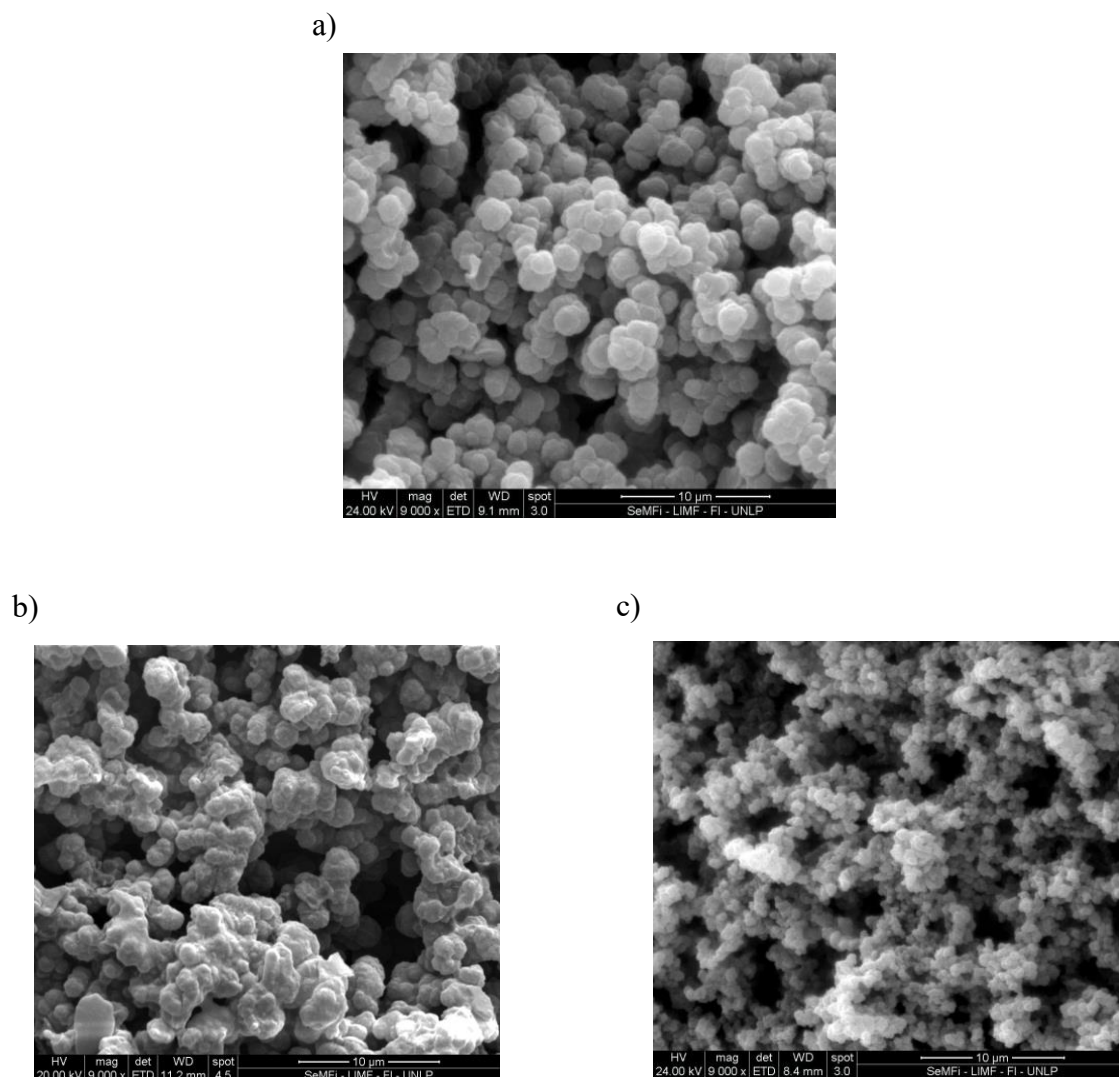


Figura II.23: Micrografías SEM de monolitos preparados con 38%p/p de 1-dodecanol (mezcla M7): a) sin depósito y con el depósito de CDMPC disuelto en b) acetona y c) THF.

En la primera oportunidad que se sintetizó el derivado de celulosa (**CDMPC-1**) se obtuvo un rendimiento de reacción del 72%. El producto presentó muy baja solubilidad en acetona (7 mg/mL luego de sonicar durante 15 minutos), en comparación con las

solubilidades que se reportan en la literatura [19]. Por este motivo, se optó por realizar un pasaje continuo de la solución de CDMPC a través de una bomba de jeringa durante 1 hora, realizando 4 ciclos sucesivos (Tabla II.11). Entre ciclos, las columnas fueron secadas en estufa a 40°C para eliminar la acetona.

Tabla II.11: Esquema del depósito de la solución de **CDMPC-1** (7 mg/mL en acetona) sobre las CCMs preparadas.

<i>Columnas</i>	<i>Longitud (cm)</i>	<i>Ciclos de depósito</i>
M7 (A)	10	2 de 1 h
M7 (B)	15	4 de 1 h
M7 (C)	10	4 de 1 h

La capacidad de enantioseparación de esta nueva FEQ fue ensayada en fase normal, en mezclas de n-hexano (Hx)/isopropanol (IPA) variando el contenido de 2 a 10 % v/v. El empleo de fase normal podría propiciar el reconocimiento quiral a través de interacciones puente hidrógeno y dipolo-dipolo entre los racematos polares y el selector CDMPC [17,20]. En RP-HPLC esto no sería posible debido a la competencia entre los analitos y el agua que forma parte de la fase móvil, por el selector quiral.

Con las diferentes composiciones de IPA ensayadas se lograron tiempos de retención entre 1 y 10 minutos lo que indica que la FEQ obtenida es capaz de retener los analitos. Asimismo, los picos obtenidos fueron gaussianos en algunos casos (TSO, 2-fenil-1-propranol) pero asimétricos en otros (benzoína, TFAE). Sin embargo, con ninguna columna se pudieron separar los enantiómeros de los analitos racémicos. Esto pudo deberse a la baja concentración del selector quiral que se pudo disolver en acetona, y por lo tanto, depositar en la superficie del lecho monolítico.

Cuando el derivado de celulosa se sintetizó nuevamente, ahora con un rendimiento de reacción del 87% (**CDMPC-2**), se alcanzó una disolución de concentración 60 mg/mL en acetona luego de sonicar durante 15 minutos, solubilidad mucho mayor que con **CDMPC-1** y coincidente con la reportada en la literatura [16,19].

Se fabricaron columnas de 15 cm de longitud, se lavaron con acetona empleando una bomba de HPLC convencional durante 60 minutos a un caudal de 0,05 mL/min. La solución de CDMPC se hizo pasar por los capilares monolíticos durante 2 horas empleando una bomba jeringa operada a un caudal de 60 μ L/h a temperatura ambiente y finalmente, las columnas fueron secadas en estufa a 40°C durante 24 horas para eliminar el solvente.

En la Figura II.23 se muestran micrografías SEM del monolito sin depósito de CDMPC (**a**) y luego de realizar el depósito (**b**), en las que se puede observar claramente el cambio en la apariencia de los glóbulos producido por el depósito de CDMPC.

II.4.4. Enantioresolución de compuestos de interés biológico

La nueva FEQ obtenida se ensayó en cuanto a la capacidad de enantioconocimiento empleando los analitos racémicos mencionados en la Sección Experimental. Los mismos se cromatografiaron con diferentes composiciones de Hx/IPA. Se estudió el agregado de aditivos de distinta naturaleza química (ácidos y básicos) en la FM.

Se estudiaron 23 analitos quirales pertenecientes a diversas familias de compuestos tales como profenos, β -bloqueantes y pesticidas en distintas condiciones de FM.

II.4.4.1. Efecto de la composición de la fase móvil en la enantioresolución

Se estudió la influencia de la composición de la mezcla n-hexano/isopropanol sobre la retención y enantioseparación de analitos racémicos. El contenido de IPA estudiado fue de 2, 5 y 10 % v/v.

En Tabla II.12 se muestran los tiempos de retención, factores de selectividad (α) y resolución (R_s) de los analitos racémicos estudiados.

Tabla II.12: Tiempos de retención (tr), factores de selectividad (α) y de resolución (R_s) para analitos quirales en distintas composiciones de Hx/IPA. Columna M7 con depósito de 60mg/mL CDMPC. F =0,08 mL/min (bomba binaria). Volumen de inyección = 9 nL. Detección a 220 nm.

analitos quirales	90/10				95/5				98/2			
	tr_1^* (min)	tr_2^* (min)	α	R_s	tr_1^* (min)	tr_2^* (min)	α	R_s	tr_1^* (min)	tr_2^* (min)	α	R_s
2-fenil-1-propanol	1,32	---	1,00	0,0	1,65	def.	>1	<1	5,50	def.	>1	<1
benzoina	2,34	def.	>1	<1	2,57	def.	>1	<1	6,00	def.	>1	<1
furalaxil	1,51	2,33	2,15	0,7	1,51	3,39	2,24	1,2	1,50	3,97	2,64	1,8
metalaxil	1,39	2,48	2,85	1,2	1,60	3,39	3,25	1,5	1,94	6,93	3,57	2,4
naproxeno	5,17	def.	>1	<1	6,01	def.	>1	<1	1,74	---	1,00	0,0
oxprenolol	2,75	def.	>1	<1	2,22	3,15	1,65	0,4	n.r.	---	---	---
propranolol	2,78	---	1,00	0,0	2,67	def.	>1	<1	n.r.	---	---	---
TFAE	1,80	---	1,00	0,0	1,85	---	1,00	0,0	1,72	2,35	1,04	0,5
metalaxil ácido	2,29	----	1,00	0,0	2,98	----	1,00	0,0	7,30	----	1,00	0,0
TSO	1,42	---	1,00	0,0	1,39	def.	>1	<1	1,53	---	1,00	0,0

*n.r.: no retenido

* tr_1 y tr_2 : corresponden a la elución del primer y segundo pico, respectivamente del par enantiomérico.

Del análisis de la Tabla II.12, se observa que al incrementar el contenido de n-hexano en la FM, aumenta la retención de la mayoría de los compuestos, lo cual corresponde al comportamiento típico de un sistema cromatográfico en fase normal, es decir, al disminuir la fuerza eluotrópica de la fase móvil aumentan las interacciones de los analitos con la fase estacionaria.

Por otro lado, al aumentar el contenido de n-hexano, los factores de enantioselectividad aumentan, con el consecuente aumento en la enantioresolución. De los 10 racematos analizados, 5 compuestos lograron resolverse, aunque con baja R_s con 10% v/v de IPA, mientras que con 5% v/v de IPA se resolvieron 8 compuestos, pero solamente el metalaxil se resolvió “a la línea de base” ($R_s = 1,5$). Finalmente, con 2% v/v de IPA se pudieron resolver 5 compuestos y dos de ellos presentaron excelentes separaciones (furalaxil y metalaxil). Por lo tanto, las mejores enantioseparaciones se lograron con 2% v/v de IPA.

La capacidad de enantioconocimiento de la fase estacionaria puede cambiar con la composición de la FM, debido a: i) interacciones competitivas entre el solvente polar y el analito por los sitios polares quirales, y ii) cambios estructurales en las cavidades quirales del polisacárido, debido a diferentes grados de hinchamiento [22]. Por eso, la composición de la FM puede influir significativamente en la estereoselectividad [27], ya que el derivado CDMPC, podría cambiar su conformación espacial de acuerdo al tipo y cantidad de solvente afectando esteroquímicamente la interacción con los distintos racematos [23].

En la Figura II.24, se muestra la influencia del aumento del contenido de n-hexano sobre la retención y enantioselectividad para el pesticida metalaxil

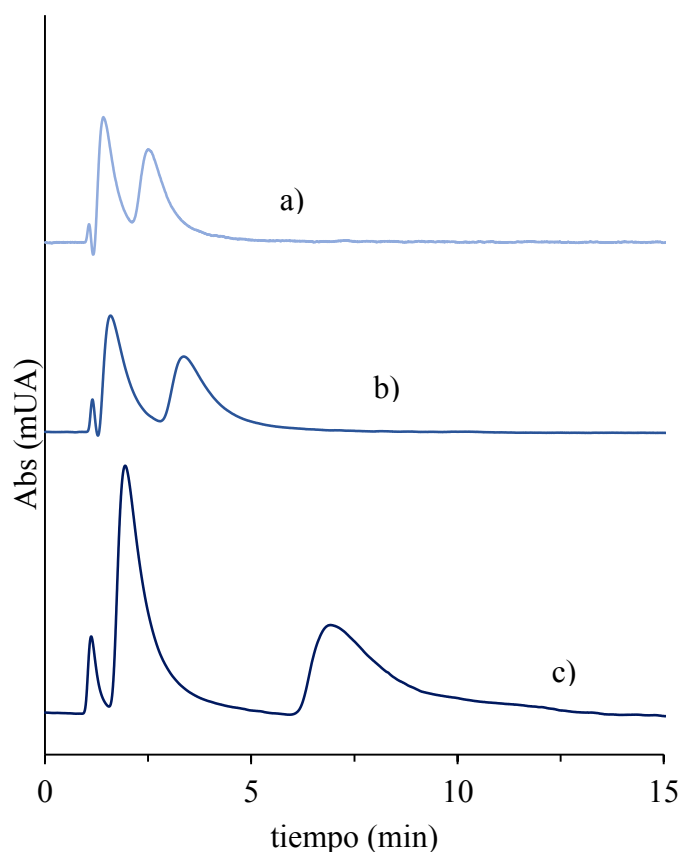


Figura II.24: Cromatogramas para la enantioseparación de metalaxil, a) 10%; b) 5% y c) 2 % (v/v) de IPA, respectivamente. Columna M7. Caudal =0,08 mL/min (bomba binaria). Vol. iny. = 9 nL. Detección a 220 nm

II.4.4.2. Influencia del tipo y cantidad de aditivo en la fase móvil

Es conocido el efecto de los aditivos, pequeñas concentraciones de un modificador orgánico en la FM, con propiedades ácido-base de diferente naturaleza en la retención y resolución de racematos ácidos o básicos, aunque el/los mecanismos de acción no están del todo dilucidados [22]. Se estudió la influencia del tipo y concentración de aditivo sobre la fase móvil en la enantioseparación de analitos con distintas características ácido-

base. Se ensayaron como aditivo básico dietanolamina (DEA) y como aditivos ácidos ácido fórmico (FA) y ácido trifluoroacético (TFA).

En trabajos previos [22,26] donde se ha empleado CDMPC como selector quiral sobre soportes particulados o monolíticos inorgánicos se han utilizado diversos aditivos básicos como etanolamina, dietilamina, 2-(etil)aminoetanol.

En este trabajo, se utilizó DEA en diferentes proporciones: 0,05, 0,1 y 0,2% v/v. En Figura II.25, se muestra el efecto de la variación del contenido de dietanolamina sobre la retención, selectividad y resolución de oxprenolol, para una composición de 90/10 Hx/IPA.

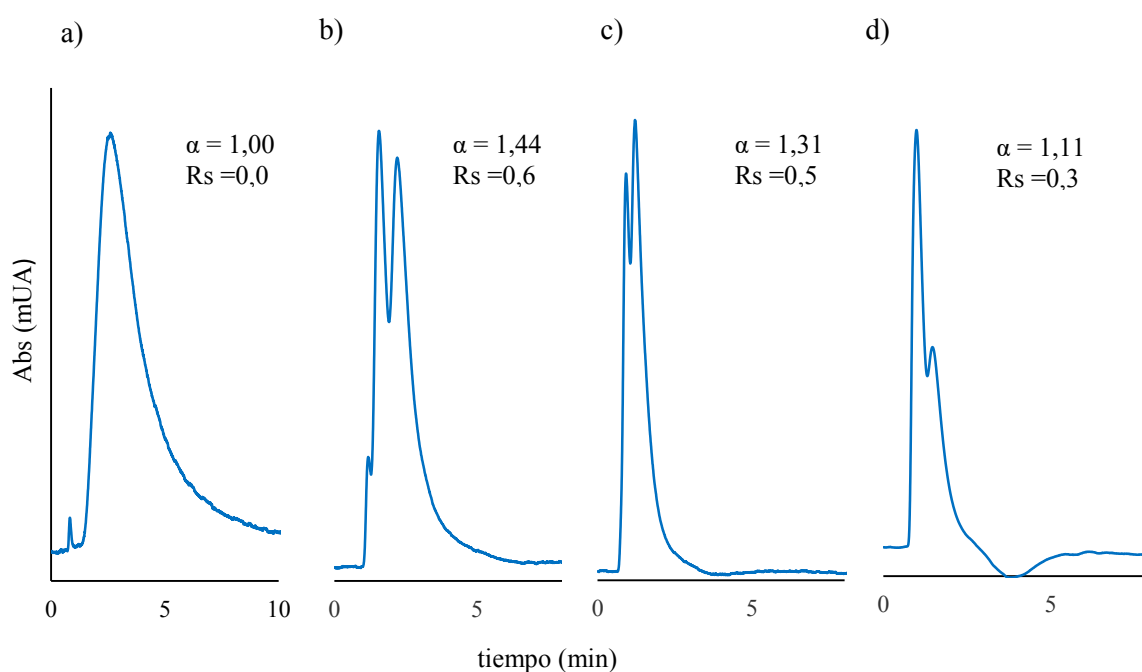


Figura II.25: Efecto del contenido de dietanolamina en la enantioseparación de oxprenolol. Fase móvil: a)0%, b)0,05%, c)0,1% y d)0,2% DEA en 90:10 (v/v) Hx/IPA. F = 0.08mL/min (bomba primaria), detección UV 220 nm.

Se puede observar que el agregado de DEA a la FM tiene un efecto positivo en la resolución de este β -bloqueante. La mejor separación se obtiene para 0,05% v/v DEA, esto podría deberse a las interacciones puente hidrógeno entre los grupos OH del aditivo

adsorbido sobre la fase estacionaria y los grupos OH del analito [22]. Concentraciones mayores de DEA en la FM producen disminución en la retención y también en la selectividad y en la resolución, probablemente como consecuencia de la competencia entre el analito y el DEA para interactuar con los sitios del selector quiral.

Si bien, se concluyó anteriormente que la mejores enantioselectividades se alcanzaron empleando 2%v/v de IPA en la FM, no fue posible trabajar con concentraciones de 0,1 y 0,2%v/v DEA, debido a la insolubilidad de la DEA en esa FM tan rica en n-hexano.

Finalmente, se estudió el efecto del agregado en la fase móvil de ácido fórmico (FA) y ácido trifluoroacético (TFA) sobre la enantioselectividad y enantioresolución de los distintos racematos.

En el gráfico de la Figura II.26, se muestra la tendencia de los factores de enantioselectividad (α) para distintas concentraciones de los aditivos FA y TFA.

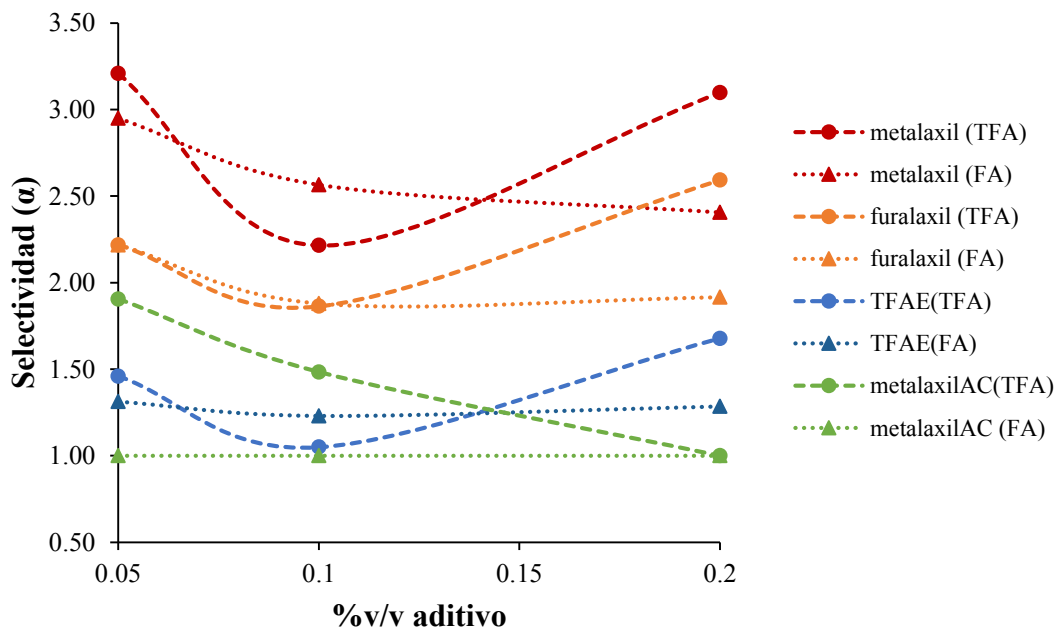


Figura II.26: Efecto del contenido de aditivos TFA (línea - - -) y FA (línea ...), sobre la selectividad de los distintos analitos racémicos a una composición de 98/2 Hx/IPA. F = 0,08 mL/min, detección 220 nm.

En la Tabla II.13, se muestran los parámetros cromatográficos obtenidos para los analitos quirales estudiados empleando distintas concentraciones de FA y TFA en una fase móvil 98/2 de Hx/IPA. Todas las determinaciones se realizaron con un caudal de 0,08 mL/min (bomba binaria) a una $\lambda=220$ nm.

A partir de los datos mostrados en la Tabla II.13 y en la Figura II.26 puede observarse que los valores de selectividad y resolución más bajos se alcanzan con 0,1% v/v de ambos aditivos ácidos.

El análisis realizado para el agregado del aditivo básico puede extenderse a este caso. No está clara la razón por la cual la selectividad aumenta con TFA para metalaxil ácido y TFAE. Sin embargo, se observa una mejora significativa en la separación enantiomérica de los analitos de naturaleza ácida: TFAE ($\alpha= 1,31$ con 0,05% v/v FA y $\alpha=1,68$ con 0,2%v/v TFA) y metalaxil ácido ($\alpha= 1,91$ con 0,05% v/v TFA) respecto de la misma fase móvil sin aditivos (TFAE $\alpha = 1,04$ y metalaxil ácido $\alpha= 1$).

El tipo y la concentración de los aditivos que se incorporan a la fase móvil deben ser considerados y estudiados en función de la naturaleza química de los analitos, ya que tienen un efecto determinante en la capacidad de separación quiral del sistema cromatográfico.

Tabla II.13: Efecto de la concentración de aditivo ácido sobre los tiempos de retención (tr), factores de selectividad (α) y resolución (R_s) de analitos quirales. Columna M7 con depósito de 60mg/mL CDMPC. F=0,08 mL/min (bomba binaria). Vol. iny. = 9 nL. Detección a 220 nm.

compuestos	n-Hexano/2-propanol/FA %v/v											
	98/2/0,05				98/2/0,1				98/2/0,2			
	tr_1^* (min)	tr_2^* (min)	α	R_s	tr_1^* (min)	tr_2^* (min)	α	R_s	tr_1^* (min)	tr_2^* (min)	α	R_s
furalaxil	1,66	3,68	2,22	1,5	1,60	3,01	1,88	1,2	1,55	2,97	1,92	1,1
metalaxil	1,48	4,36	2,95	2,1	1,59	3,55	2,23	1,6	1,64	3,95	2,41	2,1
TFAE	1,81	2,37	1,31	<0,5	1,61	1,98	1,23	<0,5	1,79	2,30	1,29	<0,5

compuestos	n-Hexano/2-propanol/TFA %v/v											
	98/2/0,05				98/2/0,1				98/2/0,2			
	tr_1^* (min)	tr_2^* (min)	α	R_s	tr_1^* (min)	tr_2^* (min)	α	R_s	tr_1^* (min)	tr_2^* (min)	α	R_s
furalaxyl	1,68	4,57	2,72	2,4	1,32	2,52	1,90	1,1	1,28	3,33	2,59	1,7
metalaxyl	1,36	4,52	3,33	2,3	1,25	2,75	2,20	1,3	1,19	3,69	3,10	1,8
TFAE	1,95	2,85	1,46	0,5	1,68	1,76	1,05	<0,5	1,84	3,09	1,68	0,8
metalaxil ácido	2,45	4,69	1,91	0,6	1,37	2,07	1,51	0,5	4,28	---	1,00	0,0

* tr_1 y tr_2 : corresponden a la elución del primer y segundo pico, respectivamente del par enantiomérico.

II.4.5. Performance de la CCMQ

En base a los resultados obtenidos anteriormente, en la Figura II.27 se muestran los cromatogramas de los analitos racémicos empleando las condiciones óptimas de enantioseparación.

Las determinaciones se realizaron empleando un caudal de 0,08 mL/min desde la bomba primaria, el caudal en la columna monolítica fue de 39 μ L/min, la detección se realizó a 220 nm y a temperatura ambiente.

Todos los cromatogramas obtenidos en las condiciones mencionadas muestran picos adicionales a los correspondientes a los analitos. Si bien se intentó minimizarlos utilizando la misma fase móvil como solvente de muestra para los racematos a inyectar, estos “picos de sistema” fueron inevitables y en algunos casos dificultaron la interpretación de los cromatogramas.

Recientemente, se han reportados trabajos científicos utilizando monolitos orgánicos de metacrilato, empleando como selector quiral derivados de ciclodextrina (CD), amilosa, alcaloides (quinina) o aminobutil-tergurida, inmovilizados al lecho monolítico, con los que se obtuvieron buenas separaciones ($R_s \sim 1,5$) para analitos racémicos tales como derivados de aminoácidos, β -bloqueantes y ácidos 2-ariloxipropionicos [28,31].

Sin embargo, hasta la fecha, no se han publicado reportes sobre la separación enantiomérica de pesticidas como metalaxil, metalaxil ácido, furalaxil y de compuestos β -bloqueantes cardiovasculares como oxprenolol y propranolol. Lo que destaca la muy buena performance de estas nuevas CCMQs, con las que se obtuvieron resoluciones por encima de 1,5 para metalaxil, furalaxil y oxprenolol en cortos tiempos de análisis (menores a 15 min).

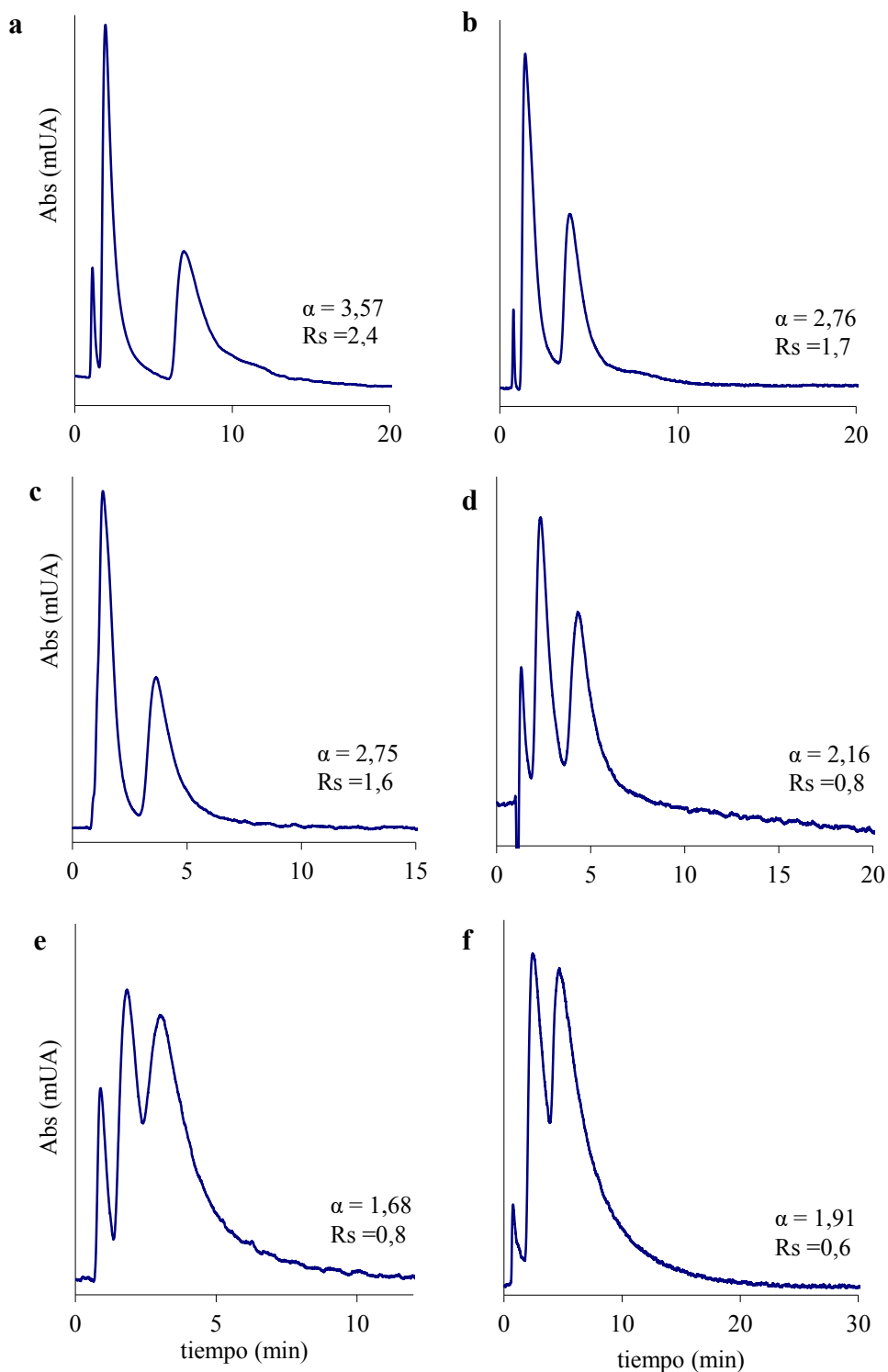


Figura II.27: Cromatogramas de los racematos estudiados en sus condiciones óptimas de enantioseparación. **FM-1:**98/2%/v/v Hx/IPA **a)**(S,R)-metalaxil; **b)**(S,R)-furalaxil; **FM-2:**98/2/0,05%/v/v Hx/IPA/DEA **c)**oxprenolol, **d)**propranolol; **FM-3:** 98/2/0,2% v/v Hx/IPA/TFA **e)**(R,S)-TFAE; **FM-4:**98/2/0,05%/v/v Hx/IPA/TFA, **f)**metalaxil ácido.

II.4.6. Estabilidad de la CCMQ

Se estudió la estabilidad de la columna monolítica quirral desarrollada. Para ello, se determinó el tiempo de retención del par enantiomérico de metalaxil en función de la cantidad de inyecciones realizadas (Figura II.28a) y en función de la cantidad de fase móvil eluida expresada como volúmenes de columna (Figura II.28b). Se empleó 90/10 %v/v Hx/IPA, a un caudal de 0,08 mL/min.

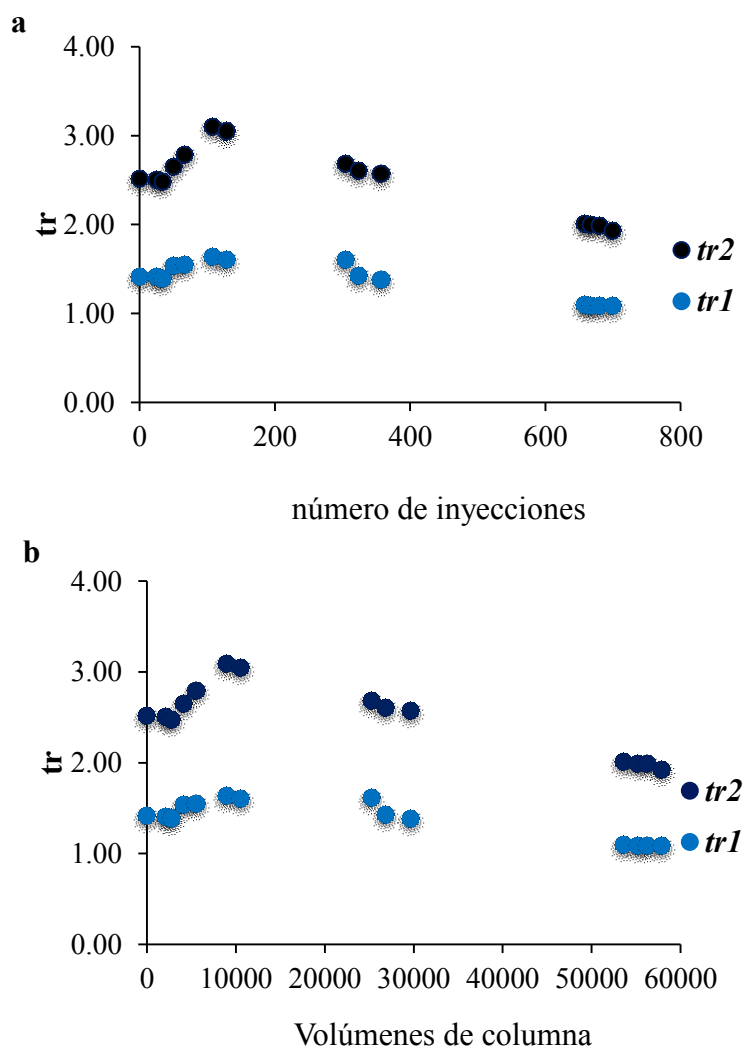


Figura II.28: Estabilidad de la columna monolítica quirral para metalaxil en función de a) número de inyecciones y b) volúmenes de columna, tr_1 y tr_2 corresponden respectivamente, a la elución del primer y el segundo pico del par enantiomérico.

Como se puede observar, los resultados indican una muy buena estabilidad frente al uso prolongado con más de 700 inyecciones realizadas (más de 60000 volúmenes de columna).

Además, como se muestra en la Tabla II.14, se determinó la repetibilidad (inyecciones intra día) y reproducibilidad (entre días) de las inyecciones realizadas en la CCMQ.

Como se indica en la Tabla II.14, los coeficientes de variación (CV%) entre inyecciones son muy aceptables para inyecciones intra día y, como es de esperarse, un poco mayores para inyecciones inter día, para los tiempos de retención, resolución, relación de áreas (A_1/A_2) y alturas (H_1/H_2) del par enantiomérico. Esto indica la muy buena estabilidad de la columna capilar monolítica recubierta con CDMPC, lo cual nos demuestra que esta CCMQ puede emplearse en la detección y cuantificación de distintas mezclas racémicas.

Tabla II.14: Repetibilidad y reproducibilidad para metalaxil. Fase Móvil 90/10 Hx:IPA, F =0,08 ml/min (bomba binaria), detección a 220 nm.

	Repetibilidad			Reproducibilidad		
	Media	CV	CV%	Media	CV	CV%
tr_1	1.41	0.01	1.00	1.44	0.07	6.74
tr_2	2.50	0.01	0.75	2.52	0.11	10.93
Rs	1.21	0.03	2.97	1.06	0.21	20.67
A_1/A_2	0.80	0.02	2.38	0.77	0.07	7.37
H_1/H_2	1.36	0.03	2.75	1.41	0.04	4.34

II.4.7. Performance de la CCM hacia moléculas pequeñas

Es conocido que los monolitos poliméricos orgánicos debido a su baja área superficial (aproximadamente $30 \text{ m}^2/\text{gr}$), sobre todo en comparación con los monolitos de sílice que tienen áreas 10 veces más grandes, no presentan una buena performance separativa para moléculas de pequeño tamaño [33]. Esto ocurre debido a la lenta transferencia de masa en la FM estanca de los mesoporos.

Desde hace unos pocos años diversos nanomateriales (tales como nanopartículas metálicas o de carbono, redes organometálicas (MOFs: “metal organic frameworks”), entre otros [34], se han incorporado a la matriz polimérica para aumentar significativamente el área superficial.

A pesar, de la baja área superficial de los monolitos poliméricos orgánicos se ensayó el comportamiento de los mismos hacia moléculas pequeñas aquirales. Para ello se inyectaron algunas moléculas de prueba en la columna monolítica capilar M7 de 20 cm de longitud.

En la Figura II.29, se muestran los cromatogramas superpuestos de los analitos mencionados inyectados por separado.

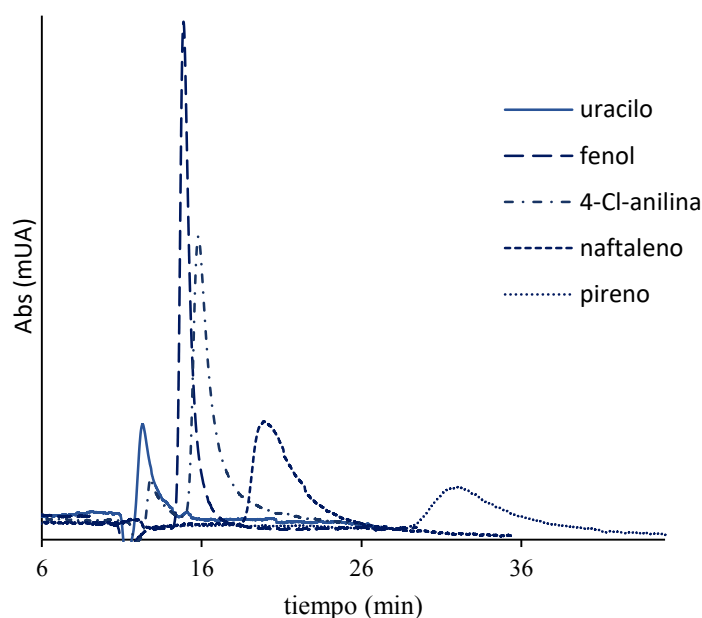


Figura II.29: Cromatogramas de analitos de prueba. Columna monolítica poli(HEMA-co-EDMA) de 20 cm. Caudal= 0,15mL/min (desde la bomba binaria), FM: MeOH/agua (80:20), $\Delta P= 110 \text{ bar}$

En la Tabla II.15 se muestran los tiempos de retención y número de platos teóricos (eficiencia) de los cromatogramas mostrados anteriormente.

Tabla II.15: Tiempos de retención (t_r), ancho de pico a mitad de altura ($w_{0.5}$) y eficiencia (N) de analitos de prueba.

Analito	t_r (min)	$w_{0.5}$ (min)	N
uracilo	12,29	0,837	1194
fenol	14,86	0,622	3163
4-Cl-anilina	15,79	1,025	1315
naftaleno	19,92	2,618	321
pireno	31,97	4,332	302

Los compuestos ensayados se retuvieron en la fase estacionaria monolítica, y en el caso de moléculas como fenol, uracilo y 4-Cl-anilina se lograron altas eficiencias. En el caso de los compuestos más retenidos como naftaleno y pireno la eficiencia fue muy baja dado el gran ensanchamiento de los picos.

Por lo tanto, se puede concluir que, a pesar del bajo número de platos teóricos logrados con algunos compuestos de pequeño tamaño, la separación de muestras sencillas es posible.

II.4.8. Referencias

1. Lukas, J., Svec, F., Kalal, J., *J. Chromatogr.* (1978), 153, 15-22.
2. Svec F., Fréchet, J.M.J., *Macromolecules* (1995), 7580-7582.
3. Peters, E. C.; Lewandowski, K.; Petro, M.; Svec, F.; Frechet, J. M. *J. Anal. Commun.* (1998), 35,83-86.
4. Lámmerhofer, M., Peters, E.C., Yu, C., Svec, F. Fechet, J.M., *Anal. Chem.* (2000) 72,4614-4622.
5. Peters, E.C., Svec, F., Fréchet, J.M.J., Viklund, C., Irgum, K., *Macromolecules*, (1999) 32, 6377.
6. Svec, F., Hradil, J., Coupek, J., Kálal, J., *Angew. Macromo. Chem.*, (1975) 48, 135.
7. Mane, S.; *Canadian Chemical Transactions* (2016), 4, 210-225.
8. Svec F., Fréchet, J.M.J., *Chem. Mater.* (1995) 707-715.
9. Svec., F., Tennikova, T., Deyl Z. *Monolithic materials: preparation, properties and applications, J. Chromatography Library*, (2003) vol.67 Elsevier Science.
10. Viklund, C., Svec F., Fréchet, J.M.J.; *American Chemical Society* (1996), 744-750.
11. Svec, F., Fréchet, J.M.J.; Jean, M.J., *Ind. Eng.Chem. Res*, (1999), 38, 34-38.
12. Curso de Posgrado: “*Caracterización textural de sólidos porosos mediante adsorción de gases*” (2014). Dictado en CETMIC, FCE, UNLP.
13. Chankvetadze, B., Yamamoto, C., Tanaka, N., Nakanishi, K., Okamoto, Y., *J. Sep. Sci* (2004), 27, 905–911.
14. Shen, J., Ikai, T., Okamoto, Y., *J. Chromatogr. A* (2014), 1363, 51–61.
15. Ikai, T., Yamamoto, C., Kamigaito, M., Okamoto, Y., *Polym. J* (2006), 38, 91–108.
16. Ling, F., Brahmachary, E., Xu, M., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *J. Sep. Sci.* (2003), 26, 1337-1346.
17. Yashima, E., Fukaya, H., Okamoto, Y., *J. Chromatogr. A* (1994), 677, 11–19.

18. Okamoto, Y., Kawashima, M., Hatada, K., *J. Chromatogr. A* (1986), 363, 173–186.
19. Francotte, E. R., *J. Chromatogr. A* (2001), 906, 379-397.
20. Yamamoto C, Yashima E, Okamoto Y; *Bull Chem Soc Jpn* (1999), 72; 1815–1825.
21. Chankvetadze, B., Yashima, E., Okamoto, Y., *J Chromatogr A* (1994), 670, 39–49.
22. Castells, C., Carr, P.W.; *J. Chromatogr. A*, (2000) 904, 17-33.
23. Shen, J., Xilun, W., Zongbi, B., Huabin, X., Zhiguo, Z., Qiwei, Y., Baogen, S., Yiwen, Y., Qilong, R., *J. Chromatogr. A*, (2012), 1246, 137-144.
24. Weng, X.; Zongbi, B.; Huabin, X.; Zhiguo, Z.; Qiwei, Y.; Baogen, S.; Yiwen Y.; Qilong, R., *J. Chromatogr. A*, (2013) 1321, 38-47.
25. Dong, X.; Renaposan, W.; Jing, D.; Minghuo, W.; Yan, Z.; Hanfa, Z., *J. Chromatogr. B*. (2008), 875, 317-322.
26. Liu, Y., Zou, H., *J. Chromatogr. A*. (2008) 1178, 118-125.
27. Ikai, T., Yamamoto, C., Kamigaito, M., Okamoto, Y., *J. Chromatogr. A*. (2007), 1157, 151.
28. Guo, J., Lin, Y., Xiao, Y., Crommen, J., Jiang, Z., *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2016) 130, 110-125.
29. Wang, Q., Zhu, P., Ruan, M., Wu, H., Peng, K., Han, H., Somsen, G.W., Crommen, J., Jiang Z., *J. Chromatogr. A.*, (2016) 1444, 64-73.
30. Messina, A., Flieger, M., Bachechi, F., Sinibaldi, M., *J. Chromatogr. A.*, (2006) 1120, 69-74.
31. Fouad, A., Marzouk, A.A., Ibrahim, S.M., El-Adl, S.M., Ghanem, A., *J. Chromatogr. A*. (2017) 1515, 91-99.
32. www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf; Cellulose (cap.10).
33. Svec, F., *J. Chromatogr. A* (2012), 1228, 250-262.
34. Yu, Y., Ren, Y., Shen, W., Deng, H., Gao, Z., *J. Chromatogr. A* (2014), 1366, 45-53.

II.5. Conclusiones parciales

En el presente Capítulo se mostró el desarrollo de la metodología para la preparación de columnas capilares monolíticas quirales (CCMQs) para micro-HPLC. A partir de los resultados obtenidos, se pueden señalar las siguientes conclusiones parciales:

- * A partir de la mezcla de polimerización optimizada y constituida por: 24%p/pHEMA, 16%p/pEDMA, 38%p/p1-dodecanol, 22%p/pciclohexanol y 0,3%p/pLPO, se logró obtener monolitos adheridos a la pared del capilar, con adecuada morfología estructural y permeabilidad para su uso en equipos de micro-HPLC, y con un diámetro de poro adecuado para la posterior etapa de depósito del selector quiral.
- * Se logró sintetizar y caracterizar el derivado *tris*(3,5-dimetilfenil) carbamato de celulosa, CDMPC, con un rendimiento de reacción del 87%. Dicho derivado, utilizado como selector quiral, fue depositado exitosamente sobre la superficie del lecho monolítico con el objetivo de obtener CCMQs con adecuada capacidad de enantioseparación.
- * Se logró enantioseparar 9 de 23 analitos quirales, con enantioresoluciones entre 0,6 y 2,4 en cortos tiempos de análisis. La CCMQ preparada mostró alta estabilidad mecánica, buena permeabilidad, adecuada repetitividad y repetibilidad, demostrando que puede emplearse en la detección y cuantificación de mezclas racémicas.
- * Se logró obtener una CCM aceptable para separar diversas moléculas pequeñas, mostrando altas retenciones y muy buenas eficiencias.



Capítulo III

Desarrollo de columnas capilares monolíticas quirales para CEC

III.1.Introducción

III.1.1 Electrochromatografía capilar

La electrocromatografía capilar (CEC) originada en la década del '70, combina las características de las técnicas de HPLC y de electroforesis capilar (CE). En HPLC y CEC, el proceso de separación está basado en la interacción diferencial de los analitos entre la fase móvil y la estacionaria [1,7]. Desde este punto de vista, CEC podría considerarse una variante de la técnica de HPLC dado que el principio de separación es la partición del analito entre ambas fases. Sin embargo, en CE y CEC el flujo de fase móvil es impulsado a través de la columna por un campo eléctrico y no por una presión aplicada.

En presencia de elevados campos eléctricos, el flujo electroosmótico (EOF, según su sigla en inglés) generado actúa como fuerza impulsora de la fase móvil. Esto resulta en una serie de ventajas importantes de la CEC sobre la HPLC:

1. En las técnicas en que la fuerza impulsora de la fase móvil es la presión aplicada en la columna rellena, el caudal de la fase móvil es proporcional al cuadrado del diámetro de las partículas de relleno e inversamente proporcional a la longitud de la columna. Para no superar el límite de presión tolerable (400 bar), no deberían utilizarse columnas mayores a 25 cm rellenas con partículas de 3 μm . Por el contrario, el caudal de fase móvil impulsado por el campo eléctrico es independiente del tamaño de las partículas y de la longitud de la columna, por lo que en principio podrían usarse partículas más pequeñas y columnas más largas que las que se utilizarían en HPLC si se requieren altas eficiencias para separaciones realizadas mediante CEC [6].
2. En CEC, el perfil de flujo plano en el movimiento del frente líquido en el interior del capilar, a diferencia del perfil parabólico que se genera en HPLC cuando se aplica presión (Figura III.1), reduce la dispersión de la banda de soluto producida en la columna, con el consecuente aumento en la detectabilidad.

Entonces, la posibilidad de reducción del tamaño de las partículas, así como el aumento de la longitud de la columna y el desarrollo de un perfil plano para el flujo conducen a una mayor eficiencia de separación en CEC en relación a la que se obtendría en HPLC, lo que permitiría mejoras sustanciales en la resolución de mezclas complejas.

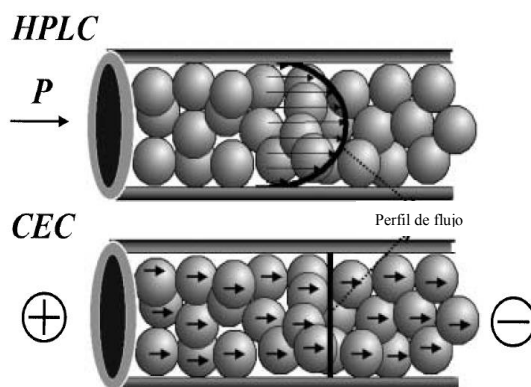


Figura III.1: Perfiles de flujo por presión (arriba) en HPLC y electroosmóticamente impulsado (abajo) en un capilar relleno para CEC.

Si bien el interés por esta técnica ha resurgido a partir de 1990 y muestra popularidad creciente en diversos campos de aplicación, su amplio potencial aún no ha sido del todo explotado y aún se encuentra en continuo desarrollo.

III.1.1.1. Equipamiento

El equipamiento empleado en CEC es muy simple, el instrumento está constituido básicamente por los siguientes componentes (Figura III.2):

- ✓ fuente de alto voltaje.
- ✓ sistema de suministro de disolvente y/o de muestras (viales de entrada y de salida de la columna).
- ✓ columna capilar rellena donde tiene lugar la separación electrocromatográfica.
- ✓ compartimento termostatzado para la columna.
- ✓ sistema de detección.

Básicamente es un instrumento de electroforesis capilar, con la posibilidad de presurizar los viales. Esta presurización es necesaria para impedir la formación de burbujas que pueden originarse por diversas causas: diferencias locales en la velocidad del EOF (por ejemplo, entre las secciones rellena y vacía del capilar) [8], diferencias locales en la intensidad del campo eléctrico, pérdida del gas atrapado en los poros o

formado electroquímicamente [9], por calentamiento [10,11] o por la presencia de fritas terminales en las columnas particuladas [12].

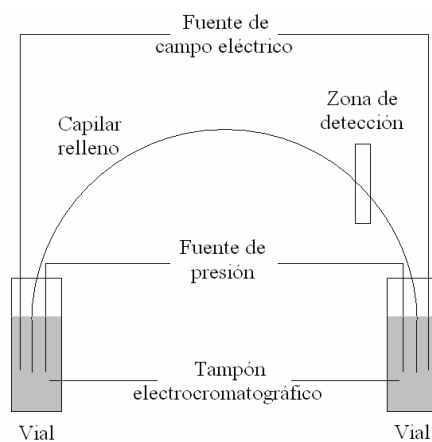


Figura III.2: Representación esquemática del equipamiento básico de CEC.

Actualmente, con objeto de minimizar la formación de burbujas de aire, muchos equipos permiten presurizar mediante un gas inerte (~10 bar) tanto en el vial de entrada como en el de salida, permitiendo un flujo reproducible.

En los equipos comerciales de CE o CEC, el control de parámetros como temperatura, voltaje y presión se realiza automáticamente, lo que da lugar a separaciones reproducibles.

Los detectores espectrofotométricos UV-vis son los más empleados en CEC. La detección se realiza en la misma columna (“*on-column*”), utilizando como “celda de detección” una pequeña sección construida en la misma columna en una zona adyacente al relleno, retirando la capa protectora de polímero (poliimida) que recubre el tubo capilar [13].

III.1.2. Columnas empleadas

Aunque numerosos grupos de investigación desarrollan y preparan columnas de CEC según diversas metodologías, la gran mayoría de los esfuerzos imitan de alguna manera la tecnología estándar para la fabricación de columnas de HPLC. Frecuentemente, los estudios efectuados en el campo de la CEC se basan en la aplicación de un campo eléctrico a los métodos ya desarrollados para HPLC. Sin embargo, ciertos aspectos de

esta tecnología han resultado difíciles de implementar en la escala capilar. Además, los rellenos de CEC deben desempeñar una doble función, por un lado, proporcionar sitios para las interacciones diferenciales requeridas para la separación de los analitos (como en HPLC) y por otro, tener la capacidad de generar el EOF responsable del desplazamiento de la fase móvil. Por lo tanto, los rellenos con excelente desempeño para la HPLC pueden ofrecer un rendimiento limitado en el modo CEC. Esto ha estimulado el desarrollo de rellenos específicos de partículas con propiedades ajustadas para las necesidades de la CEC, así como tecnologías para el desarrollo de columnas alternativas. La tecnología de columnas sigue siendo uno de los temas más candentes de la CEC y los avances se han resumido en varios artículos de revisión recientes [13,19].

Las columnas capilares desarrolladas para CEC pueden clasificarse en:

- i. las que tienen la fase estacionaria inmovilizada en el interior de la pared del capilar,
- ii. las rellenas, ya sea con material particulado o monolítico.

III.1.2.1. Columnas particuladas

Las columnas más utilizadas actualmente en CEC son las rellenas con material particulado de naturaleza cromatográfica, comúnmente las partículas esféricas típicas de RP-HPLC de 1,5 a 10 μm de diámetro. Si bien se han reportado y revisado cuidadosamente diversos métodos y protocolos de fabricación [21,22], el empaquetamiento de las columnas para CEC, al igual que para las de HPLC, no es un método científico establecido sino más bien un “arte” que requiere de práctica y experiencia. El proceso de llenado de los tubos capilares (de 50 a 100 μm d.i.) determina la integridad y estabilidad del lecho con incidencia directa sobre la performance del mismo. Otro punto débil en la preparación de estas columnas es la fabricación de las fritas terminales destinadas a retener el material de relleno y que muchas veces son causantes de diversos efectos que deterioran el desempeño de las columnas (caídas de corriente provocadas por la formación de burbujas, inhomogeneidad en el flujo que pueden causar ensanchamientos extra-columna, entre otras). Por estas dificultades, es altamente deseable la producción de columnas rellenas sin fritas para CEC, lo que ha sido motivo de investigación en los últimos años.

Con el objetivo de superar los problemas derivados de la difícil fabricación de las fritas dentro del capilar, el empaque de partículas dentro de un tubo con diámetro muy pequeño, la estabilidad limitada de las columnas empaquetadas y la formación de burbujas dentro del capilar, se han diseñado alternativas como las delgadas capas de fases estacionarias unidas químicamente a la pared del capilar mediante el uso de técnicas desarrolladas anteriormente para GC o el desarrollo de lechos monolíticos [24,37].

III.1.2.2. Columnas de tubo abierto

Las columnas de tubo abierto (OT-CEC) fueron introducidas por Tsuda y *col.* [23] quienes recubrieron un capilar estrecho (30 μm d.i.) con octadecilsilano que fue utilizado para separar hidrocarburos. El progreso en OT-CEC se ha enfocado en gran medida en la búsqueda de fases estacionarias que puedan utilizarse para recubrir la superficie interna de la pared de un capilar de sílice fundida. Estos materiales a menudo se eligen por su capacidad para proporcionar la selectividad necesaria en base a los mecanismos de separación cromatográfica conocidos. Estos incluyen recubrimiento con un material polimérico [24, 29], con derivados de celulosa [30], silanización de la superficie de la sílice fundida [31, 33], o adsorción de una bicapa de surfactante o una capa de proteína [34]

La ventaja inherente de OT-CEC sobre otros modos de CEC es la posibilidad de mejorar fácilmente la selectividad de la separación mediante el uso de revestimientos innovadores. OT-CEC no requiere fritas terminales. Sin embargo, las pequeñas cantidades de fase estacionaria empleada para estos revestimientos conducen a bajas relaciones de fase, que puede ser un factor limitante en términos de sensibilidad en la detección para algunas aplicaciones. El uso de capilares de menor diámetro interno (2-25 μm) permite una muy eficiente difusión de los solutos hacia y desde la fase estacionaria, lo que conduce a picos angostos y a un alto número de platos.

III.1.2.3. Columnas monolíticas

Otra de las alternativas competitivas, impulsada por las dificultades técnicas asociadas con las columnas empaquetadas, principalmente relacionada con la fabricación

de las fritas terminales, son los lechos monolíticos. Esta tecnología se adoptó a partir de los desarrollos originalmente hechos para columnas de HPLC de diámetro mucho mayor [35, 36]. Por sus propiedades únicas, los materiales monolíticos son atractivos y dan lugar a una multiplicidad de materiales y procedimientos utilizados para la preparación de columnas monolíticas para CEC. Tanto la sílice como los polímeros orgánicos sintéticos son dos familias de materiales que han sido utilizados para: (i) empaquetar partículas seguido de su fijación para formar una estructura monolítica y (ii) preparar el monolito *in situ* dentro del capilar, resultando en columnas monolíticas sin fritas.

Columnas monolíticas basadas en ésteres de metacrilato

Diversos grupos de investigación han realizado un extenso desarrollo de materiales para CEC preparados a partir de monómeros de ésteres de metacrilato [37, 38].

La producción de estas columnas es sumamente simple (Figura III.3). Se llena un capilar tratado con una mezcla de polimerización y se inicia con calor o irradiación UV [38, 39]. Una vez completada la polimerización, se lava para eliminar restos de reactivos. La técnica fue detalladamente descrita en el *Capítulo II*.

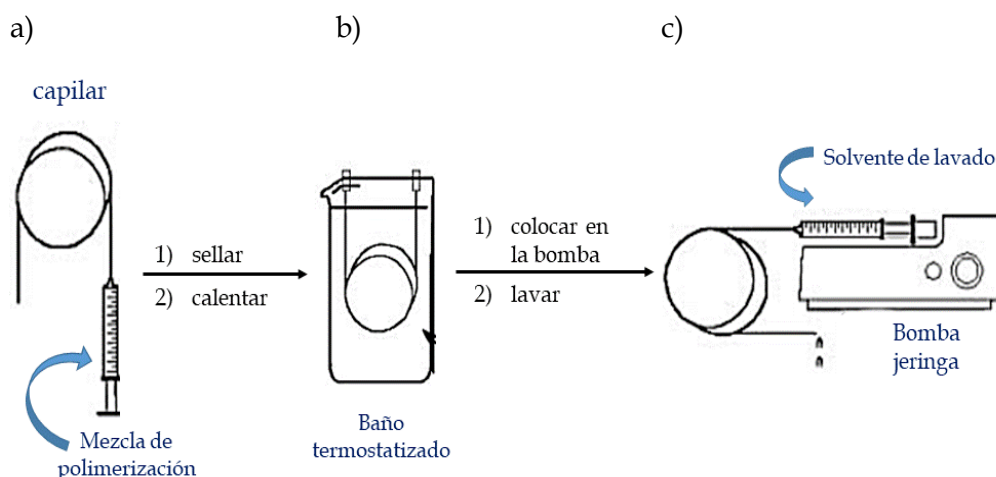


Figura III. 3: Procedimiento para la preparación de columnas monolíticas poliméricas en CEC: a) llenado del capilar; b) polimerización por calor; c) lavado con MeOH.

III.1.3. Modificación química de los monolitos poliméricos

Un área superficial baja del material que actúa como soporte de la fase estacionaria es un inconveniente para las aplicaciones cromatográficas, ya que tanto la retención como la capacidad de carga de la columna resultarían disminuidas. Se han empleado diversos procedimientos para aumentar el área superficial de los monolitos orgánicos mediante hibridación en la superficie con otros compuestos, por ejemplo, el empleo de polímeros altamente entrecruzados [40], la incorporación de redes organometálicas (MOFs) [41], o nanomateriales de carbono, nanopartículas de sílice o de Au [42].

La modificación química superficial a partir de monómeros precursores permite funcionalizar la superficie del monolito si estos monómeros contienen un grupo reactivo.

Como se ha comentado en el *Capítulo I*, los monolitos de glicidil metacrilato (GMA) constituyen la plataforma de uso general típico para modificar la química superficial del lecho monolítico una vez que la polimerización ha sido completada (Figura III.4). Además de GMA, se han utilizado también otros monómeros reactivos que incluyen 4-(clorometil) estireno [43] y 2-vinil-4,4-dimetilazlactona [44].

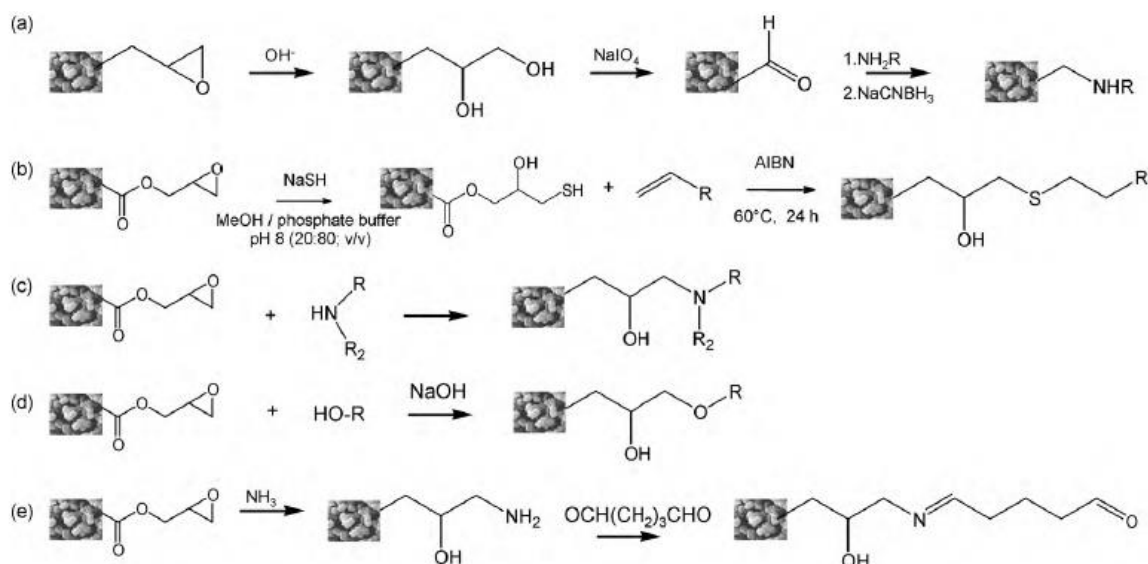


Figura III. 4: Opciones para modificar con distintas funciones químicas la superficie del monolito poli(GMA-co-EDMA) [45].

La modificación química de la superficie de un monolito reactivo puede hacerse en condición estática: llenar el capilar, sellar los extremos y dejar reaccionar durante un tiempo y una temperatura fija, o en condición dinámica: con recirculación de la solución de derivatización. Una vez que se completa la reacción, el monolito se lava con un disolvente y se acondiciona para su aplicación.

III.1.3.1. Fotoinjerto

Otro método ampliamente empleado para modificar covalentemente la química superficial del monolito es la unión de monómeros reactivos o de cadenas poliméricas a la estructura del polímero “padre” mediante un mecanismo inducido por la radiación UV denominado "fotoinjerto" (photografting).

El fotoinjerto también permite el control de las propiedades porosas del monolito independientemente del manejo de su química superficial. En otras palabras, se puede utilizar para mejorar la estructura porosa de un monolito "genérico", por ejemplo, por una funcionalización adicional de la superficie fotoinjertada [46].

El fotoinjerto se puede realizar en una o dos etapas [47]. En el caso del fotoinjerto en dos etapas (Figura III.5), se puede describir el siguiente procedimiento:

- a) en la primera etapa, los restos iniciadores se forman en la superficie del monolito mediante irradiación UV, que está en contacto con una solución de benzofenona (fotoiniciador), ya que su estado excitado abstrae un hidrógeno de la superficie; luego de ser irradiada la columna se lava con solvente orgánico.
- b) en la segunda etapa, se incorpora o injerta el monómero; la irradiación UV libera los radicales libres latentes inmovilizados situados sobre el polímero (benzofenona), dejando que los monómeros que se deseen injertar se unan al radical libre superficial.

Se ha confirmado que el proceso de fotoinjerto en dos etapas da como resultado una proporción mayor de monómeros que se unen a la superficie, en comparación con el proceso de una sola etapa (fotoiniciador y el monómero juntos en solución) [48,49].

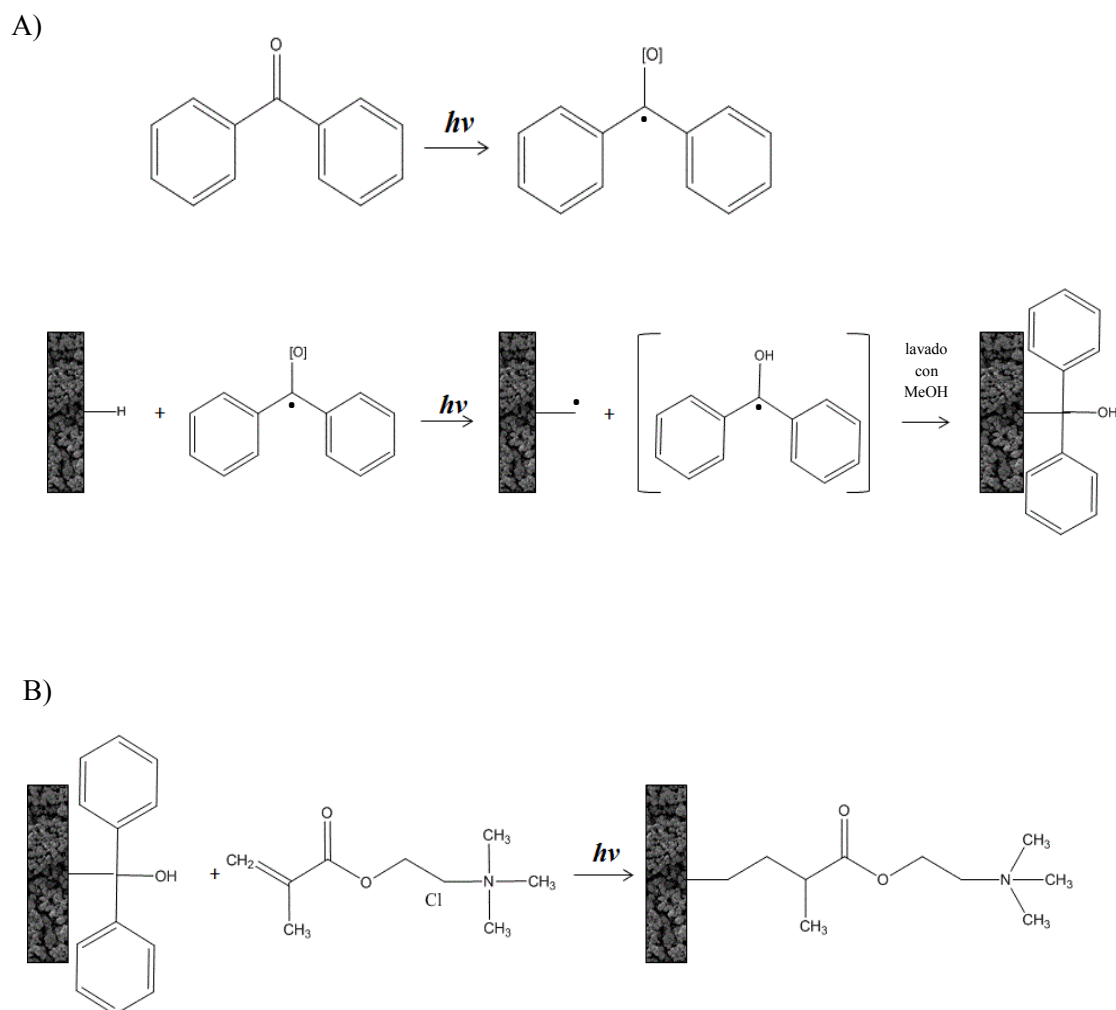


Figura III.5: Proceso de fotoinjerto en dos etapas, A) Iniciación y activación de la benzofenona en la superficie del monolito; B) Fotoinjerto del monómero META.

El proceso fotoiniciado también permite el injerto simultáneo de más de un monómero. Eeltink *y col.* han utilizado cloruro de [(2-metacrililoiloxi)etil] trimetilamonio (META) y acrilato de butilo para controlar el EOF en columnas CEC [49]. Obviamente, para el fotoinjerto no se pueden usar materiales ni especies absorbentes tales como capilares recubiertos con poliimida (se necesitan capilares UV transparentes) ni monómeros aromáticos típicos como estireno. Además, debido a la absorción UV de la

propia matriz polimérica, el fotoinjerto es efectivo sólo para monolitos en los que sus dimensiones son pequeñas.

La extensión de la reacción y, por lo tanto, la densidad del fotoinjerto es fácilmente controlable por el tiempo de irradiación [47]. Es decir, se pueden variar la longitud y densidad de las cadenas en la superficie del lecho monolítico. Rohr y *col.* demostraron que el control de la densidad de cadenas injertadas es altamente dependiente del tiempo de irradiación [50]. Esto se puede ilustrar en la Figura III 6.

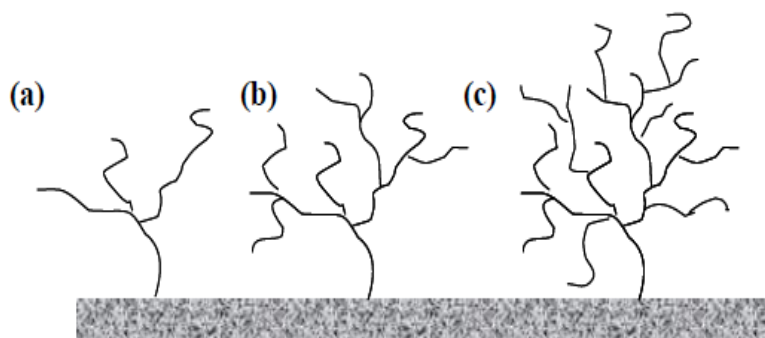


Figure III.6: Esquema de la dependencia de la ramificación de la cadena de injerto y la reticulación a medida que aumenta el tiempo de irradiación ($t(a) < t(b) < t(c)$).

III.1.4. Fases estacionarias quirales en CEC

La adaptación de métodos HPLC al campo de la CEC mencionado anteriormente también es válida para las separaciones quirales, donde se han reportado métodos de CEC utilizando fases móviles quirales, o bien fases estacionarias particuladas o monolíticas quirales obtenidas por incorporación de los selectores quirales ampliamente difundidos en HPLC. Entre ellos, el derivado de celulosa CDMPC fue introducido como selector quiral en una fase estacionaria adsorbida sobre un soporte silíceo [51] y también sobre soportes particulados [52] y monolíticos [53, 55] basados en zirconio. Un inconveniente de las fases adsorbidas físicamente, es la solubilidad del CDMPC en ciertos solventes (acetona, tetrahidrofurano), lo cual puede ser superado por inmovilización química del selector en el soporte. He y *col.* [56] utilizaron columnas capilares monolíticas de sílice con CDMPC inmovilizado para separaciones enantioméricas en CEC.

III.1.5. Referencias

1. Ishii D., *Introduction to microscale HPLC*. VCH-Wiley, New York. (1988)
2. Novotny M, Ishii D., *Microcolumn separations: columns, instrumentation, and ancillary techniques*. Elsevier, Amsterdam. (1985)
3. Liapis AI, Grimes BA. *J Coll Interface Sci* (2000), 229,540.
4. Liapis AI, Grimes BA. *J Chromatogr A* (2000), 877,181.
5. Grimes BA, Liapis AI. *J Coll Interface Sci* (2001), 234, 223.
6. Paul PH, Garguilo MG, Rakestraw DJ. *Anal Chem* (1998), 70, 2459.
7. Rathore, A.S., Horváth, C., *J. Chromatogr. A* (1996), 743, 231-246.
8. Rathore, A.S., Horváth, C., *Anal. Chem.* (1998), 70, 3271-3274.
9. Carney, R. A., Robson, M.M., Bartle, K.D., Myers, P., *J. High Resolut. Chromatogr.* (1999), 22, 29-32.
10. Knox, J.H., *Chromatographia* (1988), 26, 329-337.
11. Tsuda, T., *Anal. Chem.* (1987), 59, 521-523.
12. Rebscher, H., Pyell, U., *Chromatographia* (1994), 38, 737-743.
13. Rozing, P., Dermaux, A., Sandra, P., *Journal of Chromatography Library*, 62, Elsevier Science B.V., (2001), 39-85.
14. Knox, J.H., *J Chromatogr A* (1994), 680, 3.
15. Adam, T., Ludtke, S., Unger, K.K.; *Chromatographia* (1999), 49, S49.
16. Pursch, M., Sander, L.C., *J Chromatogr A* (2000), 887,313.
17. Svec, F., Peters, E.C., Sýkora, D., Fréchet, J.M.J., *J Chromatogr A* (2000), 887,3.
18. Svec, F., Peters, E.C., Sýkora, D., Fréchet, J.M.J., *J High Resolut Chromatogr* (2000), 23,3.
19. Liu, C.Y., *Electrophoresis* (2001), 22, 612.
20. Cikaló, M.G., Bartle, K.D., Robson, M.M., Myers P., Euerby, M.R., *Analyst*, July 1998, Vol. 123 (87R–102R) 87R L.A. Colón.

21. Maloney, T.D., Fermier, A.M., *J. Chromatography A* (2000), 887, 43–53.
22. Pyell, U., *J. Chromatography A*, (2000), 892, 257–278.
23. Tsuda, T., Nomura, K., Nakagawa, G., *J. Chromatogr. A* (1982), 248, 241–247.
24. Yu, L. Q., Yang, C. X., Yan, X. P., *J. Chromatogr. A* (2014), 1343, 188–194.
25. Lu, A., Li, Q., Lü, H., Yu, J., *Sep. Sci. Technol.* (2015), 50, 859–864.
26. Yang, Y., Wu, J., Gou, X., Su, P., *Anal. Methods* (2013), 5, 5753.
27. Aydogan, C., Denizli, A., *Anal. Biochem.* (2014), 447, 55–57.
28. Aydogan, C., Karakoc, V., Denizli, A., *Food Chem.* (2015), 187, 130–134.
29. Aydogan, C., Cetin, K., Denizli, A., *Analyst* (2014), 139, 3790–3795.
30. Aydogan, C., *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* (2015), 976–977, 27–32.
31. Al-Hussin, A., Boysen, R. I., Saito, K., Hearn, M. T., *J. Chromatogr. A* (2014), 1358, 199–207.
32. Xu, L., Cui, P., Wang, D., Tang, C., Dong, L., Zhang, C., Duan, H., Yang, V. C., *J. Chromatogr. A* (2014), 1323, 179–183.
33. Sun, W., Dong, Y., Cui, H., Zhao, H., He, Y., Ding, Y., Li, X., Yuan, Z., *Chromatographia* (2014), 77, 821–828.
34. Xie, H., Wang, Z., Kong, W., Wang, L., Fu, Z., *Analyst* (2013), 138, 1107–1113.
35. Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Science* (1996), 273, 205.
36. Cabrera, K., Lubda, D., Eggenweiler, H.M., Minakuchi, H., Nakanishi, K., *J. High Resolut Chromatogr* (2000), 23, 93.
37. Peters, E.C., Petro, M., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Anal Chem* (1998), 70, 2288.
38. Carrasco-Correa, E.J.; Ramis-Ramos, G. Herrero-Martinez, J.M.; *J. Chromatogr. A* (2013), 1298, 61–67.
39. Yu, C., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Electrophoresis* (2000), 21, 120.
40. Li, Y., Dennis Tolley, H., Lee, M. L., *J. Chromatogr. A*, (2011) 1218, 1399–1408.
41. Zhang, J., Chen, Z., *J. Chromatogr. A* (2018) 1530, 1–18.

42. Hong, T., Yang, X., Hu, Y., Hi, Y., *Anal. Chim. Acta* (2016), 931, 1-24.
43. Wang, Q.C., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Anal. Chem.* (1995), 67, 670.
44. Svec, F., *J. Chromatogr. A*, (2010), 1217, 902.
45. Lammerhofer, M., Gargano, A., *J. Pharmaceutical and Biomedical A.* (2010), 1091-1123.
46. Krenkova, J., Gargano, A., Lacher, N.A., Schneiderheinze, J.M., Svec, F., *J. Chromatogr. A*, (2009), 1216, 6824.
47. Currivan, S., Ph.D. Thesis, Dublin City University, (2012).
48. T. B. Stachowiak, F. Svec, and J. M. J. Fréchet, *Chem. Mater.* (2006), 18, 5950–5957.
49. Eeltink, S., Hilder, E.F., Geiser, L., Svec, F., Fréchet, J.M.J., Rozing, G.P., Schoenmakers, P.J., Kok, W.T., *J. Sep. Sci.*, (2007), 30, 407.
50. Rohr, T., Hilder, E., Donovan, J., Svec, F., Fréchet, J., *Macromolecules*, (2003), 36, 1677.
51. Krause, K., Girod, M., Chankvetadze, B., Blaschke, G., *J. Chromatogr. A* (1999) 837, 51–63.
52. Gwon, J., Jin, J., McNeff, C. V., Park, J. H., *Electrophoresis* (2009) 30, 3846–3854.
53. Kumar, A. P., Park, J. H., *J. Chromatogr. A* (2010), 1217, 4494–4500.
54. Kumar, A. P., Park, J. H., *J. Chromatogr. A* (2011), 1218, 5369–5373.
55. Kumar, A. P., Park, J. H., *J. Chromatogr. A* (2011), 1218, 6548–6553.
56. He, C., Hendrickx, A., Mangelings, D., Smeyers-Verbeke, J., Vander Heyden, Y., *Electrophoresis* (2009), 30, 3796–3803.

III.2. Objetivos

El objetivo de la presente sección es el desarrollo de nuevas columnas capilares monolíticas quirales (CCMQs) orgánicas que puedan ser utilizadas en CEC para la separación de compuestos quirales de interés.

Para ello se proponen los siguientes *objetivos específicos*:

1. Sintetizar monolitos poliméricos orgánicos derivados de metacrilato en el interior de tubos capilares.
2. Optimizar la reacción de fotoinjerto en el monolito de un monómero funcional con carga que permita generar el flujo electroosmótico.
3. Estudiar la adsorción física del selector quiral *tris*(3,5-dimetilfenil) carbamato de celulosa en las columnas monolíticas fotoinjertadas.
4. Optimizar las condiciones electrocromatográficas para la enantioresolución de los compuestos estudiados.

III.3. Experimental

III.3.1. Preparación de las CCMQs para CEC

III.3.1.1. Fabricación de las CCMs

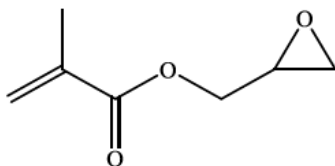
Para la fabricación de las distintas CCMs se emplearon capilares de sílice fundida de 35 cm de largo, 365µm d.e. y 100 µm d.i., con cubierta UV-transparente (Polymicro Technologies, Estados Unidos).

A fin de anclar el polímero monolítico a las paredes internas del capilar, se realizó el mismo pre-tratamiento descrito en la Sección Experimental del Capítulo II [1,2].

A continuación, se describen los componentes de la mezcla polimérica utilizada:

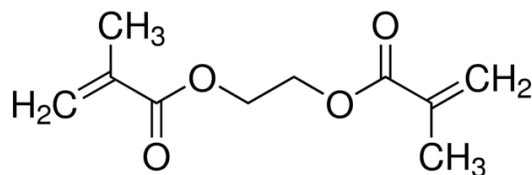
✓ *Monómero Funcional*

Para funcionalizar al monolito polimérico en una posterior reacción química, se empleó el monómero reactivo glicidil metacrilato GMA (98%, Sigma-Aldrich, Alemania) [3,4]:



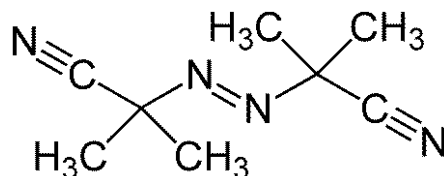
✓ *Agente Entrecruzante*

Se utilizó dimetacrilato de etilenglicol EDMA (99%, Sigma-Aldrich, Alemania); como reactivo entrecruzante de las cadenas del monómero GMA:



✓ **Iniciador térmico**

Como iniciador radicalario de la reacción de polimerización, se empleó α,α' -azobisisobutironitrilo AIBN (98%, Fluka, Suiza) [1-8].



✓ **Solventes Porogénicos**

Como solventes formadores de la estructura macroporosa del monolito, se empleó una mezcla binaria compuesta por ciclohexanol (98%, Carlo Erba, Italia) y 1-dodecanol (99%, Sigma-Aldrich, Alemania).

La mezcla de polimerización fue preparada con una relación fija de monómeros/ solventes porogénicos: 25/75 % p/p, utilizando 20% p/p de GMA, 5% p/p de EDMA y una mezcla binaria de solventes porogénicos constituida por 70% p/p ciclohexanol y 5% p/p 1-dodecanol; con AIBN (1% p/p con respecto a los monómeros) como iniciador radicalario [5].

La mezcla fue pesada en un vial de 5 mL utilizando una balanza analítica (Adventurer Pro, Ohaus, Estados Unidos). Posteriormente, se usó un baño de ultrasonido (Transsonic Digital S, Elma, Alemania) para la disolución de los reactivos durante unos 10 minutos y luego se purgó 10 minutos con nitrógeno.

Como se mencionó anteriormente, la fabricación de las columnas se realizó en capilares transparentes al UV de 35 cm de largo, de los cuales se rellenó 25 cm con la mezcla de polimerización mediante una jeringa Hamilton tipo luer-lock modelo 5190-1530 (Agilent, Estados Unidos) de 1mL, con un émbolo con punta de polímero (PTFE).

Luego se taparon las puntas con septas de goma y se verificó la ausencia de burbujas en su interior por medio de una lupa.

Seguidamente, se llevó a cabo la fotoionización para iniciar la polimerización mediante irradiación en cámara (modelo CL 1000 UVP, Estados Unidos) equipada con lámpara UV (254 nm) a 0.9 J cm^{-2} durante 15 minutos.

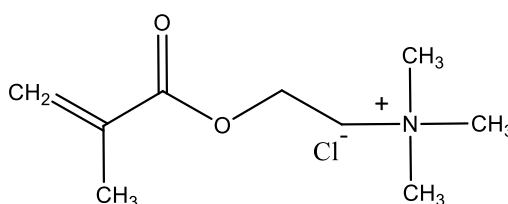
Luego se lavaron las columnas con MeOH durante 60 minutos empleando una bomba de HPLC (Serie 1100, Agilent Technologies, Estados Unidos), para remover los restos de los monómeros que quedaron sin reaccionar.

III.3.1.2. Fotoinjerto

Para fotoinjertar las CCMs de poli(GMA-co-EDMA), se utilizaron los siguientes reactivos:

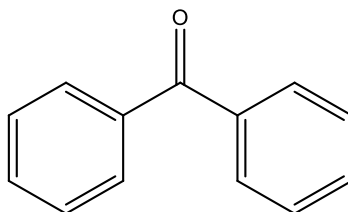
✓ *Monómero post-funcional*

Se empleó una solución 75% p/p de cloruro de [2-(metacrililoiloxi)etil] trimetilamonio (META) (Aldrich, Estados Unidos) en agua. Este reactivo proporciona la carga necesaria en el polímero para generar el EOF.



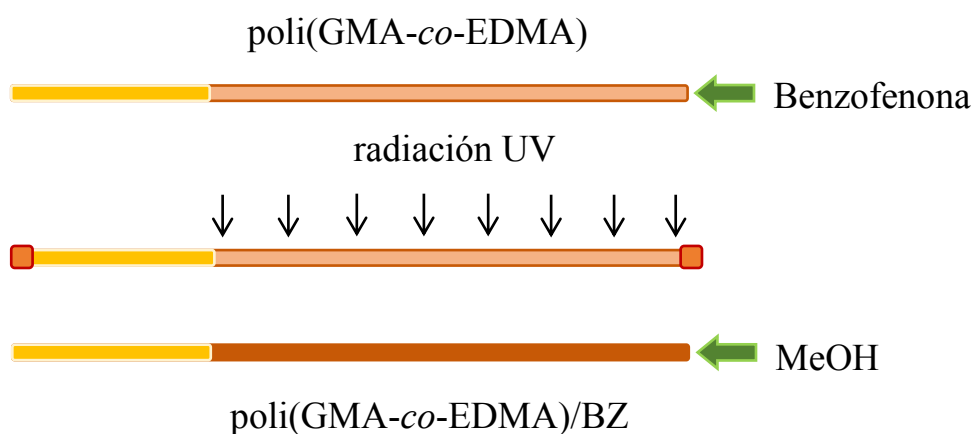
✓ *Fotoiniciador*

Como fotoiniciador para generar los radicales libres en la superficie del monolito, se utilizó benzofenona (Aldrich, Estados Unidos):

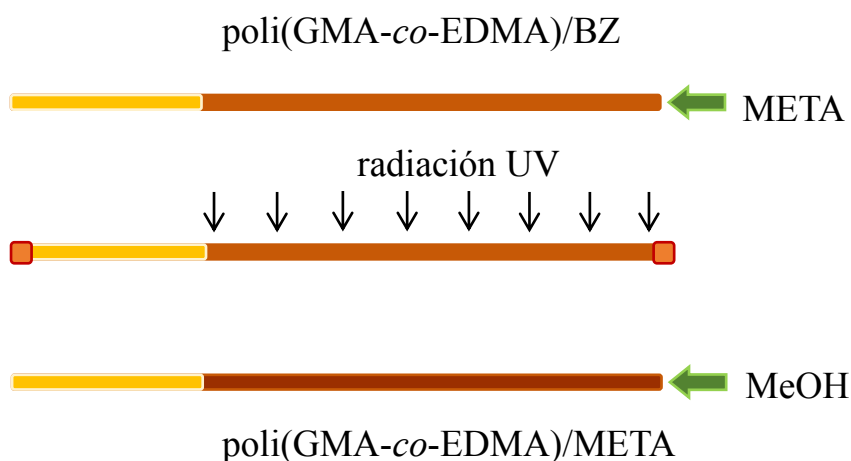


La funcionalización post-polimerización mediante fotoinjerto de las columnas de poli(GMA-*co*-EDMA) se realizó usando un proceso de dos etapas como se describió en la Sección Introdutoria [6,7]. Para ello se utilizó una bomba de jeringa (modelo 100 KD Scientific, Estados Unidos) para pasar de manera continua a un flujo de 0.06 mL/h durante 60 min los siguientes reactivos:

- 1) Solución de benzofenona al 5%p/p en MeOH, irradiación UV a $0,99 \text{ Jcm}^{-2}$ durante 10 min y lavado con MeOH mediante una bomba de HPLC.



- 2) Solución de META (1,5%; 7,5% p/p ó 15% p/p) en MeOH, irradiación UV a $0,99 \text{ Jcm}^{-2}$ durante 10 min. y lavado con MeOH mediante una bomba de HPLC.



III.3.1.3. Recubrimiento *in situ* del lecho monolítico con CDMPC

El selector quiral elegido para la preparación de las CCMQs fue el derivado de polisacárido (sintetizado, caracterizado y descrito en el Capítulo II), *tris*(3,5-dimetilfenil carbamato) de celulosa (CDMPC) cuya estructura química se muestra en la Figura III.7.

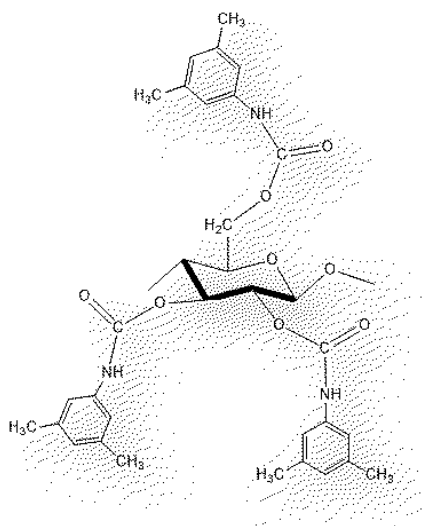


Figura III.7: Estructura química del derivado CDMPC.

Se prepararon soluciones de distinta concentración (6, 15, 40 y 60 mg/mL) de CDMPC-2 (87% de rendimiento en la reacción de síntesis) empleando acetona grado HPLC (Macron Chemicals, Estados Unidos) como solvente [8]. Cada solución se sonicó hasta la disolución total del sólido, empleando el mismo equipamiento y material que para el fotoinjerto.

Las columnas capilares monolíticas poli(GMA-*co*-EDMA)/META fotoinjertadas, se lavaron con acetona empleando una bomba de HPLC durante 60 minutos a un caudal de 0,05 mL/min.

Luego, las distintas disoluciones del selector quiral se hicieron circular a través de las CCMs mediante una bomba de jeringa operada a un caudal de 60 μ L/h durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, las CCMs con el selector quiral así adsorbido (CCMQs) fueron lavadas durante unos 60 min con la fase móvil a utilizar en el sistema electrocromatográfico.

III.3.2. Condiciones electrocromatográficas

Para las separaciones electrocromatográficas se emplearon ACN grado HPLC (J.T. Baker, México) y agua desionizada MilliQ (Millipore). También, ácido acético glacial (99,7%, Sigma-Aldrich, Alemania), acetato de sodio (Barcelona, España), fosfato ácido de sodio y fosfato diácido de sodio (VWR, Radnor, Boston, Estados Unidos) para preparar soluciones amortiguadoras.

Las fases móviles utilizadas fueron mezclas de 5mM buffer de pH 3,6 ó 5mM buffer de pH 7,0 con distintas proporciones de ACN, siendo previamente desgasificadas para su uso.

Se empleó uracilo (Sigma Aldrich, Estados Unidos) como marcador del EOF. Todos los analitos racémicos (Figura III.8) se prepararon con una concentración de 1000ppm, utilizando como solvente de muestra el mismo solvente de la fase móvil.

Se utilizó un instrumento HP3D-CE Agilent, equipado con un detector DAD, ambos extremos de los capilares fueron presurizados con nitrógeno. Los datos fueron tomados por medio del software ChemStation (Rev.A.10.01, Agilent).

Luego de colocar cada columna en el equipo, se equilibró con la fase móvil a 25 °C aplicando voltajes progresivos en el rango de 5 a 25 kV y presurizando a 10 bar ambos viales, hasta observar línea base y corriente estables. Esta etapa de equilibrado tuvo una duración de 45-60 min, dependiendo de las características de flujo de cada columna.

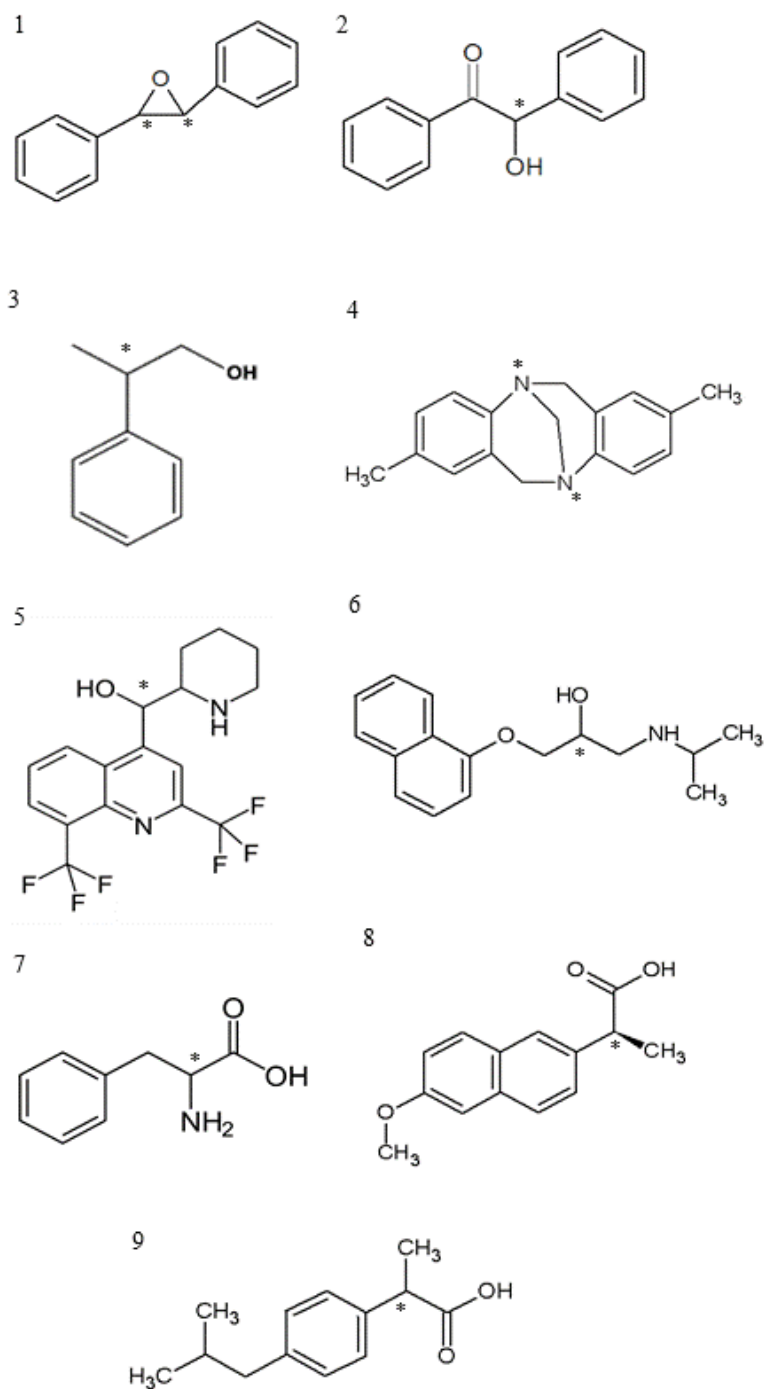


Figura III.8: Estructura química de los analitos quirales estudiados: 1) óxido de *trans*-estilbeno (TSO); 2) benzoína; 3) 2-fenil-1-propanol; 4) base de Tröger (TB); 5) mefloquinona; 6) propranolol; 7) fenilalanina; 8) naproxeno y 9) ibuprofeno. El centro quiral se indica con “*”.

III.3.3. Referencias

1. Peters, E.C., Petro, M., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Anal. Chem* (1997), 69, 3646-3649.
2. Peters, E.C., Petro, M., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Anal. Chem* (1998), 70, 2288-2295.
3. Perrin, D.D., Armarego, W.L.F., *Purification of laboratory chemicals*, 6^{ta} edición, Pergamon Press, Oxford, (1988).
4. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/search.cgi>
5. Carrasco-Correa, E.J., Ramis-Ramos, G., Herrero-Martínez, J.M., *J. Chromatogr. A* (2013), 1298, 61-67.
6. Stachowiak, T. B., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *Chem. Mater.*, (2006), 18, 5950 – 5957.
7. Currivan, S., Connolly, D., Paull, B., *J. Sep. Sci.*, (2015), 38, 3795 – 3802.
8. Ling, F., Brahmachary, E., Xu, M., Svec, F., Fréchet, J.M.J., *J. Sep. Sci.* (2003), 26, 1337-1346.

III.4. Resultados y discusión

Dadas las ventajas de las CCMQs mencionadas en la sección introductoria de este capítulo, se trabajó con monolitos poliméricos orgánicos modificados químicamente mediante la técnica de fotoinjerto a los que posteriormente se los recubrió con el selector quiral CDMPC.

III.4.1. Preparación de las CCMs

Se prepararon columnas monolíticas basadas en GMA y EDMA fotopolimerizadas empleando el procedimiento optimizado por Carrasco-Correa *y col.* [3]. Para ello, se pesaron los precursores correspondientes, como se indica en la Tabla III.1.

Tabla III.1: Composición de la mezcla polimérica estudiada.

	% p/p	Obtenido % p/p
GMA	20.00	19.28
EDMA	5.00	4.92
ciclohexanol	70.00	69.95
1-dodecanol	5.00	5.05
AIBN	0.25	0.24

Las columnas monolíticas fabricadas bajo estas condiciones mostraron una muy buena permeabilidad (poros \approx 1 a 3 μ m), lo que facilitó enormemente las etapas posteriores para la modificación de la superficie a través de los grupos epóxidos del GMA (Figura III.9).

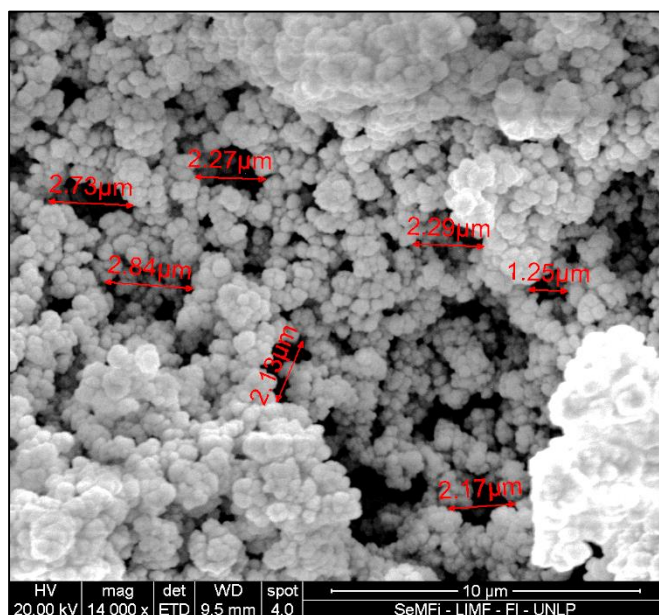


Figura III.9: Fotografía SEM (14000 X) del monolito poli(GMA-co-EDMA).

III.4.1.1. Estudio de las condiciones de fotoinjerto

Para incorporar al monolito sintetizado el monómero META, necesario para la generación del EOF, se utilizó un protocolo de fotoinjerto de dos etapas, donde el poli(GMA-co-EDMA) se modificó de acuerdo al procedimiento experimental detallado en la Sección III.3.1.2.

Recubrimiento con el selector quiral

En las condiciones iniciales de fotoinjerto, mencionadas anteriormente, se realizó el depósito del selector CDMPC sobre el monolito. Se estudiaron dos variables, el tiempo de recubrimiento y la concentración de la solución CDMPC, con el objetivo de obtener FEQs estables y reproducibles. Para ello, se prepararon soluciones que contenían diferentes cantidades de CDMPC disuelto en acetona hasta una concentración de 60 mg/mL.

Teniendo en cuenta la alta viscosidad de las soluciones de este polisacárido, el

tiempo de depósito debería ser lo suficientemente largo para lograr una columna monolítica recubierta de manera uniforme con cantidad suficiente del selector quiral para retener y discriminar enantioméricamente los analitos. Por lo tanto, un caudal de circulación bajo podría favorecer la adsorción de selector quiral de manera homogénea.

El tiempo de recubrimiento comenzó a contarse cuando las gotas (recogidas al final de la columna) que contenían la disolución del selector quiral dieron un precipitado color amarillo en la solución de Lugol. De esta manera, la reacción positiva del reactivo Lugol con el polisacárido indicó que la solución de CDMPC pasó al menos un volumen de columna. Se consideró un tiempo de 60 min (41 volúmenes de columna) como el adecuado para proporcionar una distribución homogénea sobre la matriz monolítica y reproducibilidad satisfactoria de columna a columna.

Las concentraciones del selector CDMPC se variaron entre 6 a 60 mg/mL y se evaluó el rendimiento electrocromatográfico de las columnas preparadas mediante la inyección de la base de Tröger (TB) como analito de prueba. En la Tabla III.2, se muestran los factores de retención, las enantioselectividades y enantioresoluciones logradas con las diferentes columnas a medida que aumenta el grado de depósito.

Se observa un aumento del factor de retención, k , en la columna A2 donde la concentración del selector quiral, y por lo tanto el depósito, fueron menores. Sin embargo, aumentos subsiguientes de CDMPC fueron disminuyendo la retención inicial lograda, lo cual podría deberse a que los mesoporos comienzan a ocluirse con el selector quiral disminuyendo el área superficial. A pesar de ello, la enantioselectividad y enantioresolución aumentaron como consecuencia de un mayor depósito.

Por otra parte, se observó una disminución de la eficiencia de la columna (N) al aumentar la concentración de recubrimiento de CDMPC. Se han informado resultados similares para monolitos basados en sílice recubiertos con este selector quiral u otros derivados de polisacáridos [6]. Este comportamiento, puede ser atribuido a una disminución en la velocidad de transferencia de masa entre la fase móvil y la estacionaria, lo que se manifiesta en un ensanchamiento de los picos [7,8].

Dado que la mejor enantioresolución se logró con 60 mg/mL, se usó esta concentración de selector quiral para la preparación de las siguientes CCMQs.

Tabla III.2: Datos electrocromatográficos para la enantioseparación de la base de Tröger (TB) para las distintas concentraciones de CDMPC, manteniendo constante la concentración del monómero fotoinjertado 1,5%p/p META. Detección a 214 nm. Voltaje aplicado 10 kv.

Columna	CDMPC (mg/mL)	k_{1*}	k_{2*}	α	Rs	N_1	$N_1 (m^{-1})^a$	N_2	$N_2 (m^{-1})^a$
A1	0	2,49		1,00		7686	30744		
A2	6	3,96	4,05	1,02	0,20	2654	10616	1776	7104
A3	15	3,71	3,95	1,06	0,47	2094	8376	1086	4344
A4	40	3,26	3,50	1,07	0,53	1808	7232	1285	5140
A5	60	2,43	2,69	1,11	0,86	1341	5364	1045	4180

* los subíndices "1" y "2" designan al primer y segundo pico eluido del par de enantiómeros, respectivamente.

^a número de platos por metro.

Modificación de la superficie monolítica

En todas las CCMs ensayadas, la inmovilización de CDMPC en la matriz monolítica es favorecida por las fuertes interacciones atractivas mediante enlaces de hidrógeno, dipolares y/o hidrofóbicas entre el selector quiral y la red polimérica [9].

La incorporación del monómero ionizable (META) necesaria para crear el EOF, también puede aportar a las interacciones intermoleculares antes mencionadas, por lo que puede presumirse que el aumento de su concentración contribuirá a mejorar la enantioselectividad. Por lo tanto, se estudió el efecto de la concentración de META en la solución utilizada para el fotoinjerto, manteniendo constante el tiempo de irradiación.

En la Tabla III.3, se puede observar que al aumentar el contenido de META desde 1,5 hasta 15%p/p, se genera una reducción en los valores de EOF. Esta disminución podría deberse a un depósito excesivo de CDMPC sobre la superficie monolítica, lo que reduciría los grupos amonio disponibles.

Tabla III.3: Valores de EOF y enantioseparación de TB con columnas con distintas concentraciones de META fotoinjertado (igual contenido de CDMPC). Detección a 214 nm. Voltaje aplicado 10 kv.

Columna	META (%p/p)	EOF ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	N₁	N₂	α	<i>Rs</i>
A5	1,5	2,19	1341	1045	1,11	0,9
A6	7,5	2,15	1358	600	1,27	1,4
A7	15	1,34	1146	800	1,19	1,1

Por otro lado, de Tabla III.3 se puede observar que a medida que aumenta el contenido de META, la eficiencia obtenida con el enantiómero menos retenido (N₁) cambia en sentido opuesto al otro enantiómero (N₂). Sin embargo, la eficiencia promedio disminuye al pasar de 1,5 a 15% p/p META, lo que puede atribuirse a la lenta difusión de

TB dentro del selector quiral. Finalmente, la selectividad y en consecuencia, la resolución muestran un valor máximo con 7,5%p/p META.

El efecto de la concentración de META sobre la separación enantiomérica de TB se muestra en Figura III.10. Se puede observar que el aumento en el contenido de META aumenta la retención, lo que demuestra que este monómero ionizable no sólo influye en el EOF, sino que aporta interacciones intermoleculares con el analito, en este caso probablemente a través de interacciones dispersivas, dipolares y puentes de H (el analito está protonado al pH de la fase móvil y podría formar puentes de H con los átomos de O presentes en el monolito).

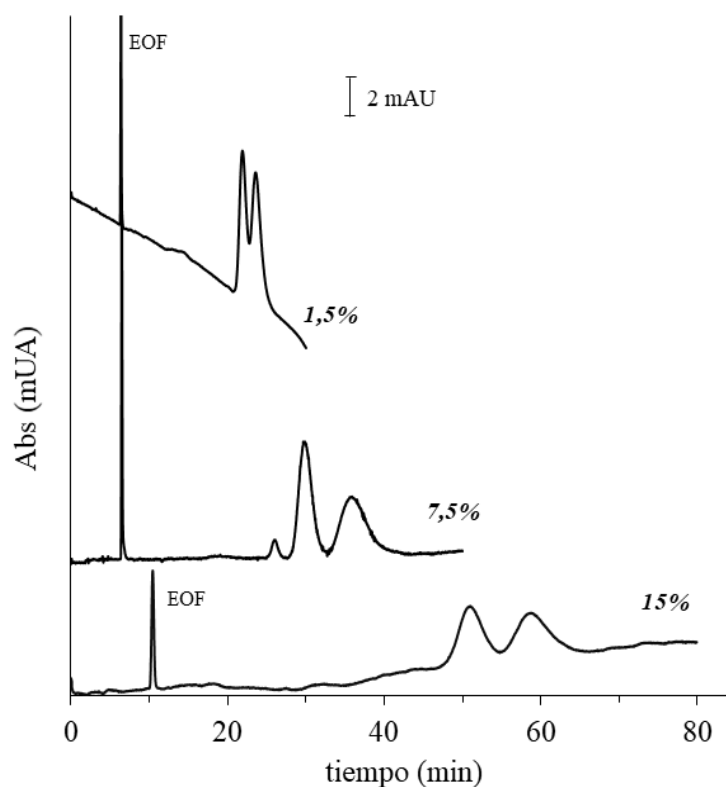


Figura III.10: Influencia del contenido de META sobre la enantioseparación de TB. Fase móvil: 35:65% (v/v) ACN: buffer acetato/acético 5 mM (pH=3,6). Detección a 214 nm. Voltaje aplicado: 10 kV.

Es importante aclarar que las columnas fabricadas con 15%p/p de META depositadas con 40 y 60 mg/mL de CDMPC, presentaron rupturas o fragmentaciones del lecho monolítico en varias secciones dentro del capilar (Figura III.11).

a)



b)



Figura III.11: Fotografías obtenidas mediante una lupa con aumento de 3X, de las columnas monolíticas fotoinjertadas con 15% p/p META, a) 40 mg/mL; b) 60 mg/mL de CDMPC.

Este inconveniente podría deberse a la alta presión generada por el pasaje a través de las CCMs de las soluciones de mayor concentración y por lo tanto de mayor viscosidad de CDMPC. Con estas concentraciones de selector quirál, en sólo 2 columnas de un total de 10 se pudo realizar el depósito de manera adecuada. Estas también podrían ser causales de la baja performance obtenida de las columnas monolíticas con un 15% p/p META.

En vista de todos estos resultados, se seleccionaron monolitos fotoinjertados con 7,5% p/p de META para los siguientes experimentos.

III.4.2. Optimización de la enantioresolución de compuestos quirales

III.4.2.1. Efecto del modificador orgánico

Dado que el contenido del modificador orgánico en la fase móvil influye en la enantioseparación, se estudió el impacto de ACN en la retención, eficiencia y resolución de las columnas monolíticas fotoinjertadas con 7,5% p/p de META y posteriormente recubiertas con 60 mg/mL CDMPC.

En la Figura III.14 se muestra el efecto del contenido de ACN en la discriminación quiral de la TB. Los resultados mostraron que el factor de retención y la resolución disminuyeron al aumentar de un 30 a un 40% v/v de ACN en la FM, lo que sugiere un mecanismo equivalente al de RP-HPLC, donde las interacciones hidrofóbicas entre el selector quiral y el analito son las predominantes [9,10,11].

Como se puede observar en la Figura III.12, el mejor compromiso entre la enantioseparación, resolución y el tiempo de análisis se logró con un 35% v/v de ACN en la fase móvil.

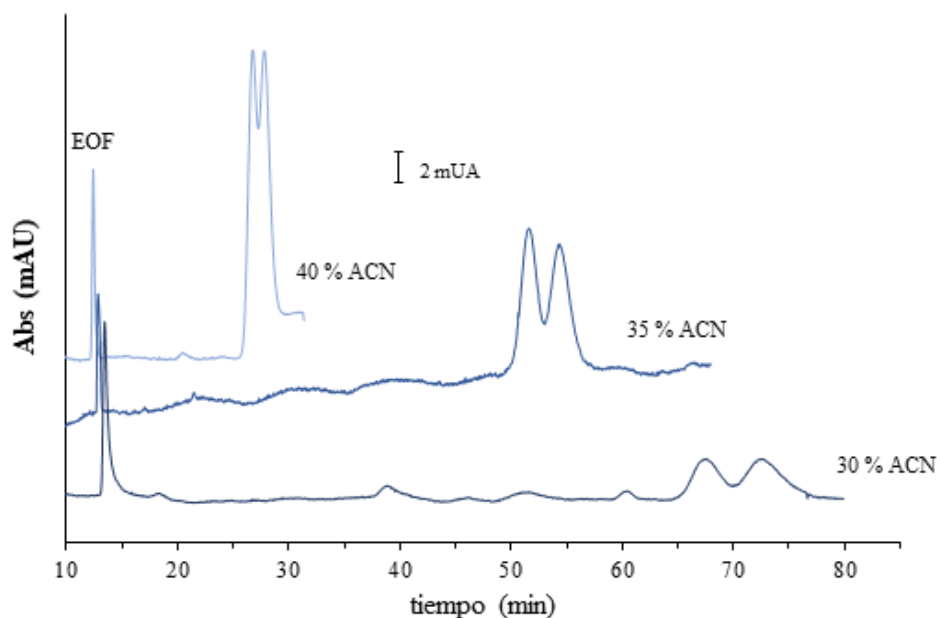


Figura III.12: Efecto del contenido de ACN sobre la enantioresolución de TB. Fase móvil: ACN: buffer acetato/acético 5 mM (pH=3,6). Detección a 214 nm. Voltaje aplicado: 10 kV.

III.4.2.2. Evaluación de la performance de la CCMQ

Se evaluó la capacidad de enantioconocimiento de las columnas capilares monolíticas quirales fabricadas con las condiciones optimizadas (7,5%p/p META y 60 mg/mL del selector quiral). Para ello, se inyectaron varios analitos quirales de distinta naturaleza química (ácidos, básicos y neutros) empleando fases móviles con diferentes valores de pH, según las características ácido-base de los analitos (Figura III.13).

Los datos electrocromatográficos obtenidos se muestran en la Tabla III.4 para todos los analitos quirales estudiados. Se puede observar que todos los racematos lograron resolverse, con valores de enantioresolución que variaron entre 0,5 y 4,2. De los 9 racematos inyectados, 3 se resolvieron a la línea de base con $R_s > 1,5$ y el ibuprofeno se resolvió casi completamente ($R_s = 1,2$).

Tabla III.4: Factores de retención (k), selectividad (α), resolución (R_s) y eficiencia (N) para los analitos quirales estudiados. CCMQ A7 (7,5%p/p META, 60mg/ml CDMPC). Detección a 214 nm. Voltaje aplicado 10 kv.

Analitos quirales	k_1^*	k_2^*	α	R_s	N_1	$N_1 (m^{-1})^a$	N_2	$N_2 (m^{-1})^a$
óxido de trans-stilbeno	5,38	7,58	1,41	2,44	5875	23500	1600	6400
benzoina	3,18	3,33	1,04	0,56	5050	20200	4000	16000
2-fenil-1-propanol	5,67	10,57	1,87	4,22	1675	6700	1725	6900
base de Tröger	3,54	4,26	1,20	1,75	2775	11100	2225	8900
mefloquinona	4,74	4,98	1,05	0,33	775	3100	625	2500
propranolol	7,28	7,58	1,04	0,41	5175	20700	925	3700
ibuprofeno	0,41	0,93	2,20	1,23	400	1600	400	1600
naproxeno	1,91	2,07	1,08	0,64	2900	11600	2800	11200
fenilalanina	4,62	4,72	1,02	0,67	15750	63000	27575	110300

* Los subíndices "1" y "2" designan al primer y segundo pico eluido del par de enantiómeros, respectivamente.

^a número de platos por metro.

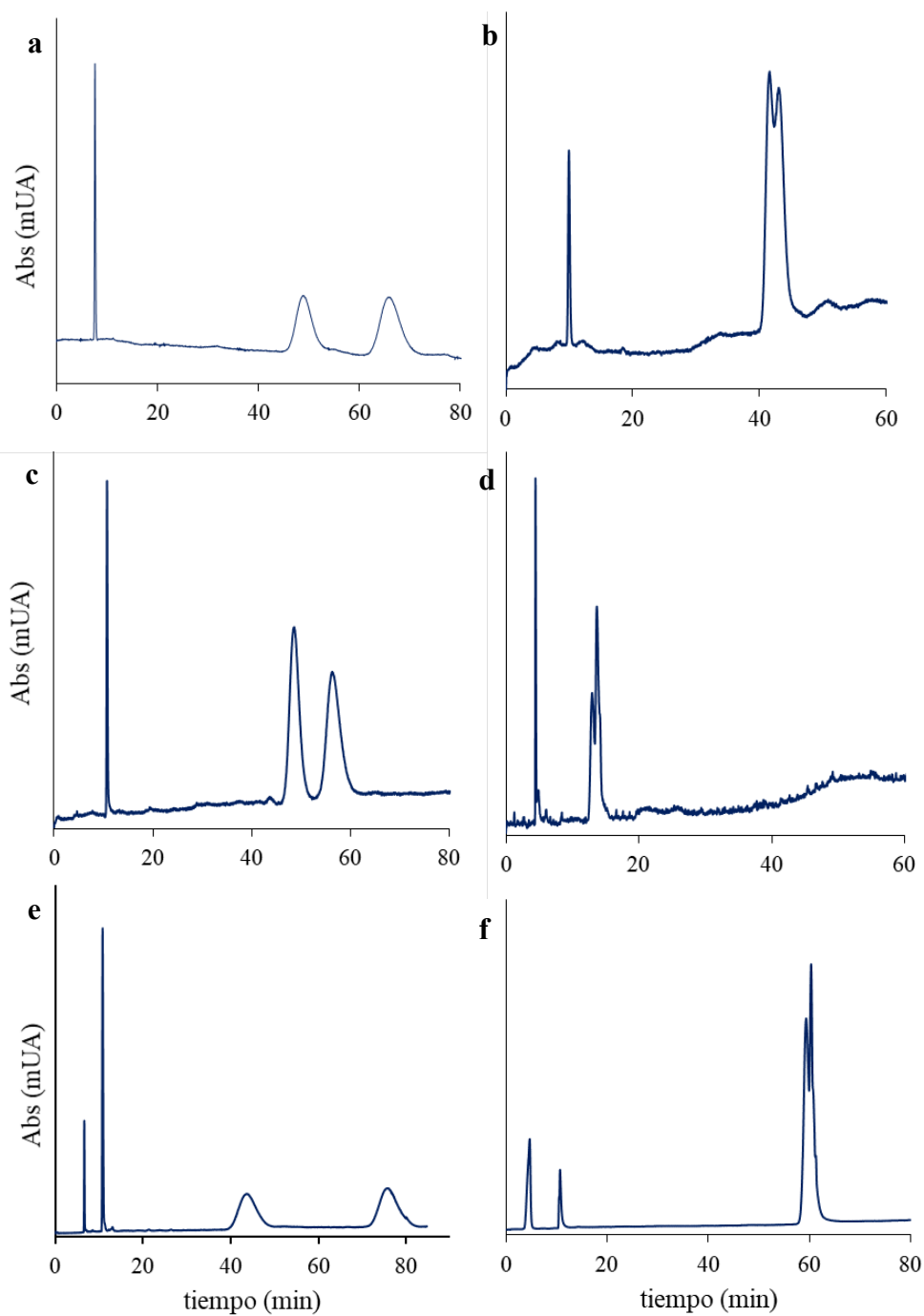


Figura III.13: Cromatogramas de los racematos estudiados en sus condiciones óptimas de enantioseparación. **FM-1:** 35:65 (v/v) ACN: buffer fosfato 5mM (pH=7,0) **a)** TSO, **b)** BZ, **c)** TB, **d)** naproxeno; **FM-2:** 35:65 (v/v) ACN: buffer acetato/acético 5mM (pH=3,6) **e)** 2-fenil-1-propanol, **f)** fenilalanina. Detección a 214 nm. Voltaje aplicado 10 kv.

Se realizó una comparación en términos de la capacidad de reconocimiento quiral de las CCMQs preparadas con datos de la literatura donde se han empleado columnas basadas en CDMPC. He *y col.* [13] emplearon CCMs de sílice sobre las que inmovilizaron CDMPC a través de una policondensación intermolecular o copolimerización radical. Se estudiaron en común con Ref. 13 los siguientes analitos: TB, Bz, propranolol y TSO. Los dos primeros analitos mostraron valores de Rs semejantes, en cambio para propranolol y TSO se alcanzaron valores de Rs de 0,41 y 2,44, respectivamente, mientras que en dicho trabajo no lograron la enantioresolución.

Por otra parte, Ou *y col.* inmovilizaron CDMPC sobre un monolito híbrido de sílice [11], obteniendo mediante CEC sólo la enantioresolución de benzoína de 9 analitos ensayados.

Asimismo, Dong *y col.* prepararon monolitos basados en poliacrilamida con CDMPC [9] inmovilizado, obteniendo valores comparables, o incluso mejores que los encontrados en el presente trabajo para los analitos TB y Bz.

En cualquier caso, debemos remarcar que, si bien las CCMQs desarrolladas permitieron una separación incipiente de compuestos básicos tales como propranolol y mefloquina, también permitieron resolver parcialmente compuestos muy difíciles de enantioseparar en condiciones de fase inversa, tales como fenilalanina, ibuprofeno, naproxeno y 2-fenil-1-propanol, lo que demuestra la alta capacidad de enantioconocimiento de las fases estacionarias monolíticas de metacrilato recubiertas del derivado quiral de celulosa que se han preparado.

III.4.2.3. Estudios de robustez de las CCMQs

Finalmente, se estudió la repetibilidad (intra día) y reproducibilidad determinadas a partir de los tiempos de retención para el analito TB inyectado en las columnas fotoinjertadas con META y con recubrimiento posterior con CDMPC. La repetibilidad entre corridas (*run-to-run*) se evaluó a partir de series de tres inyecciones del analito TB, utilizando las condiciones de fase móvil indicadas anteriormente. La Figura III.14 muestra una buena repetibilidad entre inyecciones, con una desviación estándar relativa (RSD) de 0,4% en los tiempos de retención y un 3,3% en la enantioresolución.

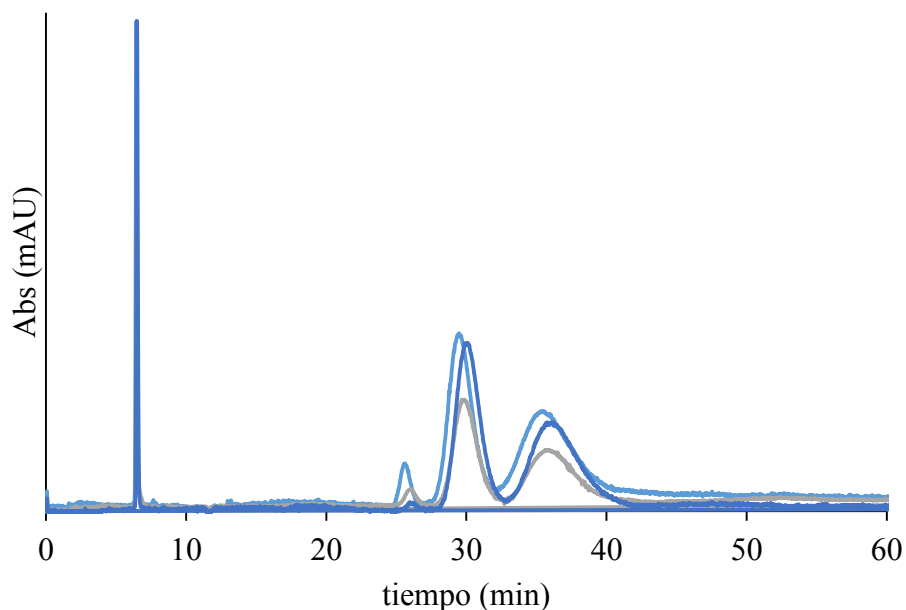


Figura III.14: Repetibilidad entre inyecciones para la enantioseparación de TB. Columna A6 (7,5 %p/p META; 60 mg/mL CDMPC).

La reproducibilidad del proceso de preparación de la columna (reproducibilidad entre columnas) fue determinada empleando otra columna fabricadas con el mismo proceso indicado anteriormente. Los RSD% del tiempo de retención y la resolución, fueron inferiores al 1,9% y al 10,6%, respectivamente, lo que demostró una reproducibilidad satisfactoria para la preparación de las columnas.

Por otra parte, la estabilidad de las CCMQs preparadas fue estudiada a través del factor de retención determinado durante por lo menos 100 inyecciones en iguales condiciones experimentales. Se observó una disminución mínima (menor al 2%) en el factor de retención lo cual permite concluir que las columnas preparadas tienen una estabilidad muy aceptable.

III.4.3. Referencias

1. Lämmerhofer M, Svec F, Fréchet JMJ; *Anal Chem* (2000) 72, 4623.
2. Peters E.C., Viklund C., Irgum, K., Svec, F., Fréchet J.M.J., *Chem.Mater.*, (1996) 8, 744.
3. Carrasco-Correa, E.J., Ramis-Ramos, G.,Herrero-Martínez, J M. *J. Chromatogr. A* (2013) 1298, 61-67.
4. Connolly, D., Paull, B., *J. Sep. Sci.* (2009), 32, 2653–2658.
5. Vonk, R. J., Wouters, S., Barcaru, A., Vivó-Truyols, G., Eeltink, S., de Koning, L. J., Schoenmakers, P. J., *Anal. Bioanal. Chem.* (2015), 3817–3829.
6. Chankvetadze, B., Kubota, T., Ikai, T., Yamamoto, C., Tanaka, N., Nakanishi, K., Okamoto, Y., *J. Sep. Sci.* (2006), 29, 1988–1995.
7. Lv, C., Liu, Y., Mangelings, D., Vander Heyden, Y., *Electrophoresis* (2011), 32, 2708–2717.
8. Fanali, S., D’Orazio, G., Lomsadze, K., Chankvetadze, B., *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* (2008), 875, 296–303.
9. Dong, X., Wu, R., Dong, J., Wu, M., Zhu, Y., Zou, H., *Electrophoresis* (2008), 29, 919–927.
10. Qin, F., Liu, Y., Chen, X., Kong, L., Zou, H. *Electrophoresis* (2005), 26, 3921–3929.
11. Ou, J., Lin, H., Tang, S., Zhang, Z., Dong, J., Zou, H., *J. Chromatogr. A* (2012), 1269, 372–378.
12. Qin, F., Xie, C., Feng, S., Ou, J., Kong, L., Ye, M., Zou, H., *Electrophoresis* (2006), 27, 1050–1059.
13. He, C., Hendrickx, A., Mangelings, D., Smeyers-Verbeke, J., Heyden, Y.V. *Electrophoresis* (2009), 30, 3796–3803.

III.5. Conclusiones parciales

En este Capítulo se mostró la metodología de preparación de columnas capilares monolíticas quirales para CEC, así como su capacidad de enantioconocimiento. A partir de los resultados obtenidos, se pueden obtener las siguientes conclusiones:

- ✓ Se lograron fabricar nuevas columnas de poli(GMA-*co*-EDMA) y fotoinjertar con concentraciones optimizadas del monómero ionizable META.
- ✓ Se logró adsorber el selector quiral derivado de celulosa, CDMPC, sobre la superficie de los monolitos, así como determinar la concentración óptima a depositar (60mg/mL).
- ✓ Se lograron enantioresolver (total o parcialmente) varios analitos de diferente naturaleza química, luego de optimizar las condiciones de separación (35%v/v de ACN en la fase móvil, a diferentes pHs según la naturaleza ácida, básica o neutra de los analitos).

Conclusiones generales

En el presente trabajo de Tesis se desarrolló una metodología de preparación de columnas capilares monolíticas quirales para ser empleada en HPLC a escala miniaturizada y en CEC.

A partir de los resultados obtenidos, se pueden señalar las siguientes conclusiones:

- ❖ Se lograron obtener por primera vez columnas capilares monolíticas de poli(HEMA-*co*-EDMA) con adecuada morfología estructural para su uso en HPLC a escala miniaturizada. Se recubrieron con *tris*(3,5-dimetilfenil) carbamato de celulosa, sintetizado y caracterizado en nuestro laboratorio, como selector quiral.
- ❖ Se logró enantioseparar varios analitos quirales de interés biológico en cortos tiempos de análisis. Las columnas capilares preparadas mostraron buena performance cromatográfica.
- ❖ La columna capilar monolítica de poli(HEMA-*co*-EDMA) mostró buena performance cromatográfica aún para la separación de moléculas pequeñas.
- ❖ Se fabricaron por primera vez columnas de poli(GMA-*co*-EDMA) fotoinjertadas con un monómero ionizable y posterior adsorción del selector quiral derivado de celulosa para ser utilizadas en CEC.
- ❖ Se lograron enantioresolver (total o parcialmente) varios analitos de diferente naturaleza química.

Contribuciones Científicas

I. Publicaciones en revistas científicas

a) Trabajo publicado relacionado a la Tesis

- ✓ “Photografted methacrylate-based monolithic columns coated with cellulose *tris*(3,5-dimethylphenylcarbamate) for chiral separation in CEC”
Echevarría R.N; Carrasco-Correa E.J.; Keunchkarian, S.; Reta, M.; Herrero-Martínez J.M. (2018). DOI: 10.1002/jssc.201701234
Special Issue on “Chiral Separations” in the Journal of Separation Science (JSS) dedicated to Prof. Benedetto Natalini on the occasion of his 70th birthday.

Received: 23 October 2017 | Revised: 20 January 2018 | Accepted: 20 January 2018
DOI: 10.1002/jssc.201701234

RESEARCH ARTICLE

JOURNAL OF
SEPARATION SCIENCE

Photografted methacrylate-based monolithic columns coated with cellulose *tris*(3,5-dimethylphenylcarbamate) for chiral separation in CEC

Romina Noel Echevarría¹ | Enrique Javier Carrasco-Correa² | Sonia Keunchkarian¹ |
Mario Reta¹ | José Manuel Herrero-Martínez² 

¹Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Santa Rosa, La Pampa, Argentina

²Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Burjassot, Valencia, Spain

Correspondence

Dr. José Manuel Herrero Martínez,
Department of Analytical Chemistry,
University of Valencia, Burjassot, Valencia,
Spain.
Email: jmherrer@uv.es

A chiral capillary monolithic column for enantiomer separation in capillary electrochromatography was prepared by coating cellulose *tris*(3,5-dimethylphenylcarbamate) on porous glycidyl methacrylate-*co*-ethylene dimethacrylate monolith in capillary format grafted with chains of [2(methacryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride. The surface modification of the monolith by the photografting of [2(methacryloyloxy)ethyl] trimethylammonium chloride monomer as well as the coating conditions of cellulose *tris*(3,5-dimethylphenylcarbamate) onto the grafted monolithic scaffold were optimized to obtain a stable and reproducible chiral stationary phase for capillary electrochromatography. The effect of organic modifier (acetonitrile) in aqueous mobile phase for the enantiomer separation by capillary electrochromatography was also studied.

- ✓ “Development of monolithic capillary chiral columns based on cellulose *tris*(3,5-dimethyl phenyl carbamate) as stationary phase for micro-HPLC...”.
Echevarría R.N; Keunchkarian, S.; Reta, M.
Manuscrito en preparación.

b) Trabajo publicado relacionado a separaciones quirales (fuera del plan de Tesis)

“Chiral ligand-exchange chromatography with Cinchona alkaloids. Exploring experimental conditions for enantioseparation of α -amino acids.”

R.N. Echevarría; C. Franca; M. Tascón; C. Castells; S. Keunchkarian.

Microchemical Journal 129 (2016) 104-110. ISSN:0026-265X.

Microchemical Journal 129 (2016) 104-110



Contents lists available at ScienceDirect

Microchemical Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/microc



Chiral ligand-exchange chromatography with *Cinchona* alkaloids.
Exploring experimental conditions for enantioseparation of
 α -amino acids



Romina N. Echevarría^a, Carlos A. Franca^b, Marcos Tascón^a, Cecilia B. Castells^a, Sonia Keunchkarian^{a,*}

^a Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, CONICET, Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA) y División Química Analítica, Calle 47 esq. 115, La Plata B1900AJL, Argentina

^b Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, CONICET, Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR), Bv. 120 No. 1460 (1900), La Plata B1900AJL, Argentina

c) Otros

"Development of an ionic liquid based-dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of antichagasic drugs in human breast milk. Optimization by central composite design."

J.M. Padró, R. Pellegrino Vidal, R. N. Echevarría, A. Califano, M. Reta.

Journal of Separation Science (2015) (1591-1600). ISBN/ISSN: 1615-9306.

J. Sep. Sci. 2015, 38, 1591-1600

1591

Juan M. Padró¹
Rocio B. Pellegrino Vidal¹
Romina N. Echevarría¹
Alicia N. Califano²
Mario R. Reta¹

¹Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Métodos Analíticos (LIDMA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, Bs. As., Argentina

²Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de Alimentos (CIDCA), CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, Bs. As., Argentina

Received December 3, 2014
Revised January 27, 2015
Accepted February 8, 2015

Research Article

Development of an ionic-liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of antichagasic drugs in human breast milk: Optimization by central composite design

Chagas disease constitutes a major public health problem in Latin America. Human breast milk is a biological sample of great importance for the analysis of therapeutic drugs, as unwanted exposure through breast milk could result in pharmacological effects in the nursing infant. Thus, the goal of breast milk drug analysis is to inquire to which extent a neonate may be exposed to a drug during lactation. In this work, we developed an analytical technique to quantify benzimidazole and nifurtimox (the two antichagasic drugs currently available for medical treatment) in human breast milk, with a simple sample pretreatment followed by an ionic-liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography and UV detection. For this technique, the ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate has been used as the "extraction solvent." A central composite design was used to find the optimum values for the significant variables affecting the extraction process: volume of ionic liquid, volume of dispersive solvent, ionic strength, and pH. At the optimum working conditions, the average recoveries were 77.5 and 89.7%, the limits of detection were 0.06 and 0.09 $\mu\text{g/mL}$ and the interday reproducibilities were 6.25 and 5.77% for benzimidazole and nifurtimox, respectively. The proposed methodology can be considered sensitive, simple, robust, accurate, and green.

Keywords: Antichagasic drugs / Central composite design / Dispersive liquid-liquid microextraction / Ionic liquids / Liquid chromatography
DOI 10.1002/jssc.201401367

II. Presentaciones a reuniones científicas nacionales e internacionales

- ✓ “Fabricación de columnas monolíticas quirales recubiertas de tris(3,5-dimetilfenil) carbamato de celulosa para electrocromatografía capilar”
Echevarría R.N; Carrasco-Correa E.J.; Keunchkarian, S.; Reta, M.; Herrero-Martínez J.M.
9º Congreso Argentino de Química Analítica -7 al 10 noviembre de 2017. Río Cuarto, Córdoba, Argentina. **Comunicación Oral.**

- ✓ “Development of photografted methacrylate-based chiral monolithic columns with a coating of cellulose tris(3,5-dimethyl phenyl carbamate) for capillary electrochromatography”.
Echevarría R.N; Carrasco-Correa E.J.; Herrero-Martínez J.M.
45th International Symposium on High performance Liquid Phase Separations and Related Techniques - HPLC 2017. June 18-22. Praga, Republica Checa. Resumen / Poster.

- ✓ “Cinchona Alkaloids as Chiral Selectors in Liquid Chromatography. Study of the Enantioseparation Conditions for α -Amino Acids.”
Echevarría R.N; Franca, C.; Tascón, M.; Keunchkarian S.; Castells C.B.
Fisrt Workshop on “Separation strategies in Chromatography”, November 24 th, 2016. Facultat de Química, Universidad Nacional de Valencia, Burjassot (Valencia), España. **Comunicación Oral.**

- ✓ “Development of Monolithic Capillary Chiral Columns based on Cellulose *Tris*(3,5-dimethyl phenyl carbamate) as Stationary Phase for micro-HPLC.”
Echevarría R.N; Padró, J.M.; Keunchkarian S.; Castells C.B; Reta, M.
44th International Symposium on High performance Liquid Phase Separations and Related Techniques - HPLC 2016. June 19-24. Marriott San Francisco Marquis, San Francisco, CA, USA. Póster

- ✓ “Cinchona Alkaloids as Chiral Selectors in Liquid Chromatography. Study of the Enantioseparation Conditions for α -Amino Acids.”
Echevarría R.N; Padró, J.M.; Keunchkarian S.; Castells C.B.
44th International Symposium on High performance Liquid Phase Separations and Related Techniques - HPLC 2016. June 19-24. Marriott San Francisco Marquis, San Francisco, CA, USA. Póster

- ✓ “Desarrollo de columnas capilares monolíticas quirales con base en *tris*(3,5-dimetilfenil carbamato) de celulosa como fase estacionaria para micro-HPLC.”

Echevarría R.N; Keunchkarian S.; Castells C.B; Reta, M.

VIII Congreso Argentino de Química Analítica. Desde el 3 al 6 de noviembre de 2015. Ciudad de La Plata. Argentina. Póster.

✓ “Alcaloides de la familia de *Cinchona* como selectores quirales en cromatografía de líquidos. Estudio de las variables que inciden sobre la enantioseparación de α -aminoácidos.”

Echevarría R.N; Franca, C.A; Castells C.; Keunchkarian S.

VIII Congreso Argentino de Química Analítica. Desde el 3 al 6 de noviembre de 2015. Ciudad de La Plata. Argentina. Póster

✓ “Alcaloides de la familia de *Cinchona* como selectores quirales en cromatografía de líquidos. Aplicación a la enantioresolución de Fármacos.”

Echevarría R.; Keunchkarian S., Castells C.

7° Congreso Argentino de Química Analítica. Desde el 1 al 4 de octubre de 2013. Ciudad de Mendoza. Argentina. Póster