



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Departamento de Química

“Métodos de separación de enantiómeros:
desarrollo, evolución y aplicaciones de columnas
quirales para cromatografía de líquidos y de gases”

TRABAJO FINAL MONOGRAFICO
Licenciatura en Química

Alumna: **Srta. Daiana L. Prince**
Directora: **Dra. Sonia Keunchkarian**
Tutora: **Dra. Romina N. Echevarría**

2021

El presente Trabajo Monográfico de Tesina fue realizado en el
Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA),
División Química Analítica de la Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata.

Agradecimientos

Este trabajo representa el final de una etapa y me siento profundamente agradecida con Sonia y Romina por haberme brindado su apoyo y esmero en la realización de este manuscrito.

A mi directora la Dra. Sonia Keunchkarian, le doy las gracias por haberme aceptado como tesinista, por la paciencia y comprensión que tiene conmigo desde ese momento.

A mi tutora la Dra. Romina N. Echevarría le doy las gracias por la dedicación, la formación que me brindo y la tolerancia que tuvo durante las horas compartidas.

También quiero agradecer a las personas que me acompañaron a lo largo de esta etapa:

A mi mamá Paula y a mi papá Miguel.

A mis hermanos Diego y Angi.

A mi abuela Angélica, a mis tías y tíos.

A mi compañero Miguel.

A Poli y Hugo.

A mi abuela Nely, que la llevo en el corazón.

Por último, a todas aquellas personas con las que compartí incontables horas de estudio entre mates y anécdotas. En particular a Belén, Carla, Evelyn, Leo y Marian.

¡Gracias!

Índice

Resumen	7
1. Objetivos	8
1.1. Objetivo general	9
1.2. Objetivos específicos	9
2. Introducción	10
2.1. Definiciones	11
2.2. Quiralidad: importancia e implicaciones en distintas áreas	13
2.3. Técnicas de resolución de racematos	16
2.4. Cromatografía quiral	18
2.4.1. Aditivos quirales en fase móvil en LC	19
2.4.2. Fases estacionarias quirales	20
2.4.2.1. FEQs empleadas en LC	21
2.4.2.2. FEQs empleadas en GC	22
2.5. Bibliografía	25
3. Evolución de las técnicas cromatográficas	29
3.1. Miniaturización de la cromatografía de líquidos	30
3.1.1. Desarrollo de columnas monolíticas	34
3.1.2. Mejora de las propiedades porosas en columnas monolíticas orgánicas	41
3.1.3. Nuevas columnas monolíticas orgánicas quirales	47
3.2. Evolución de las columnas cromatográficas empleadas en GC	48

3.2.1. Columnas capilares en GC	48
3.2.2. Columnas capilares con MOFs en GC	49
3.2.3. Columnas capilares con MOFs quirales en GC	51
3.3. Bibliografía	53
4. Observaciones, conclusiones y perspectivas futuras	63
5. Anexos	66
Anexo I: Estudio de las variables que inciden en la síntesis de monolitos poliméricos orgánicos	67
Anexo II: Nomenclatura y estructura química de MOFs	76
Bibliografía	79

Resumen

El presente trabajo de tesina en formato monográfico surgió a partir de la falta de previsibilidad para abordar un trabajo experimental en el laboratorio con la continuidad necesaria, dadas las limitaciones impuestas durante 2020 y 2021 por la pandemia por COVID-19.

Por esta razón, decidimos orientar la búsqueda de material bibliográfico hacia la temática en la que trabajaremos en la vuelta al laboratorio y, por lo tanto, el manuscrito no busca realizar una recopilación exhaustiva de los temas abordados, sino elaborar un material de consulta inicial y guía para introducir a la tesinista en su futuro plan de trabajo de Tesis Doctoral.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Reconocer a la quiralidad como una característica del entorno natural, y sus implicaciones en diversos ámbitos de la química.

Estudiar la evolución de las técnicas cromatográficas de gases y de líquidos dedicadas a la resolución quiral.

1.2. Objetivos específicos

Realizar una búsqueda bibliográfica en diversas fuentes, recopilar y clasificar el material para comprender, definir y evaluar los siguientes aspectos:

- Definición de “quiralidad” y términos relacionados con el tema. Importancia de su estudio en diversas áreas de investigación y desarrollo
- Técnicas analíticas para la determinación de enantiómeros
- Evolución de las técnicas cromatográficas quirales hacia la búsqueda de nuevos materiales de soporte y la miniaturización del sistema
- Estudio de las metodologías de preparación y síntesis de columnas capilares quirales para cromatografías de líquidos y de gases
- Separaciones realizadas con estas columnas

La discusión del material obtenido se realizará mediante la escritura de un trabajo de tipo monográfico.

2. Introducción

2.1. Definiciones

Para comenzar el estudio de la **quiralidad** es necesario definir una serie de términos y conceptos que serán frecuentemente utilizados:

Centro quiral: Es el centro asimétrico, frecuentemente es un átomo de carbono (pero puede ser otro elemento, como N, P, etc.) con todos sus sustituyentes diferentes.

Estereoisómeros: Son moléculas con la misma constitución química pero que difieren en el ordenamiento espacial de sus sustituyentes.

Enantiómeros o isómeros ópticos: Son estereoisómeros cuyas imágenes en el espejo no son superponibles entre sí. Se puede representar de manera sencilla la relación que existe entre los enantiómeros de una molécula quiral con la imagen especular no superponible de nuestras manos, como se muestra en la **Figura 1**.

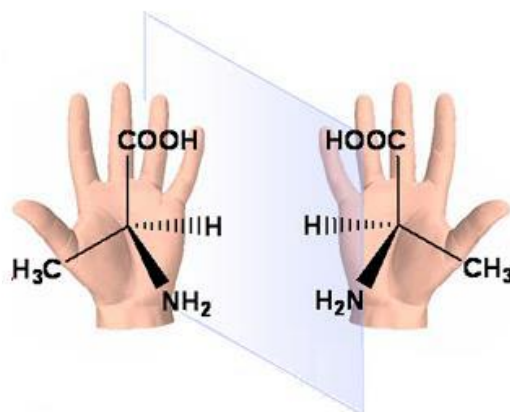


Figura 1: Representación de la relación entre un aminoácido quiral genérico y la imagen especular de las manos.

Molécula quiral: Es una molécula que tiene al menos un par de enantiómeros.

Diastereoisómeros: Son isómeros ópticos que no guardan la relación de un objeto y su imagen en el espejo. Generalmente las moléculas diastereoisoméricas tienen más de un centro quiral. La relación entre enantiómeros y diastereómeros se muestra en la **Figura 2** para un azúcar.

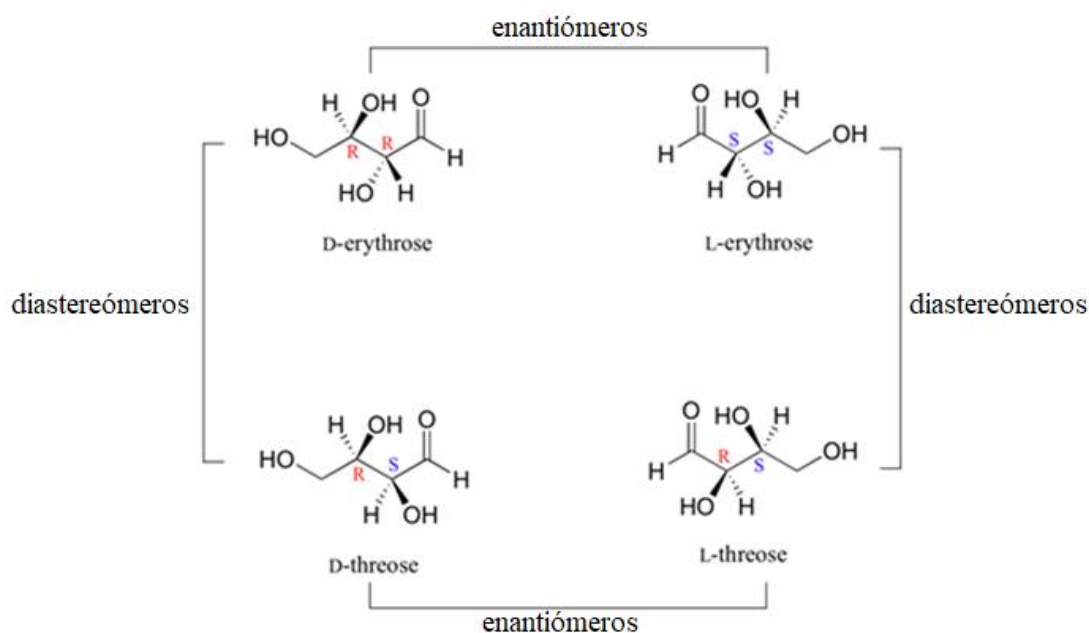


Figura 2: Relación entre los diferentes estereoisómeros (enantiómeros y diastereómeros) de un azúcar.

Racemato o mezcla racémica: Es una mezcla equimolecular (1:1) de enantiómeros.

Compuesto homoquiral o enantiopuro: Es un compuesto constituido por un sólo tipo de enantiómero, sin cantidad significativa del otro.

Estereoselectividad: Afinidad selectiva de una macromolécula, o estructura macromolecular, por uno de los dos enantiómeros con respecto al otro.

Entonces, se puede definir a una molécula *quiral* como aquella que puede existir en por lo menos dos formas *enantioméricas*, cada una de las cuales posee la misma fórmula molecular y los mismos enlaces, pero difieren en el ordenamiento espacial de sus átomos resultando sus imágenes especulares no superponibles.

Sobre la base del entendimiento de estos términos y conceptos, se continuará con el desarrollo del presente trabajo a partir de la información obtenida mediante la búsqueda bibliográfica realizada en las bases de datos *ScienceDirect*, *Google Académico* y *Scopus*.

2.2. Quiralidad: importancia e implicaciones en distintas áreas

El reconocimiento estereoespecífico de moléculas quirales y la discriminación de enantiómeros son fundamentales en las ciencias de la vida. La naturaleza quiral de los sistemas vivos tiene implicaciones evidentes sobre los procesos biológicos. Prácticamente, todos los fenómenos fisiológicos se basan en interacciones moleculares precisas en las que los receptores quirales reconocen a las dos moléculas huésped enantioméricas de modos diferentes, de forma tal que la actividad fisiológica puede verse afectada; aunque los enantiómeros poseen la misma composición química, pueden presentar comportamientos diferentes entre sí cuando se exponen a ambientes quirales. Por ende, la quiralidad es relevante y tiene un gran impacto en cualquier campo de la química que se relacione con la producción o análisis de compuestos xenobióticos bioactivos, como fármacos, agroquímicos, aditivos alimentarios, fragancias, contaminantes, entre otros [1,2].

El actual reconocimiento de la importancia de la quiralidad, se manifiesta en diversos trabajos de recopilación bibliográfica en distintos campos de la ciencia [3–5], entre los que pueden mencionarse la evolución en la determinación de pesticidas quirales, compuestos quirales presentes en alimentos, compuestos farmacéuticos quirales presentes en aguas residuales, así como en el desarrollo de las técnicas de determinación aplicadas en cada caso.

Se describirá a continuación la incidencia de la quiralidad en algunas áreas de interés, como en las industrias farmacéutica, agroquímica y alimentaria.

Área farmacéutica

Actualmente, más de la mitad de los principios activos farmacéuticos son quirales, y una gran proporción de ellos se comercializa como mezcla racémica; por lo que este tema se ha discutido en la literatura farmacéutica de los últimos años [6]. La producción de fármacos enantioméricamente puros es de gran interés debido a que muchos de éstos exhiben diferencias enantioselectivas significativas en su farmacocinética y farmacodinámica, pudiendo observarse diferencias en el mecanismo de transporte, la vía de metabolización y la toxicidad entre los enantiómeros de muchos fármacos [3,6].

Además, el consumo de productos farmacéuticos en forma de mezclas racémicas produce una mayor cantidad de desechos, y el impacto ambiental de los mismos también puede depender de su estereoquímica. Los fármacos quirales introducidos en aguas ambientales están sujetos a diferentes procesos, sólo unos pocos estudios se centran en su destino y efectos estereoselectivos y/o estereoespecíficos en el ambiente [7,8]. Se ha detectado estereoselectividad en procesos de degradación [8,9], que pueden explicarse por cambios en la diversidad microbiana, resultante de la modificación de los parámetros del agua [10]. Por ejemplo, el S-ibuprofeno se degrada más rápidamente en los ecosistemas lacustres, mientras que el R-ibuprofeno lo hace en los ríos; sin embargo, esta observación no puede tomarse como una regla debido a la naturaleza compleja de la estereoselectividad, la diversidad de microorganismos en los distintos ecosistemas y las diferentes estructuras químicas de los compuestos farmacéuticos [11].

Los β -bloqueantes son un claro ejemplo actual de productos farmacéuticos que son objeto de estudio mediante diversas técnicas enantioseparativas. Se sabe que controlan la respuesta a ciertos impulsos nerviosos bloqueando los receptores adrenérgicos ubicados en el corazón, riñón, pulmón, hígado o células adiposas, entre otros. Los estudios sobre su aparición, biotransformación y ecotoxicidad en el ambiente aumentan en un 40% cada cinco años (período 1998 – 2019) como puede observarse en la **Figura 3** [12–14].

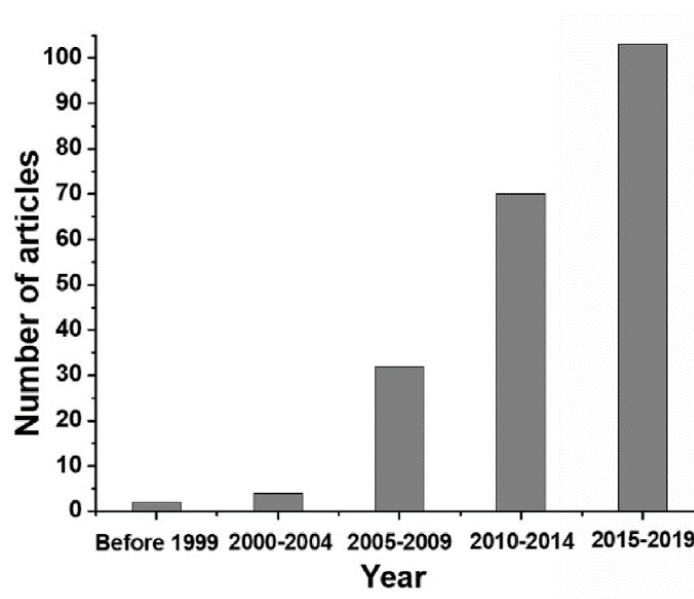


Figura 3: Artículos de investigación publicados entre 1998 y 2019 sobre la distribución y destino de los β -bloqueantes en el ambiente [14].

Área agroquímica

Hasta el año 2006 sólo una pequeña parte de las investigaciones en este campo consideraban la quiralidad. Sin embargo, dado que la aplicación de plaguicidas y agroquímicos ha aumentado drásticamente, en la actualidad se busca mejorar el conocimiento existente sobre la enantioselectividad de los procesos que involucran plaguicidas quirales en el ambiente para maximizar su eficacia y minimizar su impacto ambiental. Por ejemplo, el fungicida metalaxil ha sido ampliamente utilizado desde 1977 como mezcla racémica, aunque se atribuye el efecto fungicida principalmente al enantiómero R. Chen y col. [15] analizaron las variables que afectan la determinación de este plaguicida mediante cromatografía de líquidos de alta performance (HPLC); y también se ha estudiado la enantioselectividad de los procesos de sorción, degradación y lixiviación del fungicida en suelos agrícolas en el sur de España [16,17].

Dado que la mayoría de los compuestos utilizados en esta área son tóxicos y no biodegradables, las implicaciones ambientales de la quiralidad son inmensas. Las investigaciones han demostrado que los plaguicidas son una de las principales causas de contaminación del agua, el aire y el suelo. Mientras que, en el cuerpo humano, estos productos químicos pueden causar trastornos en diferentes órganos; es por ello, que es necesario contar con técnicas que permitan la identificación, separación y cuantificación quiral de los mismos [18].

Área alimenticia

Los productos alimenticios pueden estar conformados por componentes quirales naturales o sintéticos que, además pueden racemizar durante el procesamiento. La distribución enantiomérica también puede modificarse por contaminación bacteriana o por adulteración con aditivos sintéticos, entre otros. Es por ello, que el análisis quiral adquirió gran relevancia en esta área, dado que las distintas formas enantioméricas pueden afectar los valores nutricionales de un alimento y/o poseer diferente toxicidad [5,19].

Para garantizar la seguridad alimentaria, es necesario detectar la presencia de contaminantes o aditivos nocivos para el consumidor. Un ejemplo que se puede citar es el de los β -agonistas, que poseen un efecto broncodilatador por lo cual se han aplicado

clínicamente, pero también se han utilizado ilícitamente para generar rápido crecimiento en animales criados para el consumo. En la actualidad, su uso se encuentra prohibido en muchos países, pero se continúan desarrollando técnicas para regular su cumplimiento, aplicadas al análisis de muestras de pelo, orina, tejido, alimentos, etc. [20,21].

A continuación, se muestra una clasificación de las distintas técnicas aplicadas en la resolución de racematos.

2.3. Técnicas de resolución de racematos

Tanto en ámbitos de investigación como industriales, existe una demanda creciente de técnicas analíticas rápidas, automatizadas, sensibles, selectivas, robustas y aplicables al análisis de una amplia variedad y cantidad de analitos y muestras.

En la actualidad, se dispone de numerosas alternativas aplicables a la separación y análisis enantiomérico (**Figura 4**); donde las clásicas técnicas polarimétricas, de degradación enzimática y de cristalización fraccionada, 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) [22].

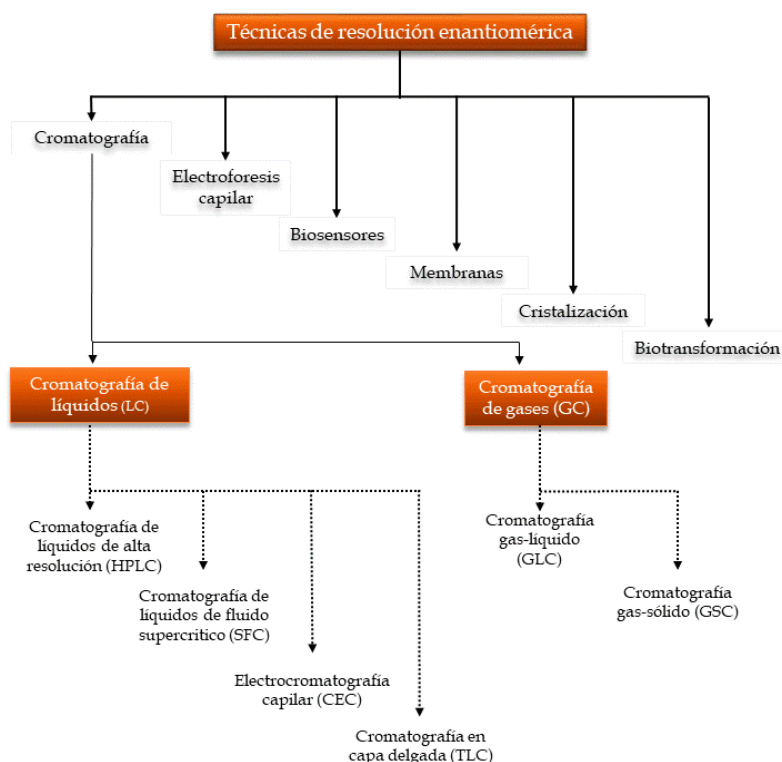


Figura 4: Esquema de las técnicas utilizadas para la resolución enantiomérica.

Entre los métodos de resolución de racematos, las separaciones cromatográficas son las de mayor aplicación [1]. En la **Figura 5**, se pueden observar los resultados de una búsqueda bibliográfica realizada a través de la base de datos ScienceDirect para “separaciones quirales por HPLC, CE, GC, CEC y SFC”. Se registra un sostenido aumento de la cantidad de publicaciones científicas a partir del año 2011. Además, la HPLC es una de las técnicas analíticas elegidas por excelencia por lo que ocupa una posición privilegiada, seguida por la CE, SFC y finalmente GC y CEC.

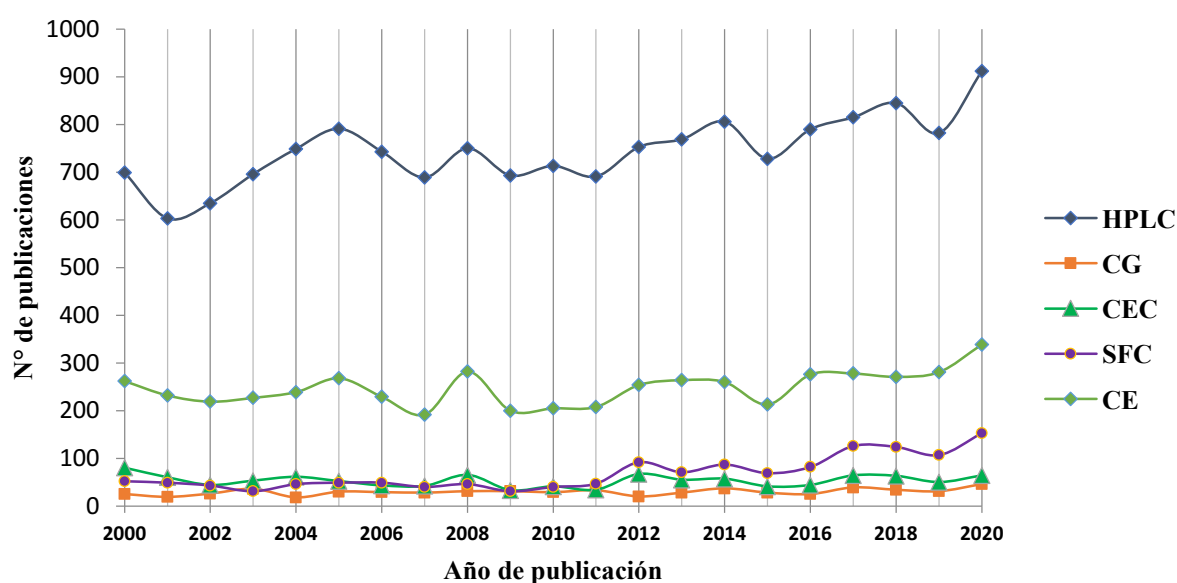


Figura 5: Revisión bibliográfica de publicaciones científicas dedicadas a la resolución de enantiómeros empleando diferentes técnicas de separación en el período 2000-2020 (base de datos ScienceDirect).

El hecho de que la HPLC sea la técnica más utilizada puede deberse entre otros aspectos, a su rapidez, selectividad, sensibilidad, eficiencia y una gran versatilidad, tanto en la selección de modalidades cromatográficas como en la geometría y química de las columnas, que permiten una amplia gama de aplicaciones [23]. Se han desarrollado fases estacionarias quirales (FEQs) para HPLC utilizando diferentes compuestos como selectores quirales (SQs), que incluyen aminoácidos, ciclodextrinas (CDs), glucopéptidos macrocíclicos, alcaloides, éteres corona, etc. De la gran cantidad de FEQs desarrolladas, las derivadas de polisacáridos han demostrado la mejor capacidad de reconocimiento quiral en un amplio rango de aplicaciones. Una de las

claves del éxito en su capacidad de enantioseparación radica en su estructura tridimensional estable, regular y fácilmente modificable [24,25]. Actualmente se comercializan columnas con varios derivados de celulosa y amilosa [26], con el SQ depositado en forma de un recubrimiento superficial o inmovilizado en forma covalente en el soporte.

En GC se utilizan habitualmente FEQs de derivados de aminoácidos, terpenos, compuestos de coordinación con metales y CDs modificadas. Las CDs y sus derivados son los SQs usados con mayor frecuencia, debido a la posibilidad de separar una amplia variedad química de compuestos quirales [27,28].

Para el análisis enantiomérico por CE se adiciona un SQ al electrolito de fondo para proporcionar selectividad y resolución en la separación. Los líquidos iónicos (LIs) y los derivados de CDs, tienen las ventajas de poseer una alta solubilidad y conductividad en agua, por lo que se están aplicando ampliamente en CE.

En los últimos años, la LC multidimensional ha surgido como una opción para el análisis de mezclas complejas cuando no se alcanza una separación aceptable mediante la cromatografía unidimensional. Dado que las separaciones quirales son dificultosas y necesitan requisitos específicos, la cromatografía multidimensional es una buena opción para este propósito. Esta modalidad permite la combinación de al menos dos etapas de partición cromatográfica autónomas, ampliando así el poder de separación [29].

A continuación, se abordarán exclusivamente las técnicas de cromatografía quiral de líquidos y de gases.

2.4. Cromatografía quiral

La separación de enantiómeros utilizando técnicas cromatográficas se puede implementar mediante dos vías: métodos indirectos o directos.

Método indirecto: previo al análisis cromatográfico se realiza una reacción de derivatización del analito con un reactivo derivatizante quiral. Luego, se puede utilizar cualquier modo cromatográfico no quiral para separar los diastereómeros formados. Para implementar este método es necesario que los analitos posean grupos funcionales que permitan su reacción con el derivatizante, también es conveniente que estos grupos

se encuentren cercanos al centro quiral para aumentar las diferencias en la conformación tridimensional de los diastereómeros [30]. La dificultad de este tipo de método radica en que: i) se requiere la presencia de un grupo funcional reactivo en la molécula quiral, ii) el reactivo derivatizante debe poseer una elevada pureza enantiomérica, iii) la reacción de derivatización debe poseer un alto grado de conversión y reproducibilidad, iv) existe la posibilidad de racemización durante la derivatización, y v) una potencial diferencia en la cinética de reacción de ambos enantiómeros con el agente quiral podría dar lugar a resultados erróneos [31,32]. Además, en algunos casos luego de la separación cromatográfica puede ser necesario revertir la reacción de derivatización para recuperar los enantiómeros puros.

Método directo: la enantioseparación se produce por la formación de complejos diastereoméricos transitorios reversibles entre los enantiómeros del analito y un SQ estereoquímicamente puro, que forma parte de la fase móvil o de la fase estacionaria [33]. Estos complejos pueden tener distintas constantes de formación y/o de partición que producen su enantiodiscriminación. Como desventajas de esta alternativa se pueden mencionar la necesidad de síntesis de FEQs o el consumo de SQ en la fase móvil.

2.4.1. Aditivos quirales en fase móvil en LC

La utilización de aditivos quirales en la fase móvil en HPLC representa una alternativa simple y flexible. Son varios los aditivos que se han descripto para la resolución de isómeros ópticos, entre ellos, quelatos metálicos quirales, proteínas, CDs y sus derivados, antibióticos macrocíclicos, éteres corona ópticamente activos, alcaloides, LIs, y contraiones quirales. El mecanismo de enantioselectividad propuesto en este tipo de LC quiral se atribuye a una asociación estereoselectiva por formación de un quelato metálico, de un complejo de inclusión o de un par iónico, entre el SQ presente en la fase móvil y cada uno de los enantiómeros de los analitos. Estos compuestos de asociación diastereoméricos pueden tener distintas constantes de formación con el SQ presente en la fase móvil, y/o de distribución entre las fases móvil y estacionaria no quiral, y producir así la discriminación quiral.

2.4.2. Fases estacionarias quirales

Las columnas cromatográficas con FEQs se obtienen mediante la unión química (covalente) o física (adsorción) de un SQ al soporte cromatográfico. La capacidad de enantioconocimiento se puede explicar a partir del “*modelo de los tres puntos*”, propuesto en 1933 por Easson y Stedman [34] que se esquematiza en la **Figura 6**. Este modelo, postula que debe haber por lo menos tres sitios de interacción entre el analito y el SQ, y que al menos uno de ellos debe ser enantioespecífico para que ocurra la discriminación de los enantiómeros.

Entre las interacciones posibles entre los sustituyentes del SQ y los enantiómeros se encuentran la formación de enlaces de hidrógeno, transferencia de carga (π - π), interacciones dipolo-dipolo, interacciones hidrofóbicas o electrostáticas.

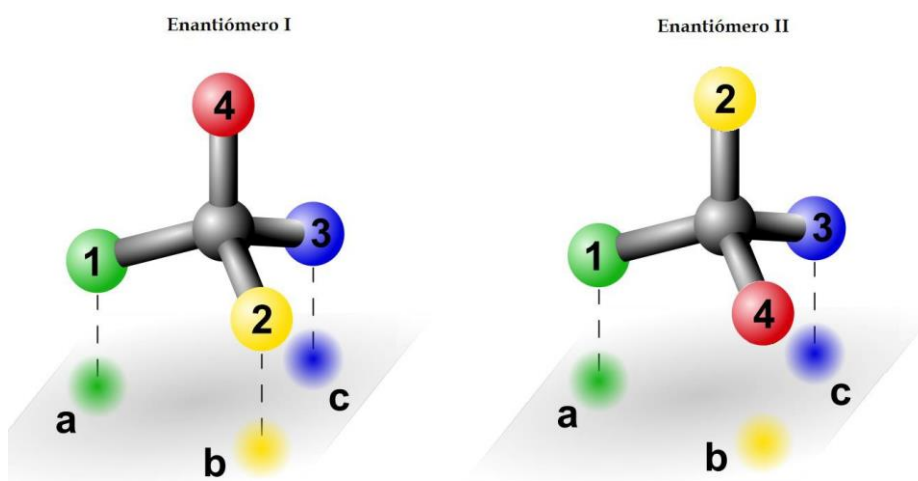


Figura 6: Modelo de interacción de tres puntos para la discriminación quiral. El enantiómero I presenta tres sitios de interacción con el SQ, mientras el enantiómero II presenta sólo dos sitios.

La utilización de columnas con FEQs es más conveniente y aplicable en escala preparativa, pero requiere contar con una colección de columnas, en general costosas, para resolver la variedad de problemas que pueden presentarse en un laboratorio.

La enantioresolución mediante GC empleando columnas capilares de alta resolución presenta como ventajas alta eficiencia, sensibilidad y velocidad de separación. En

contraste con la HPLC o con métodos basados en electromigración, la elección de solventes, buffers, modificadores y sistemas de elución en gradiente está ausente en GC. Sin embargo, su potencial implementación presenta requisitos ineludibles para los analitos, como volatilidad y estabilidad térmica restringiendo así su utilización [35].

2.4.2.1. FEQs empleadas en LC

A continuación, se detallan distintos tipos de SQs utilizados en la síntesis de FEQs para LC [36,37]:

Polisacáridos: Se destacan los derivados de la amilosa y celulosa cuyas columnas han sido ampliamente comercializadas y aplicadas en LC. Estas FEQs están constituidas por polímeros helicoidales lineales con unidades de glucosa unidas mediante enlaces α ($1 \rightarrow 4$) (amilosa) o β ($1 \rightarrow 4$) (celulosa). Los grupos hidroxilo de las moléculas de glucosa se pueden derivatizar, por ejemplo, con benzoato o fenilcarbamato, de manera de incrementar la posibilidad de diferentes interacciones con los analitos.

Ciclodextrinas: Son oligosacáridos cíclicos naturales de forma toroidal que constan de varias unidades de D-glucosa (normalmente 6, 7, 8, correspondientes a α -, β -, γ -CD, respectivamente) conectadas por enlaces α ($1 \rightarrow 4$). La estructura posee una cavidad lipofílica y un exterior hidrofílico. Los grupos hidroxilo pueden derivatizarse dando como resultado una gran variedad de derivados con o sin carga que se utilizan ampliamente como SQs en CE y GC, pero son relativamente menos populares en HPLC.

Tipo donor-aceptor: También denominados selectores “tipo Pirkle”, son pequeñas moléculas orgánicas quirales, unidas covalentemente al soporte. Estos selectores contienen típicamente un resto aromático deficiente en electrones (un anillo de dinitrofenilo) que puede actuar como un aceptor, y/o un resto rico en electrones (un anillo de naftaleno o fenantreno) que actúa como donante. El reconocimiento quiral se basa en interacciones donor-aceptor tales como puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo o π - π entre caras o cara-borde de los anillos aromáticos presentes.

De intercambio iónico: Estos selectores interactúan con analitos cargados mediante interacciones iónicas, pero, además, las interacciones π - π y los enlaces de hidrógeno

contribuyen a la formación de complejos. Actualmente, se utilizan alcaloides naturales en combinación con grupos zwitteriónicos que han sido ampliamente estudiados para la separación de aminoácidos y péptidos, y en la determinación de herbicidas [38].

Polímeros de impresión molecular: Son polímeros sintéticos obtenidos por la reacción entre un monómero, un iniciador radicalario, un entrecruzante y una molécula molde (un compuesto estereoquímicamente puro), en un solvente apropiado. Finalizada la polimerización, se remueve la molécula molde obteniéndose la cavidad enantioespecífica. El reconocimiento quiral en este caso, está determinado por la disposición espacial complementaria de los grupos del analito con los del polímero impreso. Estas estructuras son utilizadas también en extracción en fase sólida.

Éteres corona: Son compuestos macrocíclicos sintéticos que poseen grupos éter dispuestos hacia el interior de la estructura y diferentes funcionalidades hacia el exterior. Son utilizados en enantioseparaciones por HPLC y CE de aminas primarias, secundarias y amidas. Se cree que el mecanismo de reconocimiento quiral se basa en la complejación del analito, también puede haber interacciones adicionales con sustituyentes del éter corona.

Antibióticos macrocíclicos: Se comenzaron a utilizar en 1994 como SQs y han tenido una aplicación muy versátil para separar una amplia variedad de analitos. Se caracterizan por poseer una estructura en forma de “cesta” compuesta por la fusión de los anillos macrocíclicos que contienen una gran variedad de grupos funcionales, así como de sitios quirales, que posibilitan múltiples interacciones (π - π , puentes de hidrógeno, dipolares, electrostáticas, estéricas y de inclusión) con los analitos y les confiere su capacidad de reconocimiento quiral.

2.4.2.2. FEQs empleadas en GC

Tradicionalmente las FEQs empleadas en GC se clasifican en tres categorías: derivados de aminoácidos y diamidas; complejos metálicos quirales; y, CDs y sus derivados. Más recientemente, algunos otros SQs, como los LIs quirales, redes organometálicas (MOFs) quirales, y materiales basados en sílice mesoporosa quiral, se han utilizado para la separación enantiomérica en GC.

A continuación, se detallan los principales tipos de SQs utilizados en la síntesis de FEQs en GC [39].

Derivados de aminoácidos y diaminas: El grupo de Gil-Av, pionero en el estudio de separaciones quirales, desarrolló la primera fase quiral para GC basada en un derivado de aminoácido, el N-trifluoroacetil-L-isoleucina-O-lauriléster y el cicloéster de N-trifluoroacetil-L-valil-valina para resolver N-trifluoroacetil aminoácidos. El reconocimiento quiral de estos selectores se basa en la formación de múltiples puentes de hidrógeno diferenciados con cada uno de los enantiómeros del par. En un intento por aumentar la estabilidad térmica y mejorar el rendimiento de la enantioseparación se examinó el uso de ésteres de dipéptidos como fases estacionarias. En base a las primeras fases derivadas de aminoácidos, se desarrolló la fase estacionaria comercialmente denominada Chirasil-Val basada en valindiamida unida a polisiloxanos. La misma presentó un amplio espectro de aplicación ya que permitió separar muchas mezclas quirales incluyendo los arilglicoles, metabolitos de fármacos, ácidos 2- y 3-hidroxicarboxílicos, alcoholes, dicetonas e hidroxilactonas.

Complejos metálicos quirales: Schurig y Gil-Av (1971) introdujeron un nuevo tipo de FEQ basada en metales de coordinación, utilizaron dicarbonilrodio(I)-3-trifluoroacetil-(1R)-canforato disuelto en escualano como fase estacionaria, recubriendo un tubo de acero inoxidable, para resolver una olefina racémica. En este tipo de FEQs la enantioseparación se basa en la coordinación entre el analito y el selector organometálico disuelto en la fase estacionaria. Posteriormente, fueron estudiados una serie de quelatos de manganeso(II), cobalto(II) y níquel(II) con 1,3-dicetonato derivados de terpenen-cetonas perfluoroaciladas. Estas fases estacionarias tenían como limitación su uso a bajas temperaturas (25-120°C), para incrementar la termoestabilidad se inmovilizaron los selectores a polidimetilsiloxanos para producir las fases estacionarias Chirasil-Metal. Las aplicaciones en GC quiral basadas en complejación incluyen la separación enantiomérica de numerosas feromonas, fragancias y oxiranos.

Ciclodextrinas: estos SQs y sus derivados son los más utilizados en GC. Esto se debe a la posibilidad de separar una amplia variedad química de compuestos quirales, incluyendo hidrocarburos no funcionalizados. En el año 1983 se informó por primera vez el empleo de CDs nativas como FEQs para la separación de enantiómeros por GC. La baja eficiencia de las columnas condujo a explorar derivados de CDs térmicamente

estables, en particular la derivatización de los grupos hidroxilos del borde exterior con diversos grupos funcionales, como acetilos o alquilos, ofrece un mecanismo simple para modificar las propiedades de las CDs naturales, expandir su aplicación y mejorar sus propiedades físicas para su uso como fases estacionarias.

Líquidos iónicos: Son sales o mezclas de sales cuyos puntos de fusión se encuentran por debajo de 100°C. Los LIs a temperatura ambiente tienen puntos de fusión menores o iguales a la temperatura ambiente. La parte catiónica de la mayoría de los LIs son iones orgánicos (imidazolio, N-alquilpiridinio, tetraalquilamonio y el tetraalquilfosfonio), y un anión que puede ser orgánico o inorgánico (haluros, nitratos, acetatos, hexafluorofosfatos, tetrafluoroborato, trifluorometilsulfonato y bis(trifluorometanosulfonil)imida). Las propiedades de los LIs como solventes (bajo punto de fusión, baja presión de vapor, baja inflamabilidad, estabilidad térmica y alta conductividad iónica) han sido aprovechadas para preparar columnas capilares en GC con LIs quirales que demostraron su capacidad enantioselectiva en la separación de alcoholes, dioles, sulfóxidos, epóxidos y aminas acetiladas [40,41].

Calixarenos: Representan una nueva clase de SQs aplicados en cromatografía enantioselectiva. Son tetrámeros cíclicos formados por unidades de fenol unidas mediante un puente metileno que le confiere flexibilidad a la estructura del macrociclo y le permite adquirir diferentes conformaciones. La estructura consta de un borde superior y un borde inferior cuyos sustituyentes pueden someterse a reacciones de funcionalización. Pfeiffer y Schurig sintetizaron un calixareno que fue unido a un dimetilpolisiloxano, fase estacionaria que se conoce comercialmente como Chirasil-Calix [42]. Se ha sugerido que el reconocimiento quiral podría estar basado parcialmente en la inclusión del analito en una cavidad en forma de canasta y en la formación de puentes de hidrógeno con el SQ. Estas fases se aplican para separar derivados de aminoácidos, alcoholes y aminas.

Las características de las cromatografías de líquidos y de gases, así como su desarrollo instrumental, las hacen altamente aplicables y prácticas para el análisis quiral de rutina de una amplia variedad de mezclas racémicas en distintas matrices.

Se continuará con el estudio enfocado en la evolución de ambas técnicas de separación.

2.5. Bibliografia

- [1] M. Lämmerhofer, "Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases," *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 6, pp. 814–856, 2010, doi: 10.1016/j.chroma.2009.10.022.
- [2] I. Ali and H. Y. Aboul-Enein, *Chiral Pollutants: Distribution, Toxicity and Analysis by Chromatography and Capillary Electrophoresis*. 2004.
- [3] A. Dogan, J. Płotka-Wasyłka, D. Kempińska-Kupczyk, J. Namieśnik, and A. Kot-Wasik, "Detection, identification and determination of chiral pharmaceutical residues in wastewater: Problems and challenges," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.115710.
- [4] H. Deng *et al.*, "Application of Chiral and Achiral Supercritical Fluid Chromatography in Pesticide Analysis: A Review," *J. Chromatogr. A*, vol. 1634, p. 461684, 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461684.
- [5] G. Alvarez-Rivera, M. Bueno, D. Ballesteros-Vivas, and A. Cifuentes, "Chiral analysis in food science," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 2020, doi: 10.1016/j.trac.2019.115761.
- [6] A. Calcaterra and I. D'Acquarica, "The market of chiral drugs: Chiral switches versus de novo enantiomerically pure compounds," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 147, pp. 323–340, 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2017.07.008.
- [7] P. Vazquez-Roig, B. Kasprzyk-Hordern, C. Blasco, and Y. Picó, "Stereoisomeric profiling of drugs of abuse and pharmaceuticals in wastewaters of Valencia (Spain)," *Sci. Total Environ.*, vol. 494–495, pp. 49–57, 2014, doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.06.098.
- [8] E. Sanganyado, Z. Lu, Q. Fu, D. Schlenk, and J. Gan, "Chiral pharmaceuticals: A review on their environmental occurrence and fate processes," *Water Res.*, vol. 124, pp. 527–542, 2017, doi: 10.1016/j.watres.2017.08.003.
- [9] S. E. Evans and B. Kasprzyk-Hordern, "Applications of chiral chromatography coupled with mass spectrometry in the analysis of chiral pharmaceuticals in the environment," *Trends Environ. Anal. Chem.*, vol. 1, pp. e34–e51, 2014, doi: 10.1016/j.teac.2013.11.005.
- [10] Z. Li, E. Gomez, H. Fenet, and S. Chiron, "Chiral signature of venlafaxine as a marker of biological attenuation processes," *Chemosphere*, vol. 90, no. 6, pp. 1933–1938, 2013, doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.10.033.
- [11] S. J. Khan, "Biologically Mediated Chiral Inversion of Emerging Contaminants," *Transform. Prod. Emerg. Contam. Environ. Anal. Process. Occur. Eff. Risks*, pp. 261–280, 2014, doi: 10.1002/9781118339558.ch08.
- [12] M. E. D. Merino, C. Lancioni, J. M. Padró, and C. B. Castells, "Study of enantioseparation of β -blockers using amylose tris(3-chloro-5-methylphenylcarbamate) as chiral stationary phase under polar-organic, reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography conditions," *J. Chromatogr. A*, vol. 1634, 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2020.461685.

- [13] S. Hu, M. Zhang, F. Li, and M. C. Breadmore, “ β -Cyclodextrin-copper (II) complex as chiral selector in capillary electrophoresis for the enantioseparation of β -blockers,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1596, pp. 233–240, 2019, doi: 10.1016/j.chroma.2019.03.019.
- [14] M. Yi, Q. Sheng, Q. Sui, and H. Lu, “ β -blockers in the environment: Distribution, transformation, and ecotoxicity,” *Environ. Pollut.*, vol. 266, p. 115269, 2020, doi: 10.1016/j.envpol.2020.115269.
- [15] T. Chen, J. Fan, R. Gao, T. Wang, Y. Yu, and W. Zhang, “Analysis of metalaxyl racemate using high performance liquid chromatography coupled with four kinds of detectors,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1467, pp. 246–254, 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.07.007.
- [16] R. Celis, B. Gámiz, M. A. Adelino, M. C. Hermosín, and J. Cornejo, “Environmental behavior of the enantiomers of the chiral fungicide metalaxyl in Mediterranean agricultural soils,” *Sci. Total Environ.*, vol. 444, pp. 288–297, 2012, doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.11.105.
- [17] A. López *et al.*, “Risk assessment of airborne pesticides in a Mediterranean region of Spain,” *Sci. Total Environ.*, vol. 574, pp. 724–734, 2016, doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.08.149.
- [18] A. Sharma *et al.*, “Global trends in pesticides: A looming threat and viable alternatives,” *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 201, p. 110812, 2020, doi: 10.1016/j.ecoenv.2020.110812.
- [19] G. D’Orazio, C. Fanali, M. Asensio-Ramos, and S. Fanali, “Chiral separations in food analysis,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 96, pp. 151–171, 2017, doi: 10.1016/j.trac.2017.05.013.
- [20] B. Zhu, L. Cai, Z. Jiang, Q. Li, and X. Guo, “Simultaneous stereoselective determination of seven β -agonists in pork meat samples by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” *Microchem. J.*, vol. 150, p. 104082, 2019, doi: 10.1016/j.microc.2019.104082.
- [21] W. Zhang, P. Wang, and X. Su, “Current advancement in analysis of β -agonists,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 85, pp. 1–16, 2016, doi: 10.1016/j.trac.2016.08.011.
- [22] G. Subramanian, *Chiral Separation Techniques A Practical Approach (2da. Ed.)*. 2001.
- [23] Y. Zhao, X. Zhu, W. Jiang, H. Liu, and B. Sun, “Chiral Recognition for Chromatography and Membrane-Based Separations: Recent Developments and Future Prospects,” *Molecules*, vol. 26, 2021, doi: 10.3390/molecules26041145.
- [24] X. Wang, C. J. Jameson, and S. Murad, “Modeling Enantiomeric Separations as an Interfacial Process Using Amylose Tris(3,5-dimethylphenyl carbamate) (ADMPC) Polymers Coated on Amorphous Silica,” *Langmuir*, vol. 36, no. 5, pp. 1113–1124, 2020, doi: 10.1021/acs.langmuir.9b03248.
- [25] R. N. Echevarría, S. Keunchkarian, J. Villarroel-Rocha, K. Sapag, and M. Reta, “Organic monolithic capillary columns coated with cellulose tris(3,5-dimethylphenyl carbamate) for enantioseparations by capillary HPLC,” *Microchem. J.*, vol. 149, no. June, p. 104011, 2019, doi: 10.1016/j.microc.2019.104011.

- [26] J. M. Padró and S. Keunchkarian, “State-of-the-art and recent developments of immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases for enantioseparations by high-performance liquid chromatography (2013–2017),” *Microchem. J.*, vol. 140, no. 2017, pp. 142–157, 2018, doi: 10.1016/j.microc.2018.04.017.
- [27] B. . Schurig and H. Nowotny, “Gas Chromatographic Separation of Enantiomers on Cyclodextrin Derivates,” *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 29, no. 11, pp. 939–957, 1990, doi: 10.1002/anie.198815561.
- [28] W. A. König and B. Gehrcke, “Gas chromatographic enantiomer separation with modified cyclodextrins: Carboxylic acid esters and epoxides,” *J. High Resolut. Chromatogr.*, vol. 16, no. 3, pp. 175–181, 1993, doi: 10.1002/jhrc.1240160309.
- [29] I. Ali, M. Suhail, and H. Y. Aboul-Enein, “Advances in chiral multidimensional liquid chromatography,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 120, p. 115634, 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.115634.
- [30] H. Y. Aboul-Enein and I. Ali, *Chiral Separations By Liquid Chromatography And Related Technologies*. 2003.
- [31] V. Schurig, “Chiral separations using gas chromatography,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 21, pp. 647–661, 2002, doi: 10.1016/S0165-9936(02)00808-7.
- [32] V. Schurig, “Review Enantiomer separation by gas chromatography stationary phases,” *J. Chromatogr. A*, vol. 666, pp. 111–129, 1994.
- [33] E. Francotte and W. Lindner, *Chirality in drug research*, vol. 33. 2006.
- [34] L. H. Easson and E. Stedman, “Studies on the Relationship Between Chemical Constitution and Physiological Action: Molecular Dissymmetry and Physiological Activity,” *Biochem. J.* 27, pp. 1257–1266, 1933, doi: 10.1038/100337a0.
- [35] V. Schurig, “Separation of enantiomers by gas chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 906, no. 1–2, pp. 275–299, 2001, doi: 10.1016/S0021-9673(00)00505-7.
- [36] G. K. E. Scriba, “Chiral Recognition in Separation Science – An update,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1467, pp. 56–78, 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.05.061.
- [37] J. Guo, Q. Wang, D. Xu, J. Crommen, and Z. Jiang, “Recent advances in preparation and applications of monolithic chiral stationary phases,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 123, p. 115774, 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.115774.
- [38] F. IANNI, R. SARDELLA, A. CAROTTI, W. NATALINI, BENEDETTO LINDNER, and M. LÄMMERHOFER, “Quinine-Based Zwitterionic Chiral Stationary Phase as a Complementary Tool for Peptide Analysis: Mobile Phase Effects on Enantio- and Stereoselectivity of Underivatized Oligopeptides,” *Wiley Period. Inc.*, vol. 28, pp. 5–16, 2016, doi: 10.1002/chir.22541.
- [39] V. Schurig, “Gas chromatography | Chiral separations,” *Encycl. Anal. Sci.*, vol. 4, no. September 2018, pp. 107–117, 2019, doi: 10.1016/B978-0-12-409547-2.14501-9.
- [40] J. Ding, T. Welton, and D. W. Armstrong, “Chiral ionic liquids as stationary phases in gas chromatography,” *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 22, pp. 6819–6822, 2004, doi: 10.1021/ac049144c.

- [41] T. D. Ho, C. Zhang, L. W. Hantao, and J. L. Anderson, "Ionic liquids in analytical chemistry: Fundamentals, advances, and perspectives," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 1, pp. 262–285, 2013, doi: 10.1021/ac4035554.
- [42] J. Pfeiffer and V. Schurig, "Enantiomer separation of amino acid derivatives on a new polymeric chiral resorc[4]arene stationary phase by capillary gas chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 840, no. 1, pp. 145–150, 1999, doi: 10.1016/S0021-9673(99)00224-1.

3. Evolución de las técnicas cromatográficas

3.1. Miniaturización de la cromatografía de líquidos

La LC se ha convertido en una técnica analítica ampliamente utilizada en muchos campos de las ciencias naturales y de la salud [1–3]. Siguiendo las tendencias actuales en química analítica, la **miniaturización** se encuentra entre las principales áreas de innovación de LC de los últimos diez años [4]; convirtiéndose la fabricación de nuevos sistemas de separación miniaturizados en uno de los desafíos actuales más importantes de la cromatografía [5].

Entre los pioneros en la miniaturización en LC se encuentran Horváth y col. [6,7], que a fines de la década del 60 rellenan columnas de 0,5-1,0 mm de diámetro interno con materiales particulados. Una década después, Tsuda y Novotny [8,9] miniaturizaron el sistema de LC, lo que les permitió trabajar en escala capilar. Las modificaciones que realizaron fueron: disminuir el diámetro interno de la columna a 50-200 μm y el tamaño de las partículas hasta $\sim 30\text{-}10\ \mu\text{m}$; además implementaron modificaciones sobre los sistemas convencionales de inyección y detección con el objetivo de reducir los efectos de ensanchamiento (extra columna) de las bandas. Al mismo tiempo, Ishii y col. [10] trabajaron en el desarrollo de un microsistema de LC de alto rendimiento, aplicado con éxito tanto a columnas empaquetadas [11] como a columnas capilares tubulares abiertas.

En los años 80, la LC miniaturizada avanzó significativamente, junto con otras técnicas como la CE y la SFC capilar, despertando el interés de investigadores de diferentes campos [12]. Una de las ventajas más importantes que ofrece la LC miniaturizada es requerir de un pequeño volumen de muestra de análisis, aspecto crítico en áreas como forense, clínica y ómica. Además, el bajo caudal empleado en el análisis conduce a un menor consumo de solventes y aditivos [13,14]. Estas ventajas concuerdan con los principios de la “química analítica verde”, por ello resulta de gran interés para la comunidad científica-tecnológica [15].

Adicionalmente, 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. Como resultado de los desarrollos tecnológicos, actualmente es posible encontrar sistemas de LC en escala capilar (c-LC) y nano (n-LC) disponibles comercialmente, que incluyen y utilizan principalmente detectores de masa con ionización por electrospray (ESI-MS).

La LC miniaturizada es un término general empleado para describir la cromatografía de líquidos utilizando columnas de diámetro inferior a 1,0 mm. En la práctica, cada sistema determina tanto

los caudales de trabajo, como el volumen de inyección adecuado. En la **Tabla 1** se muestra una clasificación de los sistemas de LC [16].

Tabla 1: Clasificación de los sistemas de LC según la dimensión de la columna y el caudal de la fase móvil.

d.i. de la columna (mm)	caudal (mL min ⁻¹)	denominación en LC
4,6-3,2	2,0-0,5	convencional
3,2-1,5	0,5-0,1	microbore
1,0-0,5	0,1-0,01	<i>micro</i>
0,5-0,1	0,01-0,001	<i>capilar</i>
0,1-0,05	0,001-0,0001	<i>nano</i>
0,05-0,005	<0,0001	<i>tubular abierto</i>

El diseño de columnas ha sido uno de los principales impulsores de la miniaturización en LC. Hay dos tipos principales de columnas capilares, como se muestra en la **Figura 7**: las rellenas, con partículas o con lecho monolítico; y las de tubo abierto (OT), donde una fina capa de fase estacionaria se fija en el interior de la columna, dejando un espacio tubular abierto.

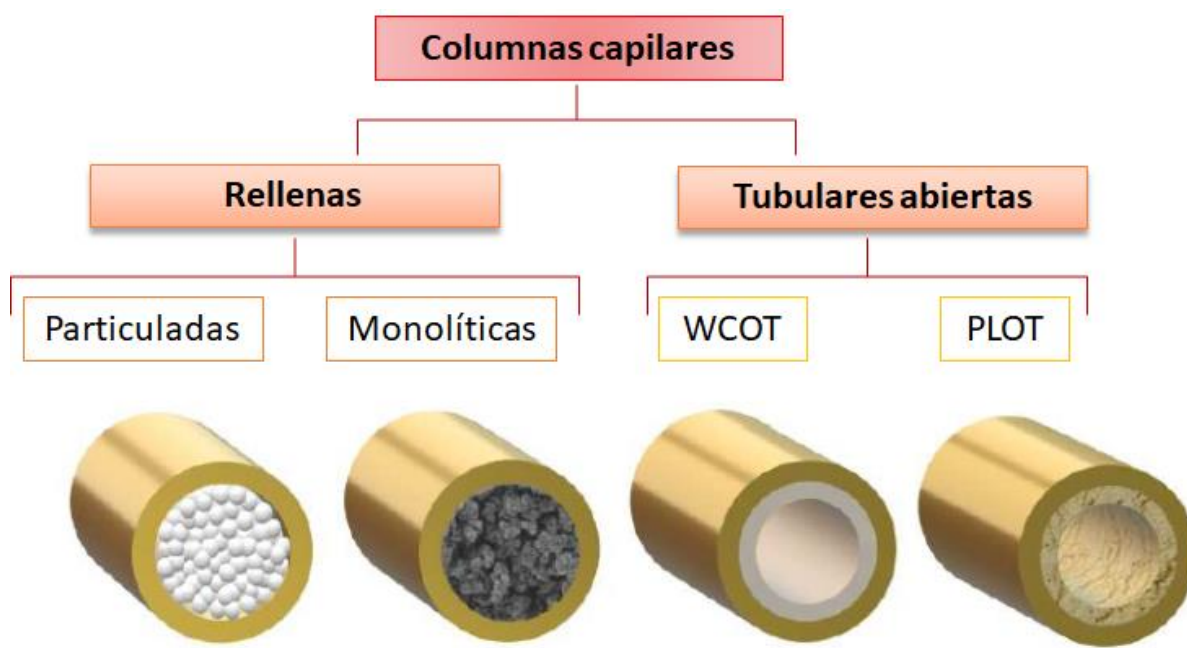


Figura 7: Clasificación de columnas capilares según el tipo de relleno [17].

Las columnas capilares rellenas con partículas suelen utilizar el mismo material que las columnas de HPLC convencionales, por lo que hay una amplia gama de columnas capilares empaquetadas disponibles comercialmente [14]. La reducción del tamaño de las partículas de relleno y del diámetro interno de las columnas mejora la eficiencia de la separación; específicamente, el uso de partículas de tamaño menor a 2 μm permite una mayor eficiencia a flujos más altos, reduciendo el tiempo de análisis [18]. Sin embargo, esta ventaja está limitada por la alta contrapresión generada, que requiere instrumentación especial como la utilizada en cromatografía de líquidos de ultra alta presión (UHPLC) [19].

El otro formato de columnas capilares rellenas, las columnas monolíticas, ha ganado un interés particular desde su introducción a principios de los años 90, debido a su facilidad de preparación *in situ* y la alta permeabilidad que presenta el lecho, que disminuye la contrapresión generada en comparación con las columnas capilares particuladas, resultando una alternativa muy prometedora a nivel de eficiencia y versatilidad [5]. Una columna monolítica consta de una estructura polimérica continua o en un bloque que abarca todo el tubo capilar, pueden ser de base silíceo u orgánica [1]. Capilares de 20-500 μm d.i. son comúnmente empleados para su fabricación. La eficiencia de las columnas monolíticas depende de la morfología de la fase estacionaria, de la distribución de tamaño de poros, la uniformidad del esqueleto y del tipo de polímeros empleados [18]. Actualmente, la síntesis de una amplia gama de materiales monolíticos conteniendo nanopartículas metálicas, estructuras organometálicas, nanomateriales a base de carbono, así como monolitos funcionalizados con ácido borónico, monómeros zwitteriónicos y otras funcionalidades, ampliaron la gama de aplicaciones de la c-LC [20].

Por otro lado, las columnas tubulares abiertas, introducidas por primera vez para GC en 1958 por Golay [21], se convirtieron en un tipo único de columna que tienen una capa delgada de fase estacionaria en la pared interna del capilar. A finales de la década del 70, Tsuda y col. [22] exploraron el concepto de OT en estudios de LC, incluyendo el diseño, la teoría y aspectos prácticos de la técnica. Sin embargo, el interés por las mismas decayó rápidamente, principalmente debido a su menor desempeño en comparación con las columnas particuladas y a la falta en ese momento, de instrumentos y detectores miniaturizados. Recientemente, con la disponibilidad comercial de detectores de alta sensibilidad, inyector de volumen reducido y de instrumentos de micro LC y n-LC, el interés por las aplicaciones y la investigación fundamental en columnas OT resurgió.

Entre las ventajas de las columnas OT se halla la eliminación de la contribución de la dispersión

“eddy” (de remolinos), reduciendo a la mitad el ensanchamiento de banda en comparación con las columnas empaquetadas, y además su alta permeabilidad, que permite el uso de columnas más largas [13]. Sin embargo, para lograr una alta eficiencia cromatográfica se requieren columnas con diámetros muy reducidos ($\sim 5 \mu\text{m}$), hecho que compromete gravemente la contrapresión y longitud de columna que se puede utilizar [23]. Las columnas OT se clasifican en dos tipos principales: las de tubo abierto con la pared revestida (WCOT, *wall coated open tubular*) y las de tubo abierto con capa porosa (PLOT, *porous layer open tubular*).

Las columnas WCOT son las más empleadas en GC, contienen una fina película de fase estacionaria no porosa cubriendo la pared del capilar. Estas columnas fueron escasamente exploradas en LC por su menor capacidad de muestra y eficiencia, principalmente debido a la película no porosa. Aunque se realizaron esfuerzos por obtener películas más gruesas y aumentar la capacidad de muestra, empleando recubrimientos multicapa y procesos de unión química, las columnas WCOT fueron eclipsadas por las PLOT [1]. En la práctica, las columnas capilares tipo WCOT se han empleado hasta el momento con más éxito en CEC que en n-LC [24].

Las columnas PLOT, también desarrolladas inicialmente para GC, contienen como fase estacionaria un material poroso que ofrece una mayor superficie y capacidad de retención en comparación con las WCOT. Entre las fases estacionarias más empleadas, se encuentran los materiales basados en polímeros orgánicos o de sílice; por ejemplo, poliestireno, polidivinilbenceno y polimetacrilato son las fases actualmente utilizadas en los análisis proteómicos. En los cuales, las delgadas capas de fases estacionarias poliméricas se depositan generalmente mediante la polimerización por radicales libres, ya sea por enfoques térmicos o por fotoiniciación, produciendo estructuras de varias capas y morfologías modificando la energía suministrada a través del tiempo de polimerización [2,25,26].

La última generación de columnas PLOT a base de sílice fue obtenida recientemente por el método de sol-gel, según lo informado por Forster y col. [27]. Los autores obtuvieron columnas PLOT con buena capacidad de carga que proporcionaron separaciones de alta eficiencia (>170.000 platos/m), y fueron aplicadas con éxito a separaciones en fase normal [27,28].

3.1.1. Desarrollo de columnas monolíticas

Los avances realizados en los procedimientos cromatográficos tienden permanentemente a aumentar la productividad en las determinaciones. En este sentido, el empleo de columnas monolíticas es una alternativa muy prometedora para su uso en los sistemas miniaturizados de LC [29,30].

Una de las primeras discusiones sobre las fases estacionarias monolíticas se remonta a 1948 cuando A.J.P. Martin, A. Tiselius y R. Synge (premios Nobel), propusieron utilizar electroendósmosis para transportar una solución a través de un bloque continuo de gel poroso [31]. A partir de este momento, se han publicado varios trabajos que describen la síntesis de hidrogeles [32], espumas poliméricas porosas [33] y otros materiales de tipo monolítico. Fue en 1989 cuando Hjertén afirmó que un “lecho de polímero continuo” puede considerarse una buena columna cromatográfica si permite un flujo hidrodinámico a los caudales típicos de LC convencionales, sin generar contrapresión o daño en el lecho [34]. En 1993 se introdujo el término "**monolito**" para describir un soporte de fase estacionaria compuesto por una sola pieza [35]. Tennikova y col. obtuvieron un logro importante al introducir fases estacionarias de polímeros macroporosos rígidos como discos delgados para LC [36].

El esqueleto poroso de las columnas monolíticas otorga alta permeabilidad al pasaje de la fase móvil con baja contrapresión, permitiendo aplicar altos caudales posibilitando un transporte de masa más rápido en comparación con las columnas rellenas particuladas. Por lo tanto, un aspecto positivo central a favor de las columnas monolíticas es su capacidad para mantener una eficiencia de separación adecuada a caudales elevados [37].

Las fases estacionarias de las columnas monolíticas están conformadas por polímeros que pueden tener características inorgánicas u orgánicas.

Los **monolitos inorgánicos de sílice** tienen una porosidad superior al 80%, similar a las columnas empaquetadas con partículas de sílice. Por lo tanto, la principal ventaja relacionada con el uso de estos monolitos es la alta eficiencia de separación asociada con una baja contrapresión; mientras que su principal desventaja es la inestabilidad con el pH característica de estos materiales.

Por lo general, las columnas monolíticas a base de sílice, se sintetizan a través de una técnica denominada *sol-gel*, que consiste en un proceso de hidrólisis del precursor de silicio (tetra(alcoxi)silano), dando lugar a un silano que reacciona con otros compuestos de sílice para

formar enlaces siloxano Si-O-Si (reacción de condensación). Esta reacción da como resultado una red tridimensional continua de sílice, con estructura de poros definida que se puede modificar según la concentración del reactivo, la temperatura y el tiempo de polimerización. También es posible modificar la superficie de la fase polimérica mediante reactivos derivatizantes (alcoxisilanos o clorosilanos), permitiendo la incorporación de grupos funcionales, con el fin de mejorar la selectividad y ampliar la aplicación de estas columnas [38].

Dada la alta porosidad de los monolitos de sílice (área superficial 200–400 m²g⁻¹), resultan ideales como fases estacionarias en cromatografía para la separación de moléculas pequeñas; utilizándose en la separación de productos ambientales, muestras forenses, compuestos naturales, farmacéuticos, entre otros [39].

La capacidad de realizar separaciones rápidas, sin pérdida de eficiencia, las califica para ser utilizadas en separaciones de LC multidimensionales, demostrando ser una excelente herramienta disponible para la resolución muestras complejas. Espina-Benitez y col. desarrollaron un acoplamiento en línea de una columna monolítica de extracción de boronato con una columna analítica monolítica a base de sílice para analizar uridina, citidina, adenosina y guanosina [40].

Por otra parte, los **monolitos poliméricos orgánicos** pueden ser diseñados para el análisis de cada sistema en particular, es decir, las columnas con estas fases estacionarias son hechas “*a medida*”, gracias a la facilidad con la que pueden incluirse un gran número de grupos funcionales en la matriz polimérica. Por lo general, para sintetizar una fase polimérica orgánica se emplea una mezcla, que contiene los monómeros funcionales orgánicos y un agente entrecruzante (cross-linker), un iniciador radicalario y una mezcla de disolventes porogénicos (formadores de poros). Esta solución homogénea se somete a una polimerización radicalaria iniciada en forma térmica o fotoiniciada mediante rayos UV o γ , este proceso se realiza directamente dentro del molde, lo que determina la forma final del monolito. Los monómeros funcionales usados en el proceso dictan la selectividad de la fase estacionaria, sin embargo, también es posible modificar químicamente la superficie usando diferentes técnicas post síntesis. La morfología, el área superficial y las propiedades químicas del lecho monolítico formado dependen del tipo y la concentración de cada componente en la mezcla de polimerización, la temperatura y duración de la polimerización [41].

Las estructuras monolíticas orgánicas constan de canales interconectados formados por microglóbulos que proporcionan retención y selectividad a la separación. La fase monolítica

presenta una distribución de tamaño de poro bimodal constituida por *macroporos* con diámetros mayores a 50 nm y *mesoporos* con diámetros entre 2 y 50 nm (**Figura 8**).

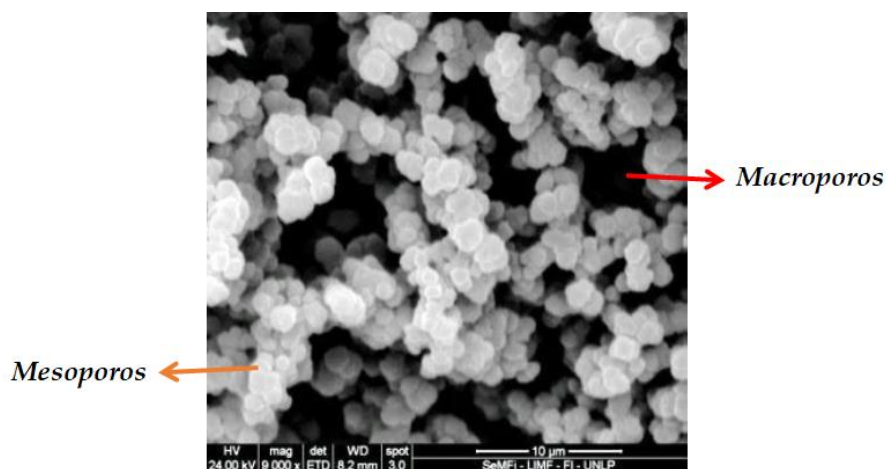


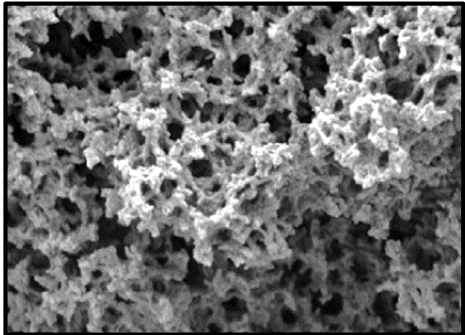
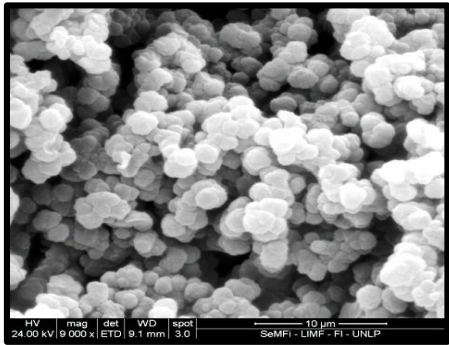
Figura 8: Micrografía electrónica de barrido (SEM) de un monolito orgánico donde se aprecia su estructura porosa bimodal.

Los *macroporos* controlan y otorgan una permeabilidad mucho mayor a la de las columnas particuladas y permiten un rápido acceso de los analitos a la fase estacionaria. Los *mesoporos* proporcionan los sitios de interacción con los analitos y es allí donde ocurren rápidos equilibrios de adsorción-desorción, es decir, son los responsables de la retención cromatográfica [42–44].

Por otro lado, la escasa presencia de mesoporos conduce a un área superficial relativamente baja de 10 a 150 m² g⁻¹. Este hecho, genera que los monolitos de polímeros orgánicos sean un medio excelente para la separación de moléculas de alto peso molecular como proteínas y biomoléculas [45]. Actualmente, existen varios avances encaminados al desarrollo y/o modificación de los monolitos orgánicos con el fin de mejorar sus propiedades para separar moléculas pequeñas.

En la **Tabla 2** [46], se muestran comparativamente las principales características de las fases monolíticas inorgánicas y orgánicas.

Tabla 2: Comparación de las principales características de los monolitos inorgánicos y orgánicos. Adaptado de Lubomirsky y col. [46]

	<i>Monolitos Inorgánicos (o de sílice)</i>	<i>Monolitos Orgánicos</i>
Estructura y morfología	Esqueleto rígido interconectado, con la presencia de macroporos, mesoporos y en menor medida de microporos.	Glóbulos interconectados, que se hinchan al solvarse, con presencia predominante de macroporos y en menor medida de mesoporos.
		
Área superficial	Del orden de 300 m ² gr ⁻¹	Del orden de 10 m ² gr ⁻¹
Composición química	Base de SiO ₂	Amplia variedad de monómeros a base de carbono (hidrofóbicos e hidrofílicos): poliacrilamida, poliestireno, metacrilato y acrilato, entre otros.
Modificación superficial	Mediante reacción con un alquilclorodimetilsilano para incorporar la funcionalidad deseada.	Los monómeros elegidos determinan las características químicas de la columna; también se derivatizan post síntesis para adicionar grupos funcionales.
Mecanismo de polimerización	Sol-gel	Polimerización radicalaria
Estabilidad con el pH	pH < 8	2 < pH < 12

Actualmente, también se dedican importantes esfuerzos al desarrollo de *columnas monolíticas híbridas de sílice-orgánica*, y se las puede considerar como una tercera clasificación, ya que comparten los beneficios de gran área superficial, presencia de mesoporos y estabilidad mecánica de los monolitos de sílice; con la tolerancia de amplio rango de pH, baja resistencia al flujo y la facilidad de la preparación de las columnas monolíticas de polímeros orgánicos [47,48]. Esta nueva familia de columnas se puede utilizar para separaciones de moléculas grandes y también pequeñas [49,50].

Los monolitos híbridos pueden ser preparados mediante tres vías: (i) proceso general *sol-gel* utilizando tri(alcoxi)silanos y tetra(alcoxi)silanos como coprecursores; (ii) proceso “*one-pot*” (mezcla en un recipiente único) de alcóxidosilanos y monómeros orgánicos que combina la química *sol-gel* y la polimerización por radicales libres; y (iii) otros enfoques de polimerización de monómeros orgánicos que contienen silanos. Además, estos monolitos se pueden modificar para crear una variedad de funcionalidades que permitan el control de los mecanismos de separación cromatográfica [49].

En la **Tabla 3** se mencionan varios ejemplos de aplicaciones actuales que incluyen columnas monolíticas inorgánicas, orgánicas e híbridas.

Tabla 3: Aplicaciones recientes (2015-2019) utilizando columnas capilares monolíticas empleando micro, capilar y nano-CL.

Fase estacionaria o material recubierto	i.d (µm) x L (cm)* flujo (µL/min)	Modo LC-detector	Aplicaciones	Ref.
poli(GMA- <i>co</i> -EDMA) ^a con nano partículas de carbono	(100 x 10) 1,00	nano-UV	alquilbencenos	[51]
poli(BMP- <i>co</i> - EDMA) ^b funcionalizada	100 x 15 40	micro-UV	péptidos pequeños y vitaminas b	[52]
poli(HPMAcl- <i>co</i> -EDMA) ^c funcionalizada con nanotubos de carbono	75 x 10 0,80	nano-MS/MS	antibióticos y pesticidas en miel y leche	[53]
poli(GMA- <i>co</i> -EDMA) funcionalizada	250 x 20 23	capilar-UV	drogas farmacéuticas comerciales	[54]
poli(GMA- <i>co</i> -EDMA) funcionalizada con fosfatidilcolina de soja	100 x 15 0,50	nano-UV	alquilbencenos	[55]
Monolito híbrido poli(SA- <i>co</i> -HEDA- <i>co</i> -POSS) ^d	100 x 37 0,10-4,00	capilar-MS/MS	compuestos fenólicos, anilinas, antibióticos y péptidos	[56]
Monolito híbrido poli(MPTMS- <i>co</i> -EDMA) ^e - <i>co</i> - alquil y polifluoroalquilos	100 x 15 0,50	capilar-UV	alquilbencenos, fenoles y compuestos aromáticos	[57]

Monolito híbrido MQD ^f -sílice	100 x 15 10	capilar-UV	aminoácidos derivatizados y proteínas	[58]
Monolito de sílice funcionalizada con ODS ^g	100 x 22 0,97	capilar-UV	alquilbencenos	[59]
Monolito de sílice funcionalizada con ODS	50 x 28 0,31	nano-UV	alquilbencenos citocromo c	[60]
	100 x 26,0 0,84			
	100 x 27,7 0,91			
	100 x 27,8 0,93			
*dimensiones de la columna; ^a poli(glicidilmetacrilato-co-etilendimetacrilato); ^b poli{2-(metacriloiloxi) etil dimetil amonio} etil n-butil fosfato-co-etilendimetacrilato; ^c poli(3-cloro-2-hidroxipropilmetacrilato-co-etilendimetacrilato); ^d Octakis (3-mercaptopropil) octasilsesquioxano poliacrilato; ^e poli{3-(metacroliloiloxi)propiltrimetoxisilano-co-etilendimetacrilato}; ^f O-[2-(metacriloiloxi)-etilcarbamoil]-10,11-dihidroquinidina; ^g octadecildimetil-N,N-dietilaminosilano				

El uso de columnas monolíticas capilares en LC está creciendo y se está estableciendo como una gran alternativa a las columnas empaquetadas, ya que con frecuencia se obtienen resultados superiores. Las principales ventajas de las fases estacionarias poliméricas tanto orgánicas como de sílice para columnas monolíticas son, su síntesis simple, análisis rápidos, sin necesidad de usar fritas y una amplia variedad de fases disponibles. La existencia de sistemas de espectrometría de masas acoplados a sistemas de micro/nano LC también representan una ganancia para las columnas monolíticas miniaturizadas que permiten analizar volúmenes pequeños de muestras con una excelente sensibilidad en la detección [37]. Por tanto, se espera que continúe la exploración de las columnas monolíticas miniaturizadas en LC, y que se sigan desarrollando fases con el fin de incrementar la selectividad para analizar compuestos específicos.

Un estudio de las variables experimentales que pueden modificarse y/u optimizarse durante la reacción de polimerización y que inciden directamente en las propiedades morfológicas y estructurales del monolito orgánico obtenido se encuentra detallado en el **Anexo I** del manuscrito.

Las grandes ventajas presentadas por los monolitos poliméricos orgánicos frente a los de sílice, principalmente asociadas a la simplicidad y bajo costo de preparación, la versatilidad en la elección y posibilidades de modificación de su química superficial, nos llevan al propósito de buscar alternativas para modificar sus propiedades porosas (más allá de las que puedan ser alcanzadas a partir del estudio de las variables que inciden en la reacción de polimerización), y de esta forma mejorar su desempeño en las separaciones cromatográficas.

3.1.2 Mejora de las propiedades porosas en columnas monolíticas orgánicas

La ausencia de microporos en los monolitos orgánicos que resulta en áreas superficiales muy bajas y la incapacidad para separar moléculas pequeñas representó durante mucho tiempo un desafío para los cromatografistas que exploraron varias metodologías como el ajuste de las condiciones de polimerización, nuevas químicas de columna e hiperreticulación, para obtener monolitos con mejoras en el área superficial manteniendo sus propiedades de permeabilidad. Más recientemente se incursionó en la aplicación de nanomateriales, por ejemplo, nanopartículas metálicas y a base de carbono (nanotubos de carbono, grafeno, fullerenos y nanodiamantes) [20].

Los materiales porosos se han utilizado ampliamente en muchos campos, según la composición elemental y los modos de unión, se encuentran materiales porosos inorgánicos, híbridos inorgánicos-orgánicos y orgánicos. Comparativamente, tanto los materiales porosos híbridos como los orgánicos presentan varias ventajas por sobre los materiales porosos inorgánicos (por ejemplo, las zeolitas), como la diversidad estructural, facilidad de modificación química, alta superficie específica, buena estabilidad, cavidades a nanoescala uniformes, y estructura de poros ajustable. Dependiendo del número y de la disposición espacial de los grupos funcionales en los bloques de construcción moleculares, se pueden encontrar autoensamblajes convergentes en estructuras de “cajas” finitas (por ejemplo, cajas orgánicas porosas (POCs) y cajas organometálicas (MOCs)) o autoensamblajes divergentes en redes poliméricas infinitas, como láminas bidimensionales o estructuras tridimensionales (por ejemplo, redes organometálicas (MOFs), redes orgánicas porosas (POFs) y redes orgánicas covalentes (COFs)) [20].

Las redes organometálicas (“*Metal-organic frameworks*”, MOFs) surgieron hace casi dos décadas como materiales avanzados híbridos orgánicos-inorgánicos altamente cristalinos [61]. Como se muestra en la **Figura 9** las MOFs se forman mediante enlaces de coordinación entre nodos (iones metálicos, grupos o unidades de construcción secundaria) y ligandos orgánicos, que deben combinarse de manera adecuada para obtener una arquitectura robusta con una porosidad permanente. En particular, se puede desarrollar la estructura en 1D, 2D o redes de coordinación tridimensionales (3D) [62]. El concepto de unidades de construcción secundarias (SBUs) fue introducido por Yaghi y sus colaboradores para clasificar las estructuras MOFs en diferentes topologías [63]

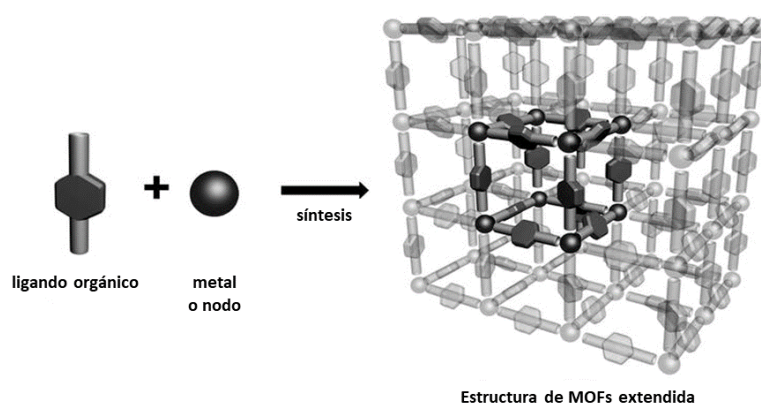


Figura 9: Esquema general de la conformación estructural de las MOFs.

Los nombres (siglas) de las MOFs más frecuentemente utilizadas, y algunas estructuras químicas de los nodos metálicos y ligandos que las conforman se encuentran en el **Anexo II** del presente manuscrito. Además, pueden observarse algunas conformaciones espaciales en el enlace <https://www.chemtube3d.com>.

Las MOFs han ganado especial atención en los últimos años debido a sus propiedades únicas que incluyen gran porosidad dada por la formación de microporos (60-90%) y una gran área superficial (1000 y 10000 m²gr⁻¹) [64]. Además, poseen una distribución de tamaño de poros uniforme, química superficial ajustable y diversidad estructural, atribuida a los ligandos orgánicos que pueden diseñarse y modificarse fácilmente mediante la síntesis o modificación post-síntesis [65]. Estos materiales, también poseen una excelente estabilidad térmica y estructural frente a solventes orgánicos; haciéndolos candidatos ideales para diversas aplicaciones, incluida la separación y almacenamiento de combustibles, adsorción de gases, catálisis, detección química y biomédica [64].

Una estrategia que se ha comenzado a utilizar en los últimos años es el empleo de MOFs en el campo de la cromatografía. Aunque se han desarrollado columnas para HPLC conteniendo MOFs, se ha empleado un número bastante limitado de estos materiales microporosos comparado a la enorme variedad existente o nuevos que se pueden sintetizar [64,66].

En este sentido, las características porosas de las MOFs y de los monolitos orgánicos piden su combinación en soportes para cromatografía; la incorporación de MOFs (donante de microporos) en monolitos orgánicos (donante de meso y macroporos) produce materiales de grandes áreas de superficie y una excelente permeabilidad al flujo, con capacidad de aumentar significativamente la eficiencia de una columna en la separación de moléculas pequeñas en comparación con las fases estacionarias monolíticas originales [67].

Al igual que con otros nanomateriales, las primeras preparaciones de monolitos orgánicos con MOFs implicaron la dispersión de los cristales de MOFs en las mezclas de polimerización utilizadas para la preparación de los monolitos. El aumento observado en la eficiencia y la selectividad de la columna cromatográfica se puede atribuir a: i) la contribución adicional de poros provenientes de las MOFs, y ii) el aumento de las interacciones hidrofóbicas y π - π generadas por los ligandos (aromáticos) en las MOFs.

La incorporación de MOFs en las columnas monolíticas orgánicas logró mejorar la eficiencia y resolución para la separación de pequeñas moléculas; y su efecto es proporcional a la cantidad de MOFs incluida en el lecho monolítico. Los principales problemas observados en la formación de estos compósitos fueron la baja dispersión y heterogeneidad composicional tanto de la mezcla de polimerización como del monolito debido a la sedimentación de las MOFs cuando se las usa en mayor cantidad. Las MOFs tienden a interactuar entre sí y agregarse debido a su alta energía superficial y extensas fuerzas de van der Waals. Para evitar esta aglomeración no deseada, se diseñaron métodos alternativos para su incorporación, como el autoensamblaje capa por capa que permite generar películas delgadas sobre diferentes sustratos [68]. Mediante este método, la MOF se va formando por etapas, los reactivos (soluciones separadas del metal y del ligando) se van adsorbiendo sobre la superficie sólida obteniéndose un recubrimiento superficial homogéneo de espesor controlado. Repitiendo el proceso un número dado de etapas, se va aumentando el espesor de la MOF.

En la **Tabla 4** se muestran separaciones realizadas por CEC y LC en escala miniaturizada con columnas conteniendo fases estacionarias monolíticas orgánicas con la incorporación de MOFs.

Tabla 4: MOFs incorporados en columnas monolíticas orgánicas empleadas en CEC y LC miniaturizada.

Matriz separativa (MOF-polímero)	Sistema de separación	Forma de preparación	Analitos separados	Área superficial (m ² gr ⁻¹) con MOF	Nmax (platos/m) (Con MOF- Sin MOF)	Ref.
NKU-1- poli(BMA-co-EDMA)	CEC	Compósito	Alquilbencenos, PAHs, anilinas y naftoles	11708	PAHs (136000-65000) alquilbencenos (210000-108000) anilinas (182000-85000) naftoles (96000-16000)	[69]
ZIF-8- poli(BMA-co-EDMA)	CEC	Compósito	PAHs y NSAIDs	255-339	(38000 - 30000)	[70]
HKUST-1- poli(GMA-co-EDMA)	c-LC	Compósito	PAHs, etilbenceno y estireno, fenoles y ácidos aromáticos	---	(150000 - 16000)	[71]
HKUST-1- poli(MAA-co-EDMA)	c-LC	<i>In situ</i> grafting	xilenos, etilbencenos,	145-261	(19390 - coelución)	[72]

			estirenos y benzenodiolos			
MIL-53(Al)- poli(HMA-co-EDMA)	c-LC	Compósito	alquilbencenos	85.12	(14740 – coelución)	[73]
UiO-66- poli(MAA-co-EDMA)	LC	Compósito	PAHs, anilinas, fenoles, naftoles	321.4	(8200 - coelución)	[74]
MIL-101(Cr)- poli(BMA-co-EDMA)	CEC	Compósito	isómeros de xilenos y clorotoluenos, PAHs	732	(52000 - coelución)	[75]
MIL-101(Cr)- poli(BMA-co-EDMA)	n-LC	Compósito	ácidos aromáticos	732	(52000 - coelución)	[75]
NH ₂ -MIL- 101(Cr/Al/Fe)- poli(GMA-co-EDMA)	n-LC	Compósito	PAHs		(15000 – coelución)	[76]

3.1.3. Nuevas columnas monolíticas orgánicas quirales

Como nuevo material funcional, los estudios de *MOFs* se han expandido al *reconocimiento quiral*. Particularmente, se las denomina MOFs homoquirales cuando todos los cristales poseen la misma quiralidad.

La capacidad de reconocimiento quiral de las MOFs depende principalmente de los canales helicoidales superficiales desarrollados en un sólo sentido (**Figura 10**), en los que el ajuste estérico entre las cavidades quirales y la conformación de los enantiómeros pueden desempeñar un papel importante [62]. También podrían contribuir al reconocimiento, los enlaces de hidrógeno, interacciones π - π y dipolo-dipolo entre los grupos funcionales de la MOF y los analitos quirales. A su vez, estudios de modelado molecular utilizados para explorar el mecanismo de reconocimiento de las MOFs concluyeron que la enantioselectividad está fuertemente correlacionada con una estrecha coincidencia entre el tamaño del poro y el de la molécula de analito quiral [77–79].

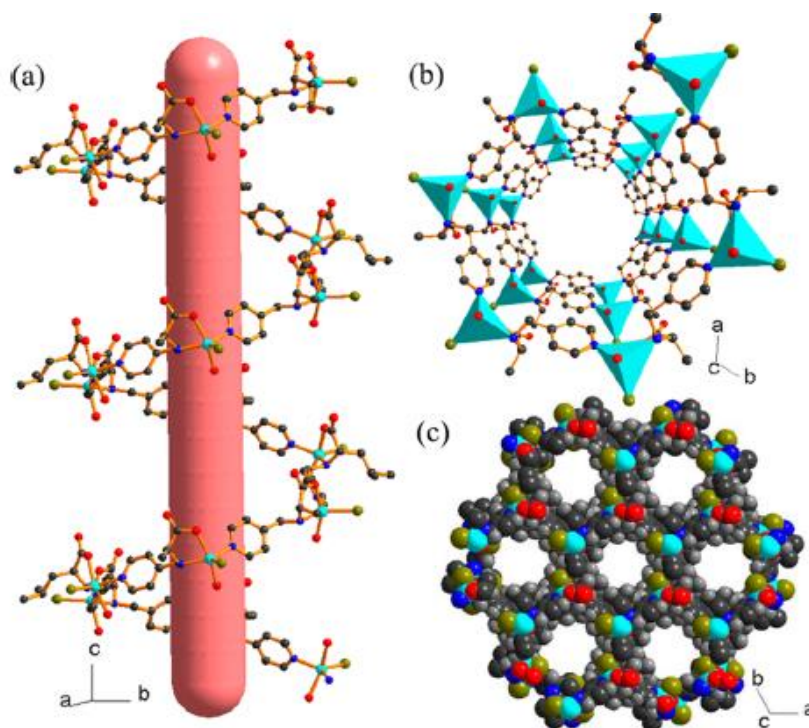


Figura 10: (a) Vista en perspectiva de una sola cadena helicoidal de la MOF homoquiral {[ZnLBr]·H₂O}, L:[N-(4-piridilmetil)-L-Leu·HBr]; (b) Vista desde arriba de la cadena helicoidal; (c) Diagrama de la red 3D (Zn celeste, C gris, O rojo, N azul, Br amarillo, H gris claro) [81].

Es un gran desafío diseñar y sintetizar un material cristalino que combine las propiedades de quiralidad y porosidad en la misma estructura. Los enfoques para la construcción de MOFs homoquirales incluyen principalmente la síntesis directa mediante ligandos orgánicos enantiopuros y métodos indirectos basados en técnicas como: a. modificación post-sintética; b. proceso de grabado quiral; c. resolución espontánea; y d. inducción quiral [80]. Varias MOFs homoquirales fueron sintetizadas y aplicadas en catalizadores asimétricos y separaciones enantioselectivas [64].

La primera, y a nuestro entender la única hasta el momento, columna capilar monolítica conteniendo una MOF quiral se preparó a partir de la incorporación de $[\text{Zn}_2(\text{bdc})(\text{L-lac})(\text{dmf})](\text{DMF})$, (bdc: ácido benceno dicarboxílico; L-lac: ácido L-láctico; dmf: dimetilformamida) en un monolito de poli(vinilpiridina-co-EDMA), para obtener una FEQ (**Figura 11**) empleada en n-LC para separar ($\pm$)-metilfenilsulfóxido [82].

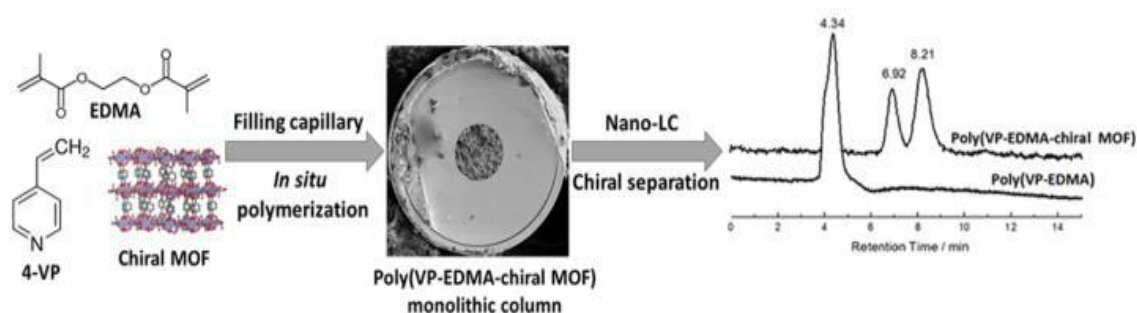


Figura 11: Esquema de la preparación de la columna monolítica quiral poli(VP-co-EDMA-co-MOFquiral) para la enantioseparación de metilfenilsulfóxido por n-LC.

3.2. Evolución de las columnas cromatográficas empleadas en GC

3.2.1. Columnas capilares en GC

Las primeras columnas monolíticas empleadas en esta técnica cromatográfica datan de fines de la década del 60-principios del 70, inventadas como alternativa a las columnas empaquetadas convencionales [83–87]. Estas columnas se fabricaron principalmente de espuma de poliuretano que es capaz de formar una estructura de poros abiertos que

permite el libre flujo de la fase móvil a través de la columna. Pronto se evidenciaron las ventajas de estas nuevas columnas: sencillez de preparación, alta estabilidad térmica, baja caída de presión y buena integridad mecánica [87]; así como la posibilidad de preparar columnas casi de cualquier longitud, tamaño o forma. También se prepararon columnas monolíticas de espumas hechas de otros polímeros como poliestireno, cloruro de polivinilo y polietileno [86]. Sin embargo, por esos tiempos ninguna de ellas obtuvo popularidad y fueron olvidadas en GC durante los siguientes 30 años, dado que al mismo tiempo surgieron las columnas capilares OT para GC, y se convirtieron en las más utilizadas desplazando por completo a las columnas monolíticas [87].

A pesar del gran éxito de los materiales monolíticos en LC, sólo unos pocos grupos de investigación actuales los utilizan para GC. El primer ejemplo de aplicación de columnas capilares monolíticas en GC moderna fue presentado por Svec y col. [88]. Los autores prepararon columnas monolíticas basadas en polidivinilbenceno en capilares de sílice fundida de sólo 50 cm de largo con la que lograron separar una mezcla de 11 compuestos orgánicos en 12 minutos. A pesar de la baja eficiencia de la columna, la separación se logró debido a la alta selectividad proporcionada por el monolito.

En particular, la elección de una técnica para la separación de moléculas quirales está determinada en cierta medida, por las propiedades de la molécula quiral. En este sentido, la GC quiral es reconocida como una técnica poderosa, simple, rápida, sensible y eficiente para la separación o determinación precisa de composiciones enantioméricas de analitos ópticamente activos, volátiles y térmicamente estables. Además, su capacidad de acoplamiento a otras técnicas, incluida la GC multidimensional (GC×GC), microextracción en fase sólida y acoplamiento GC-MS, han hecho de la GC quiral una técnica atractiva para el análisis de enantiómeros en muestras complejas [89].

3.2.2. Columnas capilares con MOFs en GC

Si bien se han reportado estudios sobre columnas monolíticas en GC proporcionando resultados interesantes, a la fecha el uso de monolitos en GC sigue siendo escaso, por lo que el reporte de una columna monolítica con MOFs en GC es una agradable sorpresa. Yusuf y col. incorporaron ZIF-8 en un monolito de poli(BuMA-co-EDMA) preparado en un capilar. La adición de las micropartículas de ZIF-8 en la mezcla de polimerización aumentó más de tres veces la superficie de los monolitos. La columna se utilizó para la

separación rápida de alcanos no polares, disolventes orgánicos polares, isómeros y una muestra real compleja [90].

Entre las primeras aplicaciones en GC, se encuentran algunas redes organometálicas: MOF-508, MIL-47, MOF-5 y ZIF-8, utilizadas como fases estacionarias para preparar columnas empaquetadas [91]. Estas columnas no sólo necesitan cantidades de MOFs del orden de gramos, pudiendo tener altos costos, sino que también tienen menor eficiencia y resolución que las columnas capilares utilizadas habitualmente en GC. Para superar estas deficiencias, Yan y col. reportaron la primera columna capilar recubierta con MOF (MIL-101(Cr)), fabricada por un método de recubrimiento dinámico. Esta columna capilar ofreció una alta resolución para xileno y etilbenceno en un corto tiempo de análisis [92].

El empaquetamiento eficiente de las columnas cromatográficas requiere de grandes cantidades de los microcristales, así como de un tamaño de partículas adecuado y homogéneo para evitar problemas asociados con la caída de presión y con la forma irregular de los picos cromatográficos. Inmovilizar las MOFs en una superficie inerte de un polímero térmicamente estable, como el poli(dimetilsiloxano), para formar un compuesto de tipo “polímero - MOF”, puede aumentar el tamaño de las partículas y favorecer el empaquetado y, por lo tanto, la eficiencia de la separación cromatográfica.

Otro procedimiento para mejorar la eficiencia de las columnas, es el recubrimiento de la pared interna del capilar mediante un "*método dinámico*" que consiste en el pasaje a través del capilar de una suspensión de la MOF para formar columnas de tubo abierto (**Figura 12**). También es aplicable el método de depósito y ensamblado capa por capa (como el descrito en 3.1.2) para la preparación de MOFs sobre varias superficies [93,94].

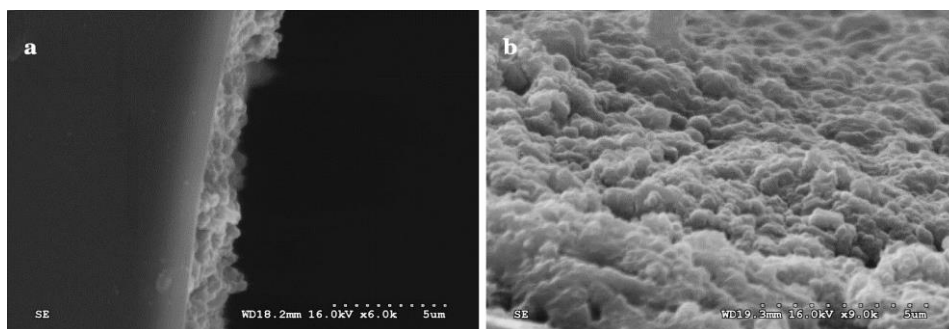


Figura 12: Imágenes SEM del recubrimiento de MOF en la pared interna de la columna capilar mediante el método dinámico [95].

3.2.3. Columnas capilares con MOFs quirales en GC

El uso de ligandos orgánicos enantiopuros (aminoácidos quirales, ácidos orgánicos quirales, etc.) es el medio más utilizado para producir columnas capilares quirales recubiertas de MOFs para la separación por GC. Como se observa en la **Tabla 5** se han utilizado varios materiales basados en MOFs quirales en GC de alta resolución. Las columnas se prepararon por revestimiento de la superficie interior de la pared del capilar.

Tabla 5: MOFs quirales incorporados en columnas capilares empleadas en GC.

MOF quiral	Método de preparación	Analitos enantioseparados	Ref.
3D - {Cu(sala)} _n (H ₂ sala: N-(2-hidroxibenzil)-L-alanina)	recubrimiento dinámico	aminoácidos, ácidos orgánicos, alcoholes, citronelal	[96]
3D - Ni(D-cam)(H ₂ O) ₂ (D-cam: ácido D-(+)-canfórico)	recubrimiento dinámico	aminoácidos, ácidos orgánicos, alcoholes, citronelal	[97]
3D - [(CH ₃) ₂ NH ₂][Cd(bpdc) _{1.5}]·2DMA (H ₂ bpdc: ácido 4,4-bifenildicarboxílico)	recubrimiento dinámico	aminoácidos, citronelal	[95]
Co(D-cam) _{1/2} (bdc) _{1/2} (tmdpy) (bdc: ácido 1,4-benzenodicarboxílico; tmdpy: 4,4'-trimetilenedipiridina)	recubrimiento dinámico	alcoholes, aldehídos, aminoácidos	[98]
[Cd(LTP) ₂] _n (LTP: ácido L(-)-tiazolidincarboxílico)	recubrimiento dinámico	aminoácidos, alcoholes, citronelal, limoneno	[99]
InH(D-C ₁₀ H ₁₄ O ₄) ₂ (D: ácido D-canfórico)	recubrimiento dinámico	citronelal, aminoácidos, alcoholes	[100]
1D - [Co-L-GG(H ₂ O)] (L-GG: dipéptido H-Gly-L-Glu)	recubrimiento dinámico	halohidrocarburos, cetonas, ésteres, éteres, ácidos orgánicos, epoxialcanos, alcoholes y sulfóxidos	[101]
[Zn ₂ (D-Cam) ₂ (4,4'-bpy)] _n (bpy: 4,4-bipiridina)	recubrimiento dinámico	alcoholes, limoneno, citronelal, ácidos orgánicos	[102]

[Co₂(man)₂(bpy)₃](NO₃)₂] (man: S-mandelato o R-mandelato)	recubrimiento dinámico	alcoholes y nitrilos	[103]
MIL-101-S-2-Ppa (S-2-Ppa: ácido (S)-2-fenilpropiónico)			
MIL-101-R-Epo (R-Epo: (R)-1,2-epoxietilbenceno)	recubrimiento dinámico	alcoholes, nitrilos, citronelal, aminas, ésteres	[104]
MIL-101-(+)-Ac-L-Ta (Ac-L-Ta: anhidr. (+)-diacetil-L-tartárico)			
MIL-101-L-Pro (L-Pro: L-prolina)			
Zn(ISN)₂.2H₂O (ISN: ácido isonicotínico)	recubrimiento dinámico	citronelal, alcoholes, aminoácidos	[105]
[In₃O(obb)₃(HCO₂)(H₂O)] (obb: ácido 4,4-oxibisbenzoico)	recubrimiento dinámico	limoneno, alcoholes, aminoácidos	[106]

3.3 Bibliografia

- [1] C. E. D. Nazario, B. H. Fumes, M. R. da Silva, and F. M. Lanças, *Miniaturized column liquid chromatography*. Elsevier Inc., 2018, doi: 10.1016/B978-0-12-812792-6/00013-3.
- [2] S. C. Lam, E. Sanz Rodriguez, P. R. Haddad, and B. Paull, “Recent advances in open tubular capillary liquid chromatography,” *Analyst*, vol. 144, no. 11, pp. 3464–3482, 2019, doi: 10.1039/c9an00329k.
- [3] A. de Toffoli, E. Maciel, C. Nazario, and F. Lanças, “Liquid Chromatography, Packed Capillary in: *Encycl. Anal. Sci.*, 3 th.” pp. 182–191, 2019.
- [4] J. Šesták, D. Moravcová, and V. Kahle, “Instrument platforms for nano liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1421, pp. 2–17, 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.07.090.
- [5] F. Svec and G. C. Huber, “Monolithic Materials promises, challenges, achievements,” *Anal. Chem.*, pp. 2101–2107, 2006, doi: 10.1021/ac069383v.
- [6] C. G. Horvath, B. A. Preiss, and S. R. Lipsky, “Fast Liquid Chromatography: An Investigation of Operating Parameters and the Separation of Nucleotides on Pellicular Ion Exchangers,” *Anal. Chem.*, vol. 39, no. 12, pp. 1422–1428, 1967, doi: 10.1021/ac60256a003.
- [7] C. Horvath and S. R. Lipsky, “Rapid Analysis of Ribonucleosides and Bases at the Picomole Level Using Pellicular Cation Exchange Resin in Narrow Bore Columns,” *Anal. Chem.*, vol. 41, no. 10, pp. 1227–1234, 1969, doi: 10.1021/ac60279a024.
- [8] T. Tsuda and M. Novotny, “Band-Broadening Phenomena in Microcapillary Tubes under the Conditions of Liquid Chromatography,” *Anal. Chem.*, vol. 50, no. 4, pp. 632–634, 1978, doi: 10.1021/ac50026a023.
- [9] M. Novotny and T. Tsuda, “Packed Microcapillary Columns in High Performance Liquid Chromatography,” *Anal. Chem.*, vol. 50, no. 2, pp. 271–275, 1978, doi: 10.1021/ac50024a026.
- [10] K. Hibi, D. Ishii, I. Fujishima, T. Takeuchi, and T. Nakanishi, “Studies of open tubular micro capillary liquid chromatography. 1. The development of open tubular micro capillary liquid chromatography,” *J. High Resolut. Chromatogr.*, vol. 1, no. 1, pp. 21–27, 1978, doi: 10.1002/jhrc.1240010106.
- [11] D. Ishii, K. Asai, K. Hibi, T. Jonokuchi, and M. Nagaya, “A study of micro-high performance liquid chromatography,” *J. Chromatogr.*, vol. 144, pp. 157–168, 1977.
- [12] M. V. Novotny, “Development of capillary liquid chromatography: A personal perspective,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1523, pp. 3–16, 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2017.06.042.

- [13] G. Desmet and S. Eeltink, "Fundamentals for LC miniaturization," *Anal. Chem.*, vol. 85, no. 2, pp. 543–556, 2013, doi: 10.1021/ac303317c.
- [14] C. E. D. Nazario, M. R. Silva, M. S. Franco, and F. M. Lanças, "Evolution in miniaturized column liquid chromatography instrumentation and applications: An overview," *J. Chromatogr. A*, vol. 1421, pp. 18–37, 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.08.051.
- [15] J. Hernández-Borges, Z. Aturki, A. Rocco, and S. Fanali, "Recent applications in nanoliquid chromatography," *J. Sep. Sci.*, vol. 30, no. 11, pp. 1589–1610, 2007, doi: 10.1002/jssc.200700061.
- [16] J. P. Chervet, M. Ursem, and J. P. Salzmänn, "Instrumental requirements for nanoscale liquid chromatography," *Anal. Chem.*, vol. 68, no. 9, pp. 1507–1512, 1996, doi: 10.1021/ac9508964.
- [17] K. Mejía-Carmona, J. Soares da Silva Burato, J. V. B. Borsatto, A. L. de Toffoli, and F. M. Lanças, "Miniaturization of liquid chromatography coupled to mass spectrometry: 1. Current trends on miniaturized LC columns," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 122, p. 115735, 2020, doi: 10.1016/j.trac.2019.115735.
- [18] N. Tanaka and D. V. McCalley, "Core-Shell, Ultrasmall Particles, Monoliths, and Other Support Materials in High-Performance Liquid Chromatography," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 1, pp. 279–298, 2016, doi: 10.1021/acs.analchem.5b04093.
- [19] J. W. Jorgenson, "Capillary liquid chromatography at ultrahigh pressures," *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 3, no. 1, pp. 129–150, 2010, doi: 10.1146/annurev.anchem.1.031207.113014.
- [20] F. Svec and Y. Lv, "Advances and recent trends in the field of monolithic columns for chromatography," *Anal. Chem.*, vol. 87, no. 1, pp. 250–273, 2015, doi: 10.1021/ac504059c.
- [21] L. S. Ettre, "M. J. E. Golay and the Invention of Open-Tubular (Capillary) Columns," *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, pp. 221–230, 1987.
- [22] T. Tsuda, K. Hibi, T. Nakanishi, T. Takeuchi, and D. Ishii, "Studies of open-tubular micro-capillary liquid chromatography. II. Chemically bonded octadecylsilane stationary phase," *J. Chromatogr. A*, vol. 158, no. C, pp. 227–232, 1978, doi: 10.1016/S0021-9673(00)89969-0.
- [23] T. J. Causon, R. A. Shellie, E. F. Hilder, G. Desmet, and S. Eeltink, "Kinetic optimisation of open-tubular liquid-chromatography capillaries coated with thick porous layers for increased loadability," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 46, pp. 8388–8393, 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.09.047.
- [24] E. Guihen and J. D. Glennon, "Recent highlights in stationary phase design for open-tubular capillary electrochromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1044, no. 1–2, pp. 67–81, 2004, doi: 10.1016/j.chroma.2004.05.107.

- [25] R. N. LI, Y. N. WANG, M. H. PENG, X. Y. WANG, and G. S. GUO, "Preparation and Application of Porous Layer Open Tubular Capillary Columns with Narrow Bore in Liquid Chromatography," *Chinese J. Anal. Chem.*, vol. 45, no. 12, pp. 1865–1873, 2017, doi: 10.1016/S1872-2040(17)61057-0.
- [26] D. A. Collins, E. P. Nesterenko, and B. Paull, "Porous layer open tubular columns in capillary liquid chromatography," *Analyst*, vol. 139, no. 6, pp. 1292–1302, 2014, doi: 10.1039/c3an01869e.
- [27] S. Forster, H. Kolmar, and S. Altmaier, "Synthesis and characterization of new generation open tubular silica capillaries for liquid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1265, pp. 88–94, 2012, doi: 10.1016/j.chroma.2012.09.054.
- [28] S. Forster, H. Kolmar, and S. Altmaier, "Preparation and kinetic performance assessment of thick film 10-20µm open tubular silica capillaries in normal phase high pressure liquid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1315, pp. 127–134, 2013, doi: 10.1016/j.chroma.2013.09.059.
- [29] E. V. S. Maciel, A. L. de Toffoli, and F. M. Lanças, "Current status and future trends on automated multidimensional separation techniques employing sorbent-based extraction columns," *J. Sep. Sci.*, vol. 42, no. 1, pp. 258–272, 2018, doi: 10.1002/jssc.201800824.
- [30] C. Legido-Quigley, N. D. Marlin, V. Melin, A. Manz, and N. W. Smith, "Advances in capillary electrochromatography and micro-high performance liquid chromatography," *Electrophoresis*, vol. 24, no. 6, pp. 917–944, 2003, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12658680>.
- [31] R. L. M. Syngé and D. L. Mould, "Electrokinetic Ultrafiltration Analysis of Polysaccharides," *Analyst*, vol. 77, no. 964, pp. 964–969, 1952.
- [32] M. Kubín, P. Špaček, and R. Chroměček, "Gel permeation chromatography on porous poly(ethylene glycol methacrylate)," *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.*, vol. 32, no. 11, pp. 3881–3887, 1967, doi: 10.1135/cccc19673881.
- [33] W. D. Ross and R. T. Jefferson, "In situ-formed open-pore polyurethane as chromatography supports," *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 8, no. 7, pp. 386–389, 1970, doi: 10.1093/chromsci/8.7.386.
- [34] S. Hjertén, J. L. Liao, and R. Zhang, "High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds," *J. Chromatogr. A*, vol. 473, no. C, pp. 273–275, 1989, doi: 10.1016/S0021-9673(00)91309-8.
- [35] F. Svec, "Monolithic columns: A historical overview," *Electrophoresis*, vol. 38, no. 22–23, pp. 2810–2820, 2017, doi: 10.1002/elps.201700181.
- [36] T. B. Tennikova, M. Bleha, F. Švec, T. V. Almazova, and B. G. Belenkii, "High-performance membrane chromatography of proteins. A novel method of protein separation," *J. Chromatogr. A*, vol. 13, pp. 63–70, 1990, doi: 10.1016/S0021-

9673(01)87170-3.

- [37] K. B. Lynch, J. Ren, M. A. Beckner, C. He, and S. Liu, "Monolith columns for liquid chromatographic separations of intact proteins: A review of recent advances and applications," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1046, pp. 48–68, 2019, doi: 10.1016/j.aca.2018.09.021.
- [38] Tesis Doctoral "Desarrollo de columnas capilares monolíticas quirales para micro-HPLC. Aplicación a la determinación de contaminantes emergentes" Lic. E. Lubomirsky. LIDMA, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP (junio 2019).
- [39] J. L. Does-Sousa, A. Fernández-Pumarega, J. De Vos, M. Lämmerhofer, G. Desmet, and S. Eeltink, "Guidelines for tuning the macropore structure of monolithic columns for high-performance liquid chromatography," *J. Sep. Sci.*, vol. 42, no. 2, pp. 522–533, 2019, doi: 10.1002/jssc.201801092.
- [40] M. B. Espina-Benitez, J. Randon, C. Demesmay, and V. Dugas, "Development of a new in-line coupling of a miniaturized boronate affinity monolithic column with reversed-phase silica monolithic capillary column for analysis of cis-diol-containing nucleoside compounds," *J. Chromatogr. A*, vol. 1597, pp. 209–213, 2019, doi: 10.1016/j.chroma.2019.04.002.
- [41] Tesis Doctoral "Desarrollo de columnas capilares monolíticas quirales para técnicas separativas miniaturizadas. Aplicación a la enantioseparación de compuestos de interés biológico" Lic. R.N. Echevarría. LIDMA, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP (marzo 2018).
- [42] F. Svec and J. M. J. Fréchet, "Kinetic Control of Pore Formation in Macroporous Polymers. Formation of 'Molded' Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations or Catalysis," *Chem. Mater.*, vol. 7, no. 4, pp. 707–715, 1995, doi: 10.1021/cm00052a016.
- [43] F. Svec and J. M. J. Fréchet, "Temperature, a Simple and Efficient Tool for the Control of Pore Size Distribution in Macroporous Polymers," *Macromolecules*, vol. 28, no. 22, pp. 7580–7582, 1995, doi: 10.1021/ma00126a044.
- [44] C. Viklund, F. Svec, J. M. J. Fréchet, and K. Irgum, "Monolithic, 'molded', porous materials with high flow characteristics for separations, catalysis, or solid-phase chemistry: Control of porous properties during polymerization," *Chem. Mater.*, vol. 8, no. 3, pp. 744–750, 1996, doi: 10.1021/cm950437j.
- [45] E. P. Nesterenko, *Liquid chromatography | Monolithic columns*, 3rd ed. Elsevier Inc., 2018.
- [46] E. Lubomirsky *et al.*, "Polymeric stationary phases for size exclusion chromatography: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1151, 2021, doi: 10.1016/j.aca.2021.338244.
- [47] Z. Zajickova, "Advances in the development and applications of organic–silica hybrid

- monoliths,” *J. Sep. Sci.*, vol. 00, pp. 1–24, 2016, doi: 10.1002/jssc.201600774.
- [48] L. F. Ribeiro, J. C. Masini, and F. Svec, “Use of thiol functionalities for the preparation of porous monolithic structures and modulation of their surface chemistry: A review,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 118, pp. 606–624, 2019, doi: 10.1016/j.trac.2019.06.027.
- [49] J. Ou, H. Lin, Z. Zhang, G. Huang, J. Dong, and H. Zou, “Recent advances in preparation and application of hybrid organic-silica monolithic capillary columns,” *Electrophoresis*, vol. 34, no. 1, pp. 126–140, 2013, doi: 10.1002/elps.201200344.
- [50] J. Ou, Z. Liu, H. Wang, H. Lin, J. Dong, and H. Zou, “Recent development of hybrid organic-silica monolithic columns in CEC and capillary LC,” *Electrophoresis*, vol. 36, no. 1, pp. 62–75, 2015, doi: 10.1002/elps.201400316.
- [51] B. Fresco-Cala, E. J. Carrasco-Correa, S. Cárdenas, and J. M. Herrero-Martínez, “Carbon nanostructures incorporated on methacrylate monoliths for separation of small molecules by nano-liquid chromatography,” *Microchem. J.*, vol. 139, no. 2017, pp. 222–229, 2018, doi: 10.1016/j.microc.2018.03.003.
- [52] Q. Wang *et al.*, “Hydrophilic polymeric monoliths containing choline phosphate for separation science applications,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 999, pp. 184–189, 2018, doi: 10.1016/j.aca.2017.11.032.
- [53] C. Aydoğan and Z. El Rassi, “MWCNT based monolith for the analysis of antibiotics and pesticides in milk and honey by integrated nano-liquid chromatography-high resolution orbitrap mass spectrometry,” *Anal. Methods*, vol. 11, no. 1, pp. 21–28, 2019, doi: 10.1039/c8ay02173b.
- [54] L. F. Ribeiro, R. Lopes Martins, D. M. de Souza Costa, and J. C. Masini, “Poly glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate porous monolith as a versatile platform for the development of separations and solid-phase extractions in sequential injection analyzers,” *J. Sep. Sci.*, vol. 41, no. 24, pp. 4449–4457, 2018, doi: 10.1002/jssc.201800995.
- [55] D. Moravcová, E. J. Carrasco-Correa, J. Planeta, M. Lämmerhofer, and S. K. Wiedmer, “Phosphatidylcholine covalently linked to a methacrylate-based monolith as a biomimetic stationary phase for capillary liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1402, pp. 27–35, 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.05.004.
- [56] Y. Wang *et al.*, “Thiol-radical-mediated polymerization for preparation of POSS-containing polyacrylate monoliths in capillary liquid chromatography,” *Talanta*, vol. 190, no. July, pp. 62–69, 2018, doi: 10.1016/j.talanta.2018.07.061.
- [57] L. Narciso Meirelles, T. Silva Campos, Z. Rodriguez, R. Hernandez, F. Svec, and Z. Zajickova, “‘Single-pot’ approach towards the preparation of alkyl and polyfluoroalkyl organo-silica monolithic capillaries for reversed-phase liquid chromatography,” *J. Sep. Sci.*, vol. 41, no. 19, pp. 3669–3676, 2018, doi: 10.1002/jssc.201800688.
- [58] D. Xu, Q. Wang, E. Sánchez-López, Z. Jiang, and M. L. Marina, “Preparation of an O-[2-

- (methacryloyloxy)-ethylcarbamoyl]-10,11-dihydroquinidine-silica hybrid monolithic column for the enantioseparation of amino acids by nano-liquid chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1593, pp. 63–72, 2019, doi: 10.1016/j.chroma.2019.01.065.
- [59] T. Hara, G. Desmet, G. V. Baron, H. Minakuchi, and S. Eeltink, “Effect of polyethylene glycol on pore structure and separation efficiency of silica-based monolithic capillary columns,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1442, no. 0, pp. 42–52, 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.03.009.
- [60] T. Hara, Y. Izumi, K. Hata, V. G. Baron, T. Bamba, and G. Desmet, “Performance of small-domain monolithic silica columns in nano-liquid chromatography and comparison with commercial packed bed columns with 2 μm particles,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1616, p. 460804, 2020, doi: 10.1016/j.chroma.2019.460804.
- [61] O. M. Yaghi and H. Li, “Hydrothermal synthesis of a Metal-Organic Framework containing large rectangular channels,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 117, no. 41, pp. 10401–10402, 1995.
- [62] P. Peluso, V. Mamane, and S. Cossu, “Homochiral metal-organic frameworks and their application in chromatography enantioseparations,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1363, pp. 11–26, 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2014.06.064.
- [63] M. Eddaoudi *et al.*, “Modular Chemistry: Secondary Building Units as a Basis for Building Units as a Basis for Robust Metal-Organic Carboxylate Frameworks,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 34, no. 4, pp. 319–330, 2001.
- [64] J. Zhang and Z. Chen, “Metal-organic frameworks as stationary phase for application in chromatographic separation,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1530, pp. 1–18, 2017, doi: 10.1016/j.chroma.2017.10.065.
- [65] T. D. Bennett, A. K. Cheetham, A. H. Fuchs, and F. X. Coudert, “Interplay between defects, disorder and flexibility in metal-organic frameworks,” *Nat. Chem.*, vol. 9, no. 1, pp. 11–16, 2016, doi: 10.1038/nchem.2691.
- [66] Y. Yu, Y. Ren, W. Shen, H. Deng, and Z. Gao, “Applications of metal-organic frameworks as stationary phases in chromatography,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 50, pp. 33–41, 2013, doi: 10.1016/j.trac.2013.04.014.
- [67] Z. Sun, J. Hou, L. Li, and Z. Tang, “Nanoporous materials for chiral resolution,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 425, p. 213481, 2020, doi: 10.1016/j.ccr.2020.213481.
- [68] O. Shekhah *et al.*, “Step-by-step route for the synthesis of metal-organic frameworks,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 49, pp. 15118–15119, 2007, doi: 10.1021/ja076210u.
- [69] L. S. Zhang, P. Y. Du, W. Gu, Q. L. Zhao, Y. P. Huang, and Z. S. Liu, “Monolithic column incorporated with lanthanide metal-organic framework for capillary electrochromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1461, pp. 171–178, 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2016.07.015.

- [70] E. J. Carrasco-Correa *et al.*, “Incorporation of zeolitic imidazolate framework (ZIF-8)-derived nanoporous carbons in methacrylate polymeric monoliths for capillary electrochromatography,” *Talanta*, vol. 164, no. November 2016, pp. 348–354, 2017, doi: 10.1016/j.talanta.2016.11.027.
- [71] S. Yang, F. Ye, Q. Lv, C. Zhang, S. Shen, and S. Zhao, “Incorporation of metal-organic framework HKUST-1 into porous polymer monolithic capillary columns to enhance the chromatographic separation of small molecules,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1360, pp. 143–149, 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2014.07.067.
- [72] S. Yang, F. Ye, C. Zhang, S. Shen, and S. Zhao, “In situ synthesis of metal-organic frameworks in porous polymer monolith as stationary phase for capillary liquid chromatography,” *Analyst*, vol. 3, pp. 10715–10722, 2015, doi: 10.1039/C5AN00079C.
- [73] K. Yusuf, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, A. Aqel, and Z. A. Alothman, “Monolithic metal-organic framework MIL-53(Al)-polymethacrylate composite column for the reversed-phase capillary liquid chromatography separation of small aromatics,” *J. Sep. Sci.*, vol. 39, no. 5, pp. 880–888, 2016, doi: 10.1002/jssc.201501289.
- [74] Y. Y. Fu, C. X. Yang, and X. P. Yan, “Incorporation of metal-organic framework UiO-66 into porous polymer monoliths to enhance the liquid chromatographic separation of small molecules,” *Chem. Commun.*, vol. 49, no. 64, pp. 7162–7164, 2013, doi: 10.1039/c3cc43017k.
- [75] H. Y. Huang, C. L. Lin, C. Y. Wu, Y. J. Cheng, and C. H. Lin, “Metal organic framework-organic polymer monolith stationary phases for capillary electrochromatography and nano-liquid chromatography,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 779, pp. 96–103, 2013, doi: 10.1016/j.aca.2013.03.071.
- [76] H. M. Pérez-Cejuela, E. J. Carrasco-Correa, A. Shahat, E. F. Simó-Alfonso, and J. M. Herrero-Martínez, “Incorporation of metal-organic framework amino-modified MIL-101 into glycidyl methacrylate monoliths for nano LC separation,” *J. Sep. Sci.*, vol. 42, no. 4, pp. 834–842, 2019, doi: 10.1002/jssc.201801135.
- [77] X. Bao, L. J. Broadbelt, and R. Q. Snurr, “Computational screening of homochiral metal-organic frameworks for enantioselective adsorption,” *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 157, pp. 118–123, 2012, doi: 10.1016/j.micromeso.2011.08.008.
- [78] X. Bao, L. . Broadbelt, and R. . Snurr, “Elucidation of consistent enantioselectivity for a homologous series of chiral compounds in homochiral metal–organic frameworks,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 12, pp. 6466–6473, 2010, doi: 10.1039/c000809e.
- [79] P. Z. Moghadam and T. Düren, “Origin of enantioselectivity in a chiral metal-organic framework: A Molecular simulation study,” *J. Phys. Chem. C*, vol. 116, no. 39, pp. 20874–20881, 2012, doi: 10.1021/jp3056637.
- [80] S. Bhattacharjee, M. I. Khan, X. Li, Q. L. Zhu, and X. T. Wu, “Recent progress in

- asymmetric catalysis and chromatographic separation by chiral metal–organic frameworks,” *Catalysts*, vol. 8, no. 3, 2018, doi: 10.3390/catal8030120.
- [81] X. Kuang, Y. Ma, H. Su, J. Zhang, Y. Bin Dong, and B. Tang, “High-performance liquid chromatographic enantioseparation of racemic drugs based on homochiral metal-organic framework,” *Anal. Chem.*, 2013, doi: 10.1021/ac403674p.
- [82] X. Wang, A. Lamprou, F. Svec, Y. Bai, and H. Liu, “Polymer-based monolithic column with incorporated chiral metal–organic framework for enantioseparation of methyl phenyl sulfoxide using nano-liquid chromatography,” *J. Sep. Sci.*, vol. 39, no. 23, pp. 4544–4548, 2016, doi: 10.1002/jssc.201600810.
- [83] R.P. Crowley, US Patent 3,422,605 (1969).
- [84] J.J. VanVenrooy, U.S. Patent 3,347,020 (1969).
- [85] I.O. Salyer, R.T. Jefferson, W.D. Ross, US Patent 3,580,843 (1971).
- [86] H. Schnecko and O. Bieber, “Foam Filled Columns in Gas Chromatography,” *Chromatogr. 4*, pp. 109–112, 1971.
- [87] F. D. Hileman, R. E. Sievers, G. G. Hess, and W. D. Ross, “In Situ Preparation and Evaluation of Open Pore Polyurethane Chromatographic Columns,” *Anal. Chem.*, vol. 45, no. 7, pp. 1126–1130, 1973, doi: 10.1021/ac60329a029.
- [88] D. Sýkora, E. C. Peters, F. Svec, and J. M. J. Fréchet, “‘Molded’ porous polymer monoliths: A novel format for capillary gas chromatography stationary phases,” *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 275, pp. 42–47, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1439-2054(20000201)275:1<42::AID-MAME42>3.0.CO;2-X.
- [89] L. He and T. E. Beesley, “Applications of enantiomeric gas chromatography: A review,” *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, vol. 28, no. 7–8, pp. 1075–1114, 2005, doi: 10.1081/JLC-200052997.
- [90] K. Yusuf, A. Y. Badjah-Hadj-Ahmed, A. Aqel, and Z. A. ALothman, “Fabrication of zeolitic imidazolate framework-8-methacrylate monolith composite capillary columns for fast gas chromatographic separation of small molecules,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1406, pp. 299–306, 2015, doi: 10.1016/j.chroma.2015.06.026.
- [91] B. Chen *et al.*, “A microporous metal-organic framework for gas-chromatographic separation of alkanes,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 45, no. 9, pp. 1390–1393, 2006, doi: 10.1002/anie.200502844.
- [92] Z. Y. Gu and X. P. Yan, “Metal-organic framework MIL-101 for high-resolution gaschromatographic separation of xylene isomers and ethlbenzene,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 49, no. 8, pp. 1477–1480, 2010, doi: 10.1002/anie.200906560.
- [93] J. Liu *et al.*, “A novel series of isorecticular metal organic frameworks: Realizing metastable structures by liquid phase epitaxy,” *Sci. Rep.*, vol. 2, pp. 1–5, 2012, doi: 10.1038/srep00921.

- [94] O. Shekhah *et al.*, “Controlling interpenetration in metal-organic frameworks by liquid-phase epitaxy,” *Nat. Mater.*, vol. 8, no. 6, pp. 481–484, 2009, doi: 10.1038/nmat2445.
- [95] S. ming Xie, X. huan Zhang, B. jin Wang, M. Zhang, J. hui Zhang, and L. ming Yuan, “3D Chiral Nanoporous Metal–Organic Framework for Chromatographic Separation in GC,” *Chromatographia*, vol. 77, no. 19–20, pp. 1359–1365, 2014, doi: 10.1007/s10337-014-2719-4.
- [96] S. M. Xie, Z. J. Zhang, Z. Y. Wang, and L. M. Yuan, “Chiral metal-organic frameworks for high-resolution gas chromatographic separations,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 31, pp. 11892–11895, 2011, doi: 10.1021/ja2044453.
- [97] S. Xie, B. Wang, X. Zhang, J. Zhang, M. Zhang, and L. Yuan, “Chiral 3D Open-Framework Material Ni(D-cam)(H₂O)₂ Used as GC Stationary Phase,” vol. 26, pp. 27–32, 2014, doi: 10.1002/chir.
- [98] H. Liu, S. M. Xie, P. Ai, J. H. Zhang, M. Zhang, and L. M. Yuan, “Metal-organic framework Co(D-cam)_{1/2}(bdc)_{1/2}(tmdpy) for improved enantioseparations on a chiral cyclodextrin stationary phase in gas chromatography,” *Chempluschem*, vol. 79, no. 8, pp. 1103–1108, 2014, doi: 10.1002/cplu.201402067.
- [99] J. R. Yang, S. M. Xie, J. H. Zhang, L. Chen, R. Y. Nong, and L. M. Yuan, “Metal-Organic Framework [Cd(LTP)₂]_n for Improved Enantioseparations on a Chiral Cyclodextrin Stationary Phase in GC,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 54, no. 9, pp. 1467–1474, 2016, doi: 10.1093/chromsci/bmw111.
- [100] J. rong Yang, S. ming Xie, H. Liu, J. hui Zhang, and L. ming Yuan, “Metal–Organic Framework InH(d-C10H14O4)₂ for Improved Enantioseparations on a Chiral Cyclodextrin Stationary Phase in GC,” *Chromatographia*, vol. 78, no. 7–8, pp. 557–564, 2015, doi: 10.1007/s10337-015-2863-5.
- [101] L. Li, S. Xie, J. Zhang, L. Chen, P. Zhu, and L. Yuan, “A gas chromatographic stationary of homochiral metal-peptide framework material and its applications,” *Chem. Res. Chinese Univ.*, vol. 33, no. 1, pp. 24–30, 2017, doi: 10.1007/s40242-017-6270-3.
- [102] X. D. Xue, M. Zhang, S. M. Xie, and L. M. Yuan, “Homochiral metal-organic framework [Zn₂(D-Cam)₂(4,4'-bpy)]_n for high-resolution gas chromatographic separations,” *Acta Chromatogr.*, vol. 27, no. 1, pp. 15–26, 2015, doi: 10.1556/AChrom.27.2015.1.2.
- [103] S. Y. Zhang *et al.*, “A Chiral Metal-Organic Material that Enables Enantiomeric Identification and Purification,” *Chem*, vol. 3, no. 2, pp. 281–289, 2017, doi: 10.1016/j.chempr.2017.07.004.
- [104] W. T. Kou, C. X. Yang, and X. P. Yan, “Post-synthetic modification of metal-organic frameworks for chiral gas chromatography,” *J. Mater. Chem. A*, vol. 6, no. 37, pp. 17861–17866, 2018, doi: 10.1039/c8ta06804f.
- [105] X. H. Zhang, S. M. Xie, A. H. Duan, B. J. Wang, and L. M. Yuan, “Separation

- performance of MOFs Zn(ISN)₂·2H₂O as stationary phase for high-resolution GC,” *Chromatographia*, vol. 76, no. 13–14, pp. 831–836, 2013, doi: 10.1007/s10337-013-2484-9.
- [106] S. M. Xie, M. Zhang, Z. X. Fei, and L. M. Yuan, “Experimental comparison of chiral metal-organic framework used as stationary phase in chromatography,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1363, pp. 137–143, 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2014.08.059.

4. Observaciones, conclusiones y perspectivas futuras

4. Observaciones, conclusiones y perspectivas futuras

A partir de una amplia búsqueda bibliográfica, se desprenden las siguientes observaciones y conclusiones:

- Definimos la quiralidad molecular y las relaciones que pueden presentarse entre los isómeros ópticos de una molécula;
- Apreciamos la importancia del estudio de la quiralidad en distintas áreas de la ciencia;
- Analizamos las distintas técnicas analíticas que permiten la determinación enantiomérica;
- Nos enfocamos en los métodos cromatográficos de líquidos y de gases, y describimos los selectores quirales más utilizados;
- Estudiamos la tendencia a la reducción en las dimensiones de los sistemas, que es acompañada por el desarrollo de nuevas columnas cromatográficas. En este sentido, se estudió el desarrollo de materiales monolíticos de distinta naturaleza química, evaluando comparativamente su capacidad para el desempeño cromatográfico;
- Estudiamos las virtudes y falencias de los monolitos orgánicos como fases estacionarias en cromatografía de líquidos, y también una estrategia para mejorar su desempeño;
- Hallamos ocho publicaciones de aplicación en cromatografía de líquidos, en escala miniaturizada, de compósitos de monolitos orgánicos con redes organometálicas;
- Encontramos que los materiales monolíticos son muy escasamente empleados en cromatografía de gases, donde prevalecen las columnas capilares de tubo abierto.

En relación al empleo de redes organometálicas quirales, encontramos que:

- ✓ En cromatografía de líquidos miniaturizada, pueden incorporarse a los monolitos poliméricos orgánicos para aportar simultáneamente, funciones quirales y mejoras en las propiedades porosas del lecho. Hallamos solamente una publicación al respecto.

- ✓ En cromatografía de gases, se emplean directamente como relleno de columnas que presentan baja eficiencia; o en forma de recubrimiento de las paredes del capilar (doce publicaciones).

Perspectiva futura

Aunque el desarrollo de materiales porosos quirales, específicamente de redes organometálicas quirales es muy incipiente, éstas muestran un gran potencial como selectores quirales para ser incorporadas a columnas con aplicaciones en cromatografía de líquidos en escala miniaturizada y en cromatografía de gases de alta resolución.

Por lo tanto, parece razonable y posible proyectar futuros estudios centrados en el desarrollo de nuevas columnas capilares para cromatografía de gases y de columnas monolíticas para cromatografía de líquidos, preparadas mediante la incorporación de redes organometálicas quirales, derivadas por ejemplo, de un ligando natural (estereoquímicamente puro) y cationes de transición divalentes, para ser empleadas en la resolución enantiomérica de distintas familias químicas de analitos quirales.

5. Anexos

Anexo I: Estudio de las variables que inciden en la síntesis de monolitos poliméricos orgánicos

La gran simplicidad, versatilidad y bajo costo de la preparación de los lechos monolíticos orgánicos, hacen que estas columnas se puedan obtener fácilmente en cualquier longitud y diámetro. Además, pueden prepararse a partir de diversos monómeros, y esta flexibilidad permite realizar ajustes sencillos para conseguir la columna deseada.

Como se mencionó anteriormente, la mezcla de polimerización es una combinación de precursores entre los que se encuentran un monómero funcional y un entrecruzante, una mezcla porogénica de disolventes y un iniciador radicalario. La mezcla 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) (**Figura A.1**). 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).

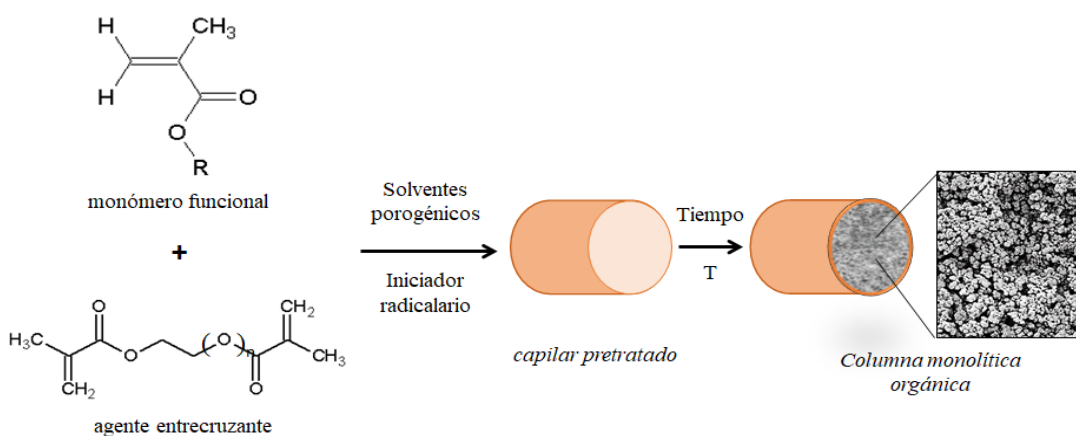


Figura A.1: Representación esquemática de la fabricación de una columna capilar monolítica orgánica. (R = sustituyente de diferente naturaleza química en el monómero funcional).

Los monómeros funcionales, determinan la hidrofobicidad y las características químicas del lecho. Existe una gran variedad de monómeros, pero los derivados de metacrilato son los más utilizados, específicamente el glicidilmetacrilato (GMA) [1] que permite la derivatización post síntesis a través de su grupo epóxido y el 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) que contiene grupos OH⁻ que le confieren un carácter polar al lecho monolítico [2,3].

Los primeros trabajos destinados a la preparación de los monolitos, identificaron variables esenciales para el control de las propiedades resultantes, como el tipo y cantidad de disolventes porógenos, la temperatura de polimerización, el tiempo de iniciación radicalario, el contenido del agente entrecruzante, las dimensiones del capilar para sintetizar la columna, entre otros [4,5].

A continuación, se proporcionan lineamientos generales para mejorar la estructura del soporte monolítico con el fin de ser utilizado en separaciones cromatográficas de alta velocidad y eficiencia.

Composición de los disolventes porogénicos

El método más eficaz para ajustar el tamaño de los macroporos y los glóbulos consiste en seleccionar los ***disolventes porogénicos*** adecuados y ajustar sus respectivas proporciones, dado que la formación de la estructura macroporosa es una interacción compleja de efectos termodinámicos y cinéticos. Los porógenos deben tener preferentemente un alto punto de ebullición y ser químicamente inertes. Además, debe obtenerse una solución homogénea al disolver los monómeros [6].

Se considera que el solvente utilizado como porógeno puede ser un “*buen*” o un “*mal*” solvatante: el “*buen*” solvatante se prefiere generalmente para formar micro/mesoporos, mientras que el “*mal*” solvatante se usa para generar un polímero meso/macroporoso [7,8]. Esto se debe a que la propiedad solvatante del disolvente porogénico afecta significativamente la separación de fases que ocurre en un determinado momento del transcurso de la reacción de polimerización, y que influye en las propiedades finales del polímero.

Por lo general, se emplea una mezcla binaria de solventes de diferente polaridad como “formadores” de la estructura meso/macroporosa del monolito. Esta mezcla debe disolver

a los monómeros, pero no al polímero formado, por lo que, cuando la mezcla llega al punto de saturación, se produce una separación de fases. Si la separación de fases es temprana, es decir que los solventes porogénicos disuelven bien a los monómeros, las pocas cadenas entrecruzadas que precipitaron quedan solvatadas preferencialmente por los monómeros aún en solución; de esta manera, los glóbulos siguen creciendo y la estructura resultante es de glóbulos grandes y con poros grandes (**Figura A.2.A**). Por el contrario, si la separación de fases es tardía, lo cual ocurre con una mezcla de solventes que solvate bien al polímero, éste crece en solución y forma un monolito más compacto, con glóbulos más pequeños y poros más chicos, lo que resulta en un monolito menos permeable al pasaje de solvente (**Figura A.2.B**) [9]. Cabe señalar que también se han creado entidades monolíticas, en las que el diámetro de los glóbulos y de los macroporos disminuyó al aumentar la cantidad de "mal" solvente en la mezcla porogénica. En este caso, parece que la cinética de la reacción se acelera y se forma un mayor número de glóbulos más pequeños que conducen a una estructura con un tamaño de macroporo más pequeño (**Figura A.2.C**) [6].

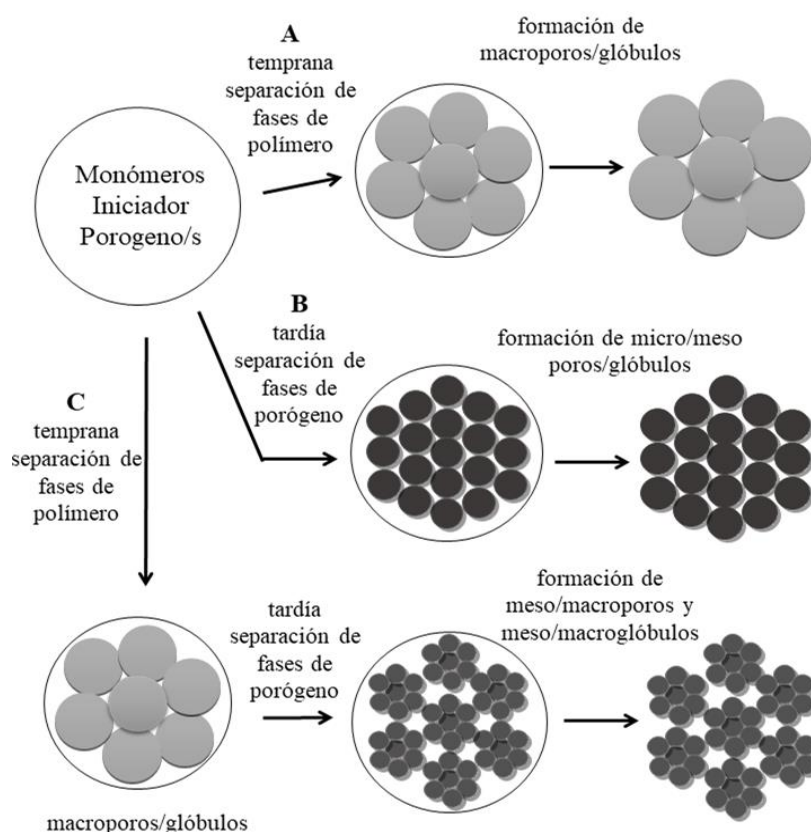


Figura A.2: Representación esquemática de la formación de poros en polímeros monolíticos. Adaptado de Mane y col. [9].

La **Figura A.3** muestra mediante micrografías SEM el efecto de la relación de solventes porógenicos (1-dodecanol / ciclohexanol) sobre la estructura de un monolito polimérico de poli(HEMA-*co*-EDMA). Un menor contenido del solvatante “malo” (1-dodecanol) da lugar a una competencia entre el mejor solvatante (ciclohexanol) y los monómeros por la solvatación de los núcleos. A medida que se incrementa el contenido de 1-dodecanol en el sistema porogénico se obtiene una separación de fases más temprana del polímero. En este sentido, se observa que los glóbulos se hacen más grandes y compactos al aumentar la polaridad en la mezcla porogénica [2].

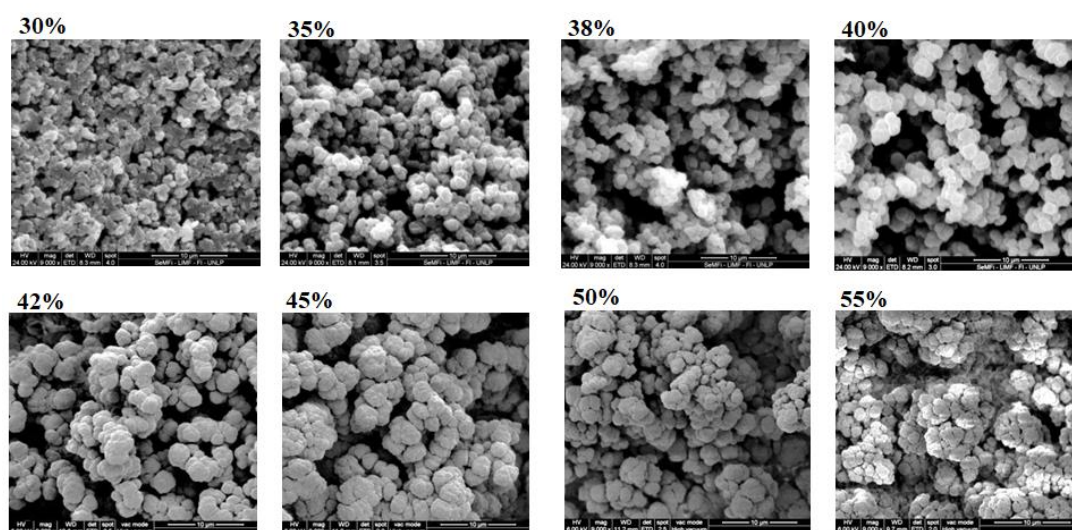


Figura A.3: Micrografías SEM del monolito poli(HEMA-*co*- EDMA) con diferentes contenidos de 1-dodecanol en la mezcla porogénica.

Temperatura de polimerización

La cinética de reacción está influenciada por el tipo y la cantidad de iniciador utilizado y también por las condiciones de polimerización, como la ***temperatura o la intensidad de la irradiación***. Durante una polimerización térmica, se genera un exceso de calor durante la reacción de polimerización, y el flujo de calor se puede controlar mejor con un diámetro interno pequeño de los recipientes de reacción, dando lugar a estructuras más homogéneas. En general, la polimerización se completa más rápidamente con luz ultravioleta (10-20 min) que en un sistema iniciado térmicamente (20-24 h); por lo tanto, los fenómenos relacionados con la sedimentación que inducen la falta de homogeneidad,

deberían ser menos evidentes en el caso de una fotopolimerización [6].

Sin embargo, la iniciación térmica sigue siendo la más utilizada, debido a su fácil acceso y costo. En este sentido, para obtener monolitos con estructuras porosas uniformes y reproducibles, si se incrementa la temperatura de reacción, hay dos efectos que ocurren en simultáneo. Por un lado, se generan más núcleos de polimerización debido a una mayor rapidez de descomposición del iniciador radicalario, lo cual da lugar a un mayor número de glóbulos pequeños y por lo tanto un material menos permeable [10]. Por otro lado, al incrementar la temperatura aumenta la solubilidad del polímero en los solventes porogénicos, lo cual retrasa la separación de fases. Cuanto mayor es el grado de avance de la polimerización en solución, más compacta será la estructura final, y por lo tanto, menor el tamaño de los macroporos [11]. En el caso de una temperatura de polimerización baja, el tamaño de los poros será mayor. La **Figura A.4** muestra el efecto de la temperatura sobre la distribución de tamaño de poro de capilares monolíticos de poli(GMA-*co*-EDMA) preparados a 55 y 70°C [4].

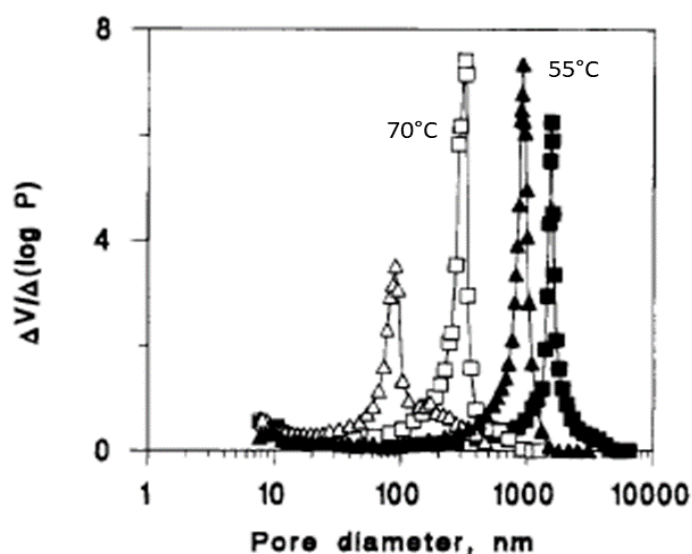


Figura A.4: Distribución del tamaño de poros obtenida mediante MIP, para poli(GMA-*co*-EDMA) a una temperatura de 55°C (puntos llenos) y a 70°C (puntos vacíos).

Se observa que la temperatura incide directamente sobre la cinética de polimerización, y que su control es vital en la fabricación de fases estacionarias monolíticas, debido a su fuerte influencia sobre la distribución de tamaño de poros y velocidad de crecimiento de los núcleos [12].

Tiempo de polimerización

La variación del tiempo de polimerización tiene un impacto considerable sobre las propiedades porosas de los monolitos orgánicos preparados mediante reacción con iniciación térmica. La reducción del tiempo de polimerización permite el pasaje de una distribución monomodal de macroporos a una distribución de poros bimodal con presencia de una cantidad suficientemente alta de mesoporos; resultando en fases estacionarias para HPLC que pueden utilizarse para separar eficientemente compuestos de bajo peso molecular.

Al mismo tiempo, la porosidad total aumenta debido a la disminución en la conversión del monómero que, a su vez conduce a la ampliación del tamaño de los canales de flujo y, por lo tanto, a una mayor permeabilidad de la columna.

De esta forma, el tiempo de reacción ayuda a extender la aplicabilidad de los monolitos orgánicos más allá de la separación de biomacromoléculas, haciéndolos adecuados a separaciones de moléculas pequeñas [13]. En este mismo sentido, Nischang y Bruggemann estudiaron la influencia del tiempo de polimerización en el rendimiento de columnas monolíticas de poli(BMA-co-EDMA) [14]. La **Figura A.5** muestra que la columna monolítica sintetizada durante un lapso de 30 min separa alquilbencenos con suficiente resolución ($N \sim 67.000$ platos/m), mientras que una columna similar polimerizada durante 48 h carece de separación para estos analitos. Los autores también observaron una disminución en la permeabilidad con el aumento del tiempo de polimerización, respaldado por las micrografías SEM que también se muestran en la misma figura.

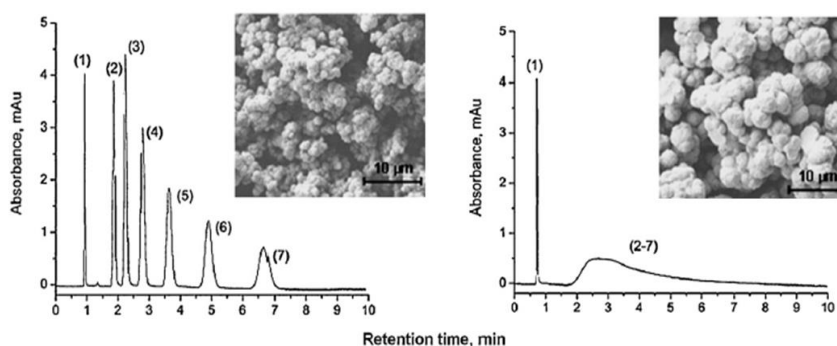


Figura A.5: Cromatogramas y micrografías SEM para una serie homóloga de alquilbencenos en una columna monolítica de poli(BMA-co-EDMA) obtenida luego de 30 min (izq.) y luego de 48 h (der.) de polimerización térmica.

En la síntesis de estos monolitos, específicamente cuando se finaliza la polimerización a tiempos cortos de reacción, no sólo se logra un monolito con glóbulos más pequeños, sino que muchas veces éstos poseen el exterior mesoporoso. Esta estructura mesoporosa se debe a que, a bajas conversiones, el polímero en crecimiento tiene un alto grado de entrecruzamiento [15], permitiendo separar de manera eficiente compuestos de bajo peso molecular.

Aunque los estudios señalados anteriormente han demostrado buenos rendimientos de separación, es probable que intentar detener una reacción de polimerización en la parte más empinada de la curva de conversión conduzca a problemas con la repetibilidad en la morfología de los monolitos [6].

Contenido de entrecruzante

Otro de los factores a tener en cuenta, es el contenido de agente entrecruzante en la mezcla de monómeros, que afecta tanto a la composición química del lecho monolítico como a sus propiedades porosas. De modo que, en general un incremento del contenido de entrecruzante produce una disminución del tamaño de poro debido a la temprana formación de microglóbulos con un alto grado de entrecruzamiento. Además, el porcentaje de entrecruzante puede afectar la rigidez y homogeneidad del monolito [10].

La polimerización de mezclas con un alto contenido de entrecruzante puede resultar útil para obtener lechos monolíticos de elevada área superficial, más de $100 \text{ m}^2\text{gr}^{-1}$. Esta propiedad se asigna por un mayor volumen de poros pequeños, lo cual conduce a mejorar la eficiencia de la columna para separaciones de moléculas pequeñas. Sin embargo, estos monolitos presentan una permeabilidad bastante limitada, por lo que su uso en HPLC y CEC se encuentra muy restringido. Por ello, debe usarse un bajo porcentaje de entrecruzante en la mezcla de polimerización, típicamente menos del 30%, para obtener monolitos con una permeabilidad aceptable [16].

Dimensiones del “molde”

Se ha estudiado el efecto del tamaño del recipiente contenedor o “molde” en el que se realiza la reacción de polimerización sobre la morfología resultante de los monolitos. Bystrom y col. sintetizaron estructuras monolíticas mediante reacciones de polimerización iniciadas térmicamente en columnas capilares de 250 μm d.i., y en tubos de vidrio de 4,4 mm d.i.(microviales de 100 μL) y 9,7 mm d.i. (viales de 2 mL) [17]. Si bien las imágenes SEM no revelaron diferencias significativas, se observaron diferencias en el diámetro de los poros y la distribución del tamaño de los macroporos aplicando porosimetría de intrusión de mercurio (**Figura A.6**), observándose que, con la disminución del diámetro interno de la columna, aumentaba el tamaño de los macroporos.

He y col. estudiaron con columnas capilares transparentes de 50, 20, 10 y 5 μm d.i. los efectos sobre la morfología de los monolitos en polimerizaciones iniciadas mediante radiación UV [18]. Concluyeron que el grado de deformación de la estructura porosa depende de la relación entre el diámetro del capilar y el tamaño de los poros del monolito. Para un tamaño de capilar menor a 10 μm , la morfología se ve afectada al límite, dando lugar a la formación de una capa de polímero en la pared de la columna.

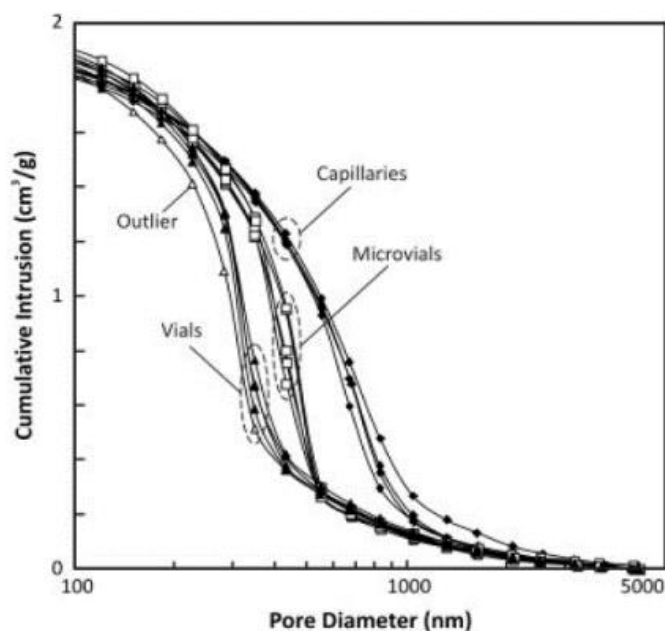


Figura A.6: Volumen de intrusión de mercurio acumulativo en función del diámetro de poros para los diferentes moldes.

Los experimentos realizados por Nischang y col. reconfirmaron que la disminución del diámetro interno de 75 μm a 5 μm condujo a estructuras monolíticas con morfologías claramente diferentes (iniciación térmica), y se observó una disminución en el ancho de pico registrado en modo de elución con gradiente [19]. Para evitar la formación de una capa densa de polímero en la pared de la columna capilar, se propuso optimizar la síntesis mediante la modificación de la superficie (antes de la polimerización).

Los resultados presentados por diferentes grupos hasta la fecha sugieren que la morfología y estructura homogénea a lo largo del lecho monolítico se ve afectada por las dimensiones del molde. Aunque no existe una explicación certera y clara del efecto sobre la distribución del tamaño de los poros, esto podría deberse al mecanismo básico de polimerización [4].

La evaluación de las columnas monolíticas preparadas en el laboratorio puede realizarse por medios físicos, químicos y cromatográficos. La caracterización morfológica se realiza mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), porosimetría de intrusión de mercurio (MIP), adsorción/desorción de nitrógeno evaluada mediante la ecuación de Brunauer-Emmet-Teller (BET) y medidas de permeabilidad cromatográfica (Bo), que permiten determinar la porosidad, área superficial, volumen y distribución de tamaño de poros del lecho monolítico. Además, se pueden caracterizar químicamente por medio del análisis elemental C, H, N, O y S y espectrometría infrarroja (IR) para determinar grupos funcionales orgánicos. La performance cromatográfica se evalúa a partir de la eficiencia (N), selectividad (α) y capacidad de separación (R_s) de las columnas monolíticas.

Anexo II: Nomenclatura y estructura química de MOFs

Tabla A.II: Nombres y composición química de MOFs más típicos [20].

Designación	Fórmula	Interpretación de la abreviatura
MOF-74	Zn ₂ DOT	Redes organometálicas
MOF-101	Cu ₂ (BDC-Br) ₂ (H ₂ O) ₂	
MOF-177	Zn ₄ O(BTB) ₂	
MOF-235	[Fe ₃ O(BDC) ₃ (DMF) ₃][FeCl ₄]·(DMF) ₃	
MOF-253	Al(OH)(BPYDC)	
IRMOF-1	Zn ₄ O(BDC) ₃ ·7DEF·3H ₂ O	Redes organometálicas
(MOF-5)		
IRMOF-16	Zn ₄ O(TPDC) ₃ ·17DEF·2H ₂ O	isoreticulares
UiO-66	Zr ₆ O ₆ (BDC) ₆	Universidad de Oslo
UiO-67	Zr ₆ O ₆ (BPDC) ₆	
UiO-68	Zr ₆ O ₆ (TPDC) ₆	
MIL-53	Al(OH)(BDC)	Materiales del Instituto Lavoisier
MIL-53(Al)-NH ₂	Al(OH)(BDC-NH ₂)	
MIL-88A	Fe ₃ O(MeOH) ₃ (O ₂ CCH=CHCO ₂) ₃ ·MeCO ₂ ·nH ₂ O	
MIL-88-Fe	Fe ₃ O(MeOH) ₃ (O ₂ C(CH ₂) ₂ CO ₂) ₃ ·AcO·(MeOH) _{4.5}	
MIL-88B-4CH ₃	2Fe ₃ O(OH)(H ₂ O) ₂ (BDC-Me ₂) ₃	
MIL-100-Fe	Fe ^{III} ₃ O(H ₂ O) ₂ F·(BTC) ₂ ·nH ₂ O	
MIL-101	Cr ₃ O(H ₂ O) ₂ F·(BDC) ₃ ·nH ₂ O	
HKUST-1	Cu ₃ (BTC) ₂	Universidad de Ciencia y Tecnología de Hong Kong
(MOF-199)		

LIC-1	$\text{Gd}_2(\text{BDC-NH}_2)_3(\text{DMF})_4$	Instituto Leiden de Química
ZIF-8	$\text{Zn}(\text{MIM})_2$	Redes Zeolíticas de Imidazolatos
ZIF-90	$\text{Zn}(\text{FIM})_2$	
CPL-2	$\text{Cu}_2(\text{PZDC})_2(4,4'\text{-BPY})$	Polímero de coordinación con estructura de pilares
F-MOF-1	$[\text{Cu}(\text{HFBBA})(\text{phen})_2](\text{H}_2\text{HFBBA})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{HCO}_2)$	Redes Organometálicas Fluoradas
MOP-1	$\text{Cu}_{24}(\text{m-BDC})_{24}(\text{DMF})_{14}(\text{H}_2\text{O})_{10}$	Poliedro Metal- Orgánico

DOT = 2,5-dihidroxitereftalato; BPYDC = 2,20-bipiridina-5,50-dicarboxilato; DEF = N,N-dietil-formamida; TPDC = p-terfenil-4,40-dicarboxilato; BPDC = bifenil-4,40-dicarboxilato; MIM = 2-metilimidazolato; FIM = 2-formilimidazolato; PZDC = pirazina-2,3-dicarboxilato; 4,4-BPY = 4,4-bipiridina; phen = 1,1-fenantrolina; HFBBA = 4,40-(hexafluoroisopropilideno)dibenzoato; m-BDC = m-benzenodicarboxilato (para BDC, BDC-Br, BDC-NH₂, BDC-Me₂, BTB, BTC).

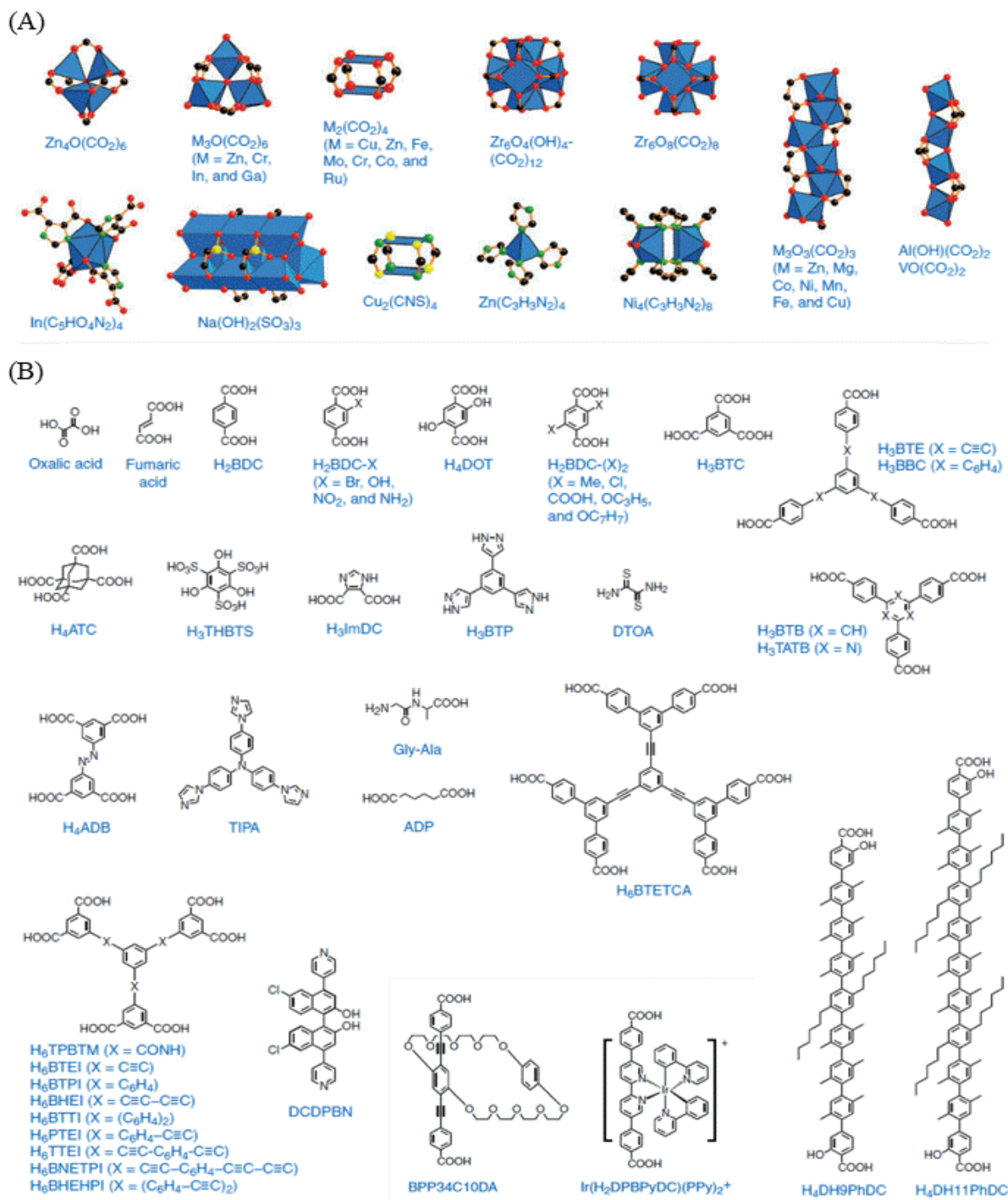


Figura A.II: Unidades de construcción secundaria (A) y ligandos orgánicos (B).

Referencias: negro, C; rojo, O; verde, N; amarillo, S; púrpura, P; verde claro, Cl; poliedros azules, iones metálicos. Los átomos de hidrógeno se omiten para mayor claridad. AIPA = tris (4-(1H-imidazol-1-il)fenil)amina; ADP = ácido adípico; TTFTB4 = 4,4',4'',4'''-([2,2'-bis(1,3-ditiolilideno)]-4,4',5,5'-tetrail)tetrabenzoato[21].

Bibliografía

- [1] J. Courtois, E. Byström, and K. Irgum, "Novel monolithic materials using poly(ethylene glycol) as porogen for protein separation," *Polymer (Guildf)*, vol. 47, no. 8, pp. 2603–2611, 2006, doi: 10.1016/j.polymer.2006.01.096.
- [2] R. N. Echevarría, S. Keunchkarian, J. Villarroel-Rocha, K. Sapag, and M. Reta, "Organic monolithic capillary columns coated with cellulose tris(3,5-dimethylphenyl carbamate) for enantioseparations by capillary HPLC," *Microchem. J.*, vol. 149, no. June, p. 104011, 2019, doi: 10.1016/j.microc.2019.104011.
- [3] M. Lämmerhofer, F. Svec, J. M. J. Fréchet, and W. Lindner, "Capillary electrochromatography in anion-exchange and normal-phase mode using monolithic stationary phases," *J. Chromatogr. A*, vol. 925, no. 1–2, pp. 265–277, 2001, doi: 10.1016/S0021-9673(01)01034-2.
- [4] F. Svec and J. M. J. Fréchet, "Kinetic Control of Pore Formation in Macroporous Polymers. Formation of 'Molded' Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations or Catalysis," *Chem. Mater.*, vol. 7, no. 4, pp. 707–715, 1995, doi: 10.1021/cm00052a016.
- [5] E. Vasconcelos Soares Maciel, A. L. de Toffoli, E. Sobieski, C. E. Domingues Nazário, and F. M. Lanças, "Miniaturized liquid chromatography focusing on analytical columns and mass spectrometry: A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1103, pp. 11–31, 2019, doi: 10.1016/j.aca.2019.12.064.
- [6] J. L. Does-Sousa, A. Fernández-Pumarega, J. De Vos, M. Lämmerhofer, G. Desmet, and S. Eeltink, "Guidelines for tuning the macropore structure of monolithic columns for high-performance liquid chromatography," *J. Sep. Sci.*, 2018, doi: 10.1002/jssc.201801092.
- [7] M. Shivashankar and B. K. Mandal, "A review on interpenetrating polymer network," *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 4, no. SUPPL. 5, pp. 1–7, 2012.
- [8] M. H. Mohamed and L. D. Wilson, "Porous Copolymer Resins: Tuning Pore Structure and Surface Area with Non Reactive Porogens," *Nanomaterials*, vol. 2, no. 2, pp. 163–186, 2012, doi: 10.3390/nano2020163.
- [9] S. Mane, "Effect of Porogens (Type and Amount) on Polymer Porosity: A Review," *Canchemtrans.Net*, vol. 4, no. 2, pp. 210–225, 2016, doi: 10.13179/canchemtrans.2016.04.02.0304.
- [10] C. Viklund, F. Svec, J. M. J. Fréchet, and K. Irgum, "Monolithic, 'molded', porous materials with high flow characteristics for separations, catalysis, or solid-phase chemistry: Control of porous properties during polymerization," *Chem. Mater.*, vol. 8, no. 3, pp. 744–750, 1996, doi: 10.1021/cm950437j.
- [11] M. R. Buchmeiser, "Polymeric monolithic materials: Syntheses, properties, functionalization and applications," *Polymer (Guildf)*, vol. 48, no. 8, pp. 2187–2198, 2007, doi: 10.1016/j.polymer.2007.02.045.
- [12] F. Svec, T. B. Tennikova, and Z. Deyl, *Monolithic Materials preparation, properties and applications*, vol. 67. 2003.
- [13] J. Urban, "Current trends in the development of porous polymer monoliths for the separation of small molecules," *J. Sep. Sci.*, vol. 39, no. 1, pp. 51–68, 2016, doi: 10.1002/jssc.201501011.
- [14] I. Nischang and O. Brüggemann, "On the separation of small molecules by means of nano-

- liquid chromatography with methacrylate-based macroporous polymer monoliths,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 33, pp. 5389–5397, 2010, doi: 10.1016/j.chroma.2010.06.021.
- [15] M. Merhar, A. Podgornik, M. Barut, M. Žigon, and A. Štrancar, “Methacrylate monoliths prepared from various hydrophobic and hydrophilic monomers - Structural and chromatographic characteristics,” *J. Sep. Sci.*, vol. 26, no. 3–4, pp. 322–330, 2003, doi: 10.1002/jssc.200390038.
 - [16] F. Svec, “Quest for organic polymer-based monolithic columns affording enhanced efficiency in high performance liquid chromatography separations of small molecules in isocratic mode,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1228, pp. 250–262, 2012, doi: 10.1016/j.chroma.2011.07.019.
 - [17] E. Byström, C. Viklund, and K. Irgum, “Differences in porous characteristics of styrenic monoliths prepared by controlled thermal polymerization in molds of varying dimensions,” *J. Sep. Sci.*, vol. 33, no. 2, pp. 191–199, 2010, doi: 10.1002/jssc.200900668.
 - [18] M. He, Y. Zeng, X. Sun, and D. J. Harrison, “Confinement effects on the morphology of photopatterned porous polymer monoliths for capillary and microchip electrophoresis of proteins,” *Electrophoresis*, vol. 29, no. 14, pp. 2980–2986, 2008, doi: 10.1002/elps.200800040.
 - [19] I. Nischang, F. Svec, and J. M. J. Fréchet, “Downscaling limits and confinement effects in the miniaturization of porous polymer monoliths in narrow bore capillaries,” *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 17, pp. 7390–7396, 2009, doi: 10.1021/ac901162x.
 - [20] V. V Butova, M. A. Soldatov, A. A. Guda, K. A. Lomachenko, and C. Lamberti, “Metal-organic frameworks: structure, properties, methods of synthesis and characterization,” *Russ. Chem. Rev.*, vol. 85, no. 3, pp. 280–307, 2016, doi: 10.1070/rcr4554.
 - [21] H. Furukawa, K. E. Cordova, M. O’Keeffe, and O. M. Yaghi, “The chemistry and applications of metal-organic frameworks,” *Science (80-.)*, vol. 341, no. 6149, 2013, doi: 10.1126/science.1230444.