

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS



Estudio de la complejación entre selectores quirales derivados de ciclodextrina y solutos con actividad óptica por cromatografía gaseosa en columnas capilares

Trabajo de tesis presentado por Pablo Jorge Lebed para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas

La Plata, Buenos Aires, Argentina

Agosto de 2010

Lebed, Pablo Jorge

Estudio de la complejación entre selectores quirales derivados de ciclodextrina y solutos con actividad óptica por cromatografía gaseosa en columnas capilares. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2010.

E-Book.

ISBN 978-950-34-0916-9

1. Química. 2. Tesis de Doctorado. I. Título
CDD 540.711

Fecha de catalogación: 12/11/2012

Dedicado a Miriam, Milagros y Micaela

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a las distintas instituciones del sistema científico nacional, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), a la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Exactas las cuales a través de becas, subsidios y espacio de trabajo hicieron posible la realización de esta tesis.

Quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Cecilia Castells, por su excelente dirección, su compromiso y por su amistad. Quiero decirle que he encontrado la formación que vine a buscar.

Agradezco también a todos mis compañeros del Laboratorio de Separaciones Analíticas por su generosidad y apoyo en todo momento. En especial, quiero mencionar al Dr. Jaiver Osorio Grisales porque en los cuatro años que ha durado este trabajo jamás me ha negado ni un minuto de su tiempo para ayudarme a desentrañar los misterios de la Cromatografía. ¡Gracias Jaiver! También quiero mencionar a la Dra. LÍlian Romero, por los momentos compartidos durante las “Geoclases”, le agradezco la confianza que deposito en mi y su constante apoyo. Me he sentido muy valorado. ¡Gracias LÍlian!

Quiero agradecer a mis padres y hermanos, sin duda, son los mejores.

Agradezco a mi esposa Miriam el que nunca me haya dejado bajar los brazos.

Y finalmente, quiero agradecer con todo el amor del mundo, a mis hijas Milagros y Micaela, quienes a pesar de las horas que esta tesis les ha quitado siempre me han esperado con una sonrisa.

Tabla de contenido

CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN	9
1. DROGAS QUIRALES.....	9
1.1. Razones para producir enantiómeros puros	9
1.2. Legislación y Propiedad Intelectual	9
1.3. Desarrollo de drogas enantioméricamente puras	12
1.4. Cromatografía enantioselectiva	14
1.4.1. Separación indirecta	15
1.4.2. Separación directa	15
2. CICLODEXTRINAS EN CROMATOGRAFÍA.....	19
2.1. Desarrollo histórico	19
2.2. Ciclodextrinas derivatizadas	19
3. PARÁMETROS TERMODINÁMICOS.....	23
3.1. Expresiones de $K(T)$	23
3.2. Selectividad aparente vs. Selectividad verdadera	24
3.3. Modelo de incremento de la retención R'	26
3.4. Determinación de la relación de fases, β	29
3.5. Determinación del tiempo muerto.....	31
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo general	33
4.2. Objetivos específicos	33
CAPÍTULO II - EXPERIMENTAL.....	34
5. MATERIALES.....	34
5.1. Columnas cromatográficas	34
5.2. Reactivos derivatizantes	34
5.3. Solventes	34
5.4. Analitos.....	34
6. MÉTODOS.....	37
6.1. Determinación de la densidad de las fases estacionarias	37

6.2.	Fabricación columnas cromatográficas	37
6.3.	Derivatizaciones.....	38
6.4.	Medidas cromatográficas	39
6.5.	Caracterización de las columnas capilares	39
6.6.	Determinación de tiempo muerto.....	40
6.7.	Cálculo de las constantes de partición aparentes	40
6.8.	Cálculo de las constantes de partición termodinámicas	40
6.9.	Análisis estadístico.....	41
CAPÍTULO III - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		42
1.	DENSIDAD DE LAS FASES ESTACIONARIAS	42
2.	DETERMINACIÓN DE B.....	44
3.	PROPIEDADES CROMATOGRÁFICAS.....	46
4.	DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE PARTICIÓN DE METANO.....	48
5.	SELECTIVIDAD.....	49
6.	DETERMINACIÓN DE CONSTANTES DE ASOCIACIÓN ENANTIÓMERO-SELECTOR QUIRAL. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	53
6.1.	Modelo del incremento de la retención	63
6.2.	Influencia de la temperatura	65
CAPÍTULO IV - CONCLUSIONES		73
ANEXOS		75
ANEXO A1		75
ANEXO A2		81
BIBLIOGRAFÍA		88

Lista de tablas

Tabla 1. Analitos quirales utilizados con la presión de vapor correspondiente a la temperatura indicada.	35
Tabla 2. Datos de la calibración del picnómetro.	42
Tabla 3. Datos de la densidad experimental y calculada del polisiloxano OV1701.	42
Tabla 4. Datos de la densidad experimental y calculada de la mezcla de selector quiral y polisiloxano OV1701 con una concentración de 10% (p/p).	43
Tabla 5. Características de las columnas capilares construidas.	45
Tabla 6. Comparación de la eficiencia y la asimetría de los picos obtenidos de la inyección de C ₁₂ en las columnas LP26 y LIPODEX-E.	46
Tabla 7. Errores sistemáticos al utilizar el t _{R(CH4)} como medida del t _M	49
Tabla 8. Valores de resolución selectividad y retención comparando la columna LIPODEX E comercial y la columna LP26 construida.	50
Tabla 9. Resultados de la regresión por cuadrados mínimos entre Kap _{1,2} y molalidad, coeficientes de partición y constantes de asociación enantiomérica.	58
Tabla 10. Valores de incremento de la retención R ₁ para el primer enantiómero eluido del par utilizando como estándares de referencia los n-alcanos de C7 a C10. Enantioselectividades estimadas del modelo de incremento de la retención.	65
Tabla 11. Propiedades termodinámicas correspondientes a la complejación entre enantiómero y el selector quiral Lipodex E.	70

Lista de figuras

Figura 1. Estereoisómeros S (izquierda) y R (derecha) de la talidomida.....	9
Figura 2. Distribución de las drogas aprobadas teniendo en cuenta su carácter quiral. (a) Aprobadas mundialmente, período 1983-2002 (b) Aprobadas por FDA, período 1991-2002.	10
Figura 3. Distribución de las drogas aprobadas mundialmente teniendo en cuenta su carácter quiral en rangos de cuatro años.	11
Figura 4. Estructuras químicas de fármacos representativos de sustancias repatentadas como enantiómeros simples. Lipitor es atorvastatin calcio, Plavix es clopidogrel bisulfato, Nexium es esomeprazol magnesio, Lexapro/Cipralext es escitalopram oxalato, Levaquin/Tavanic es levofloxacina y Altace es ramipril.....	12
Figura 5. Diagrama del concepto SMB utilizando cuatro zonas en dos etapas consecutivas.	13
Figura 6. Estructura del ciclocolato utilizado como selector quiral.....	16
Figura 7. (a) Representación de la estructura de un calix[4]areno y la designación de sus caras. (b) Fase estacionaria Chirasil-Calix utilizada en CG.....	18
Figura 8. Aniones y cationes de líquidos iónicos a temperatura ambiente más comunes. Cationes: 1, Ion imidazolio; 2, ion N-alquilpiridinio; 3, ion tetraalquilamonio; 4, ion tetraalquilfosfonio. R1, R2, R3 y R4 son grupos alquilo y pueden similares o diferentes. Aniones: 5, hexafluorofosfato; 6, tetrafluoroborato; 7, trifluorometilsulfonato; 8, bis(trifluorometanosulfonyl)imida.....	18
Figura 9. Estructura de octakis(3-O-butanoil-2,6-di-O-pentil)- γ -ciclodextrina (Lipodex E).....	21
Figura 10. Gráfico del factor de enantioseparación en función de la concentración de selector quiral A en el solvente S. Para ver lo parámetros utilizados, ver [87].	25
Figura 11. Representación esquemática hipotética de la dependencia de la enantioselectividad con la temperatura considerando la ecuación de Gibbs-Helmholtz.....	26
Figura 12. Principio de la GC de complejación. Izquierda: columna de referencia que contiene solvente puro S. Derecha: columna de complejación que contiene el selector A (aditivo) en el solvente S. K_C es la constante de distribución del analito en la columna de referencia y β es la relación de fases. K es la constante de complejación entre A y el analito y a es la actividad (o concentración c a alta dilución) de A en S (de referencia [95]).	27
Figura 13. Estructura química de los analitos quirales listados en la Tabla 1.....	36
Figura 14. Dibujo del horno cromatográfico modificado para construir columnas capilares y su regulador de velocidad.....	38
Figura 15. Variación de la densidad en función de la temperatura para las fases estacionarias LP0 (sin selector quiral) y LP10 ($m=0,0383$).	43
Figura 16. Estructura "head-to-head channel" formada entre ciclodextrina y el polímero polisiloxano.....	44
Figura 17. Eficiencias logradas en las columnas construidas en comparación con la columna comercial LIPODEX-E...	47
Figura 18. Cromatogramas de la inyección de n-dodecano (C_{12}) en las columnas LIPODEX-E y LP26 a distintas temperaturas. (a) LP26 - 100°C (b) LP26 - 90°C (c) LP26 - 80°C (d) LIPODEX-E - 100°C (e) LIPODEX-E - 90°C (f) LIPODEX-E - 80°C.	47
Figura 19. Gráficos de $\ln K_{(CH_4)}$ en función de $1/T$. Los valores de $K_{(CH_4)}$ fueron calculados a partir del tiempo muerto calculado con las ecuaciones (1.33) (círculos) y (1.36) (triángulos).	48
Figura 20. Dependencia de la selectividad aparente con la concentración de selector quiral disuelto para diversos racematos derivatizados. En todos los casos a 80 °C.....	50

Figura 21. Cromatogramas representativos de la resolución alcanzada utilizando la columna LP26 (a)(b)(c)(d)(e) y la columna comercial LIPODEX E (f)(g)(h)(i)(j). (a)(f) 2-bromopentano-50°C, (b)(g) 3,3,5-trimetilciclohexanona-90°C, (c)(h) 2,5-dimetoxitetrahydrofurano-50°C, (d)(i) 4-metil-2-pentanol-50°C, (e)(j) 1-fenil-1-etanol-100°C.	52
Figura 22. Cromatogramas comparativos de la enantioresolución alcanzada a 70°C utilizando dos métodos de derivatización en la columna LP26. (a) ácido 2-cloropropanoico-ECF, (b) ácido 2-bromopropanoico-ECF, (c) ácido 2-bromobutanoico-ECF, (d) ácido 2-bromoaléxico-ECF y (e) todos los analitos anteriores derivatizados con O-Me.	53
Figura 23. Dependencia de $\ln k_{1,2}$ (a) y enantioselectividad (b) con la temperatura de la columna. Solutos: 3,3,5-trimetilciclohexanona.	54
Figura 24. $K_{p1,2}$ en función de la molalidad. (a) 4-metil-2-pentanol, (b) 1-fenil-1-etanol, (c) ácido 2-aminobutanoico-OMe-TFAA y (d) 3,3,5-trimetilciclohexanona.	57
Figura 25. Comparación de valores de constantes de asociación (K_i) a 70 °C entre cada enantiómero y octakis-(2,6-di-O-pentil-3-O-butiril)- γ -ciclodextrina.	62
Figura 26. Gráfico de enantioselectividades absolutas y aparentes obtenidas con la columna conteniendo 26% de selector y a 70°C (eje izquierdo) y número de platos efectivos requeridos para lograr enantioresoluciones iguales a 1.0 (eje derecho).	64
Figura 27. Gráficas de Van't Hoff para los analitos (a) ClC3ECF, (b) BrC3ECF, (c) BrC3OMe y (d) BrC4OMe.	69
Figura 28. Gráficas de $\Delta(\Delta H^\circ)$ vs. $T\Delta(\Delta S^\circ)$ para las mezclas racémicas en selector quiral Lipodex E.	71
Figura 29. Gráfica de $\Delta(\Delta G^\circ)$ en función de la energía libre de Gibbs para la asociación del primer enantiómero del par (ΔG°_1) estimado a 70 °C. Triángulos blancos: 1-feniletanol, ácidos 3-hidroxi-butírico y 2-aminobutírico.	71
Figura 30. Gráfico de $\Delta(\Delta H^\circ)$ en función de los factores de enantioseparación a 60°C (círculos y línea continua) y a 50°C (triángulos y línea discontinua).	72

Capítulo I - Introducción

1. Drogas quirales

1.1. Razones para producir enantiómeros puros

La fabricación de productos químicos utilizados para la promoción de la salud humana o para combatir las plagas que afectan negativamente la producción de cultivos para suministro alimentario humano es un tema relevante y actual. Una gran proporción de estos productos contiene al menos un centro quiral.

Una de las razones por las cuales es deseable obtener compuestos quirales puros reside en que la actividad biológica normalmente está asociada con uno de los enantiómeros. Cuando uno de los enantiómeros es responsable por la actividad de interés, su par enantiomérico puede estar inactivo, poseer alguna actividad de interés, puede ser un antagonista del enantiómero activo o puede tener una actividad diferente deseable o indeseable.

Otras razones para promover la utilización de drogas estereoquímicamente puras son la reducción en la dosis total administrada, un aumento de la ventana terapéutica, reducción de la variabilidad intersujeto y una estimación real de la relación dosis-respuesta. Todos estos argumentos han aumentado el interés de la industria y las autoridades regulatorias por la producción y comercialización de enantiómeros simples [1-4].

La tragedia de la talidomida ocurrida en el año 1961 en todo el mundo es reconocida, sin duda, como un evento que cambió el paradigma de la regulación de drogas. Esta droga hipnótica sedante tenía efectos neurotóxicos y teratológicos que, como resultado, dieron origen al nacimiento de bebés con malformaciones en sus extremidades. La droga era entonces prescrita a mujeres embarazadas que presentaban náuseas matutinas. La talidomida es un racemato derivado del ácido glutámico. En la Figura 1 se muestra el par enantiomérico de esta molécula, de los cuáles el isómero R es el responsable de los efectos mencionados.

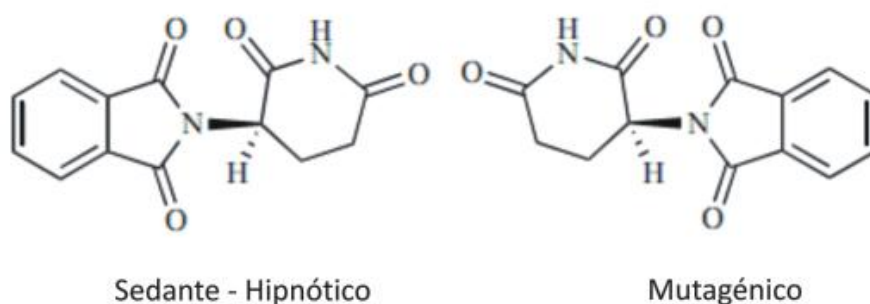


Figura 1. Estereoisómeros S (izquierda) y R (derecha) de la talidomida.

1.2. Legislación y Propiedad Intelectual

El control regulatorio de drogas quirales comenzó en Estados Unidos en el año 1992 con la publicación del documento llamado "Policy Statement for the Development of New Stereoisomeric Drugs" seguido por la Unión Europea en 1994 que publicó el documento "Investigation of Chiral Active Substances" [5, 6]. A partir de ese

momento, quien deseara registrar un fármaco con uno o más centros asimétricos debía separar los enantiómeros, analizar la contribución individual de los mismos a la actividad de interés y realizar una selección racional de la forma estereoisomérica propuesta para comercializar.

Desde entonces, las ventas mundiales de drogas quirales en forma de simple enantiómero continúan creciendo. La porción de mercado de comercialización de enantiómeros puros ha aumentado desde un 27% (US \$74.4 miles de millones) hasta un 39% (US \$151.9 miles de millones) solo en el período 1996 – 2002 [1].

Esta tendencia hacia la producción de enantiómeros (Fig. 2), sin embargo, comienza a notarse desde la década de los 80s donde los enantiómeros simples eran un componente significativo de las nuevas drogas aprobadas, aún antes que las agencias regulatorias impulsaran el desarrollo y la comercialización de drogas enantioméricamente puras. Esta tendencia fue simultánea con el advenimiento de metodologías separativas sencillas que permitieron la determinación precisa de la composición enantiomérica de mezclas.

No obstante las guías de agencias regulatorias, no se afectaron de forma significativa la relación drogas quirales¹/aquirales, pero sí lo hicieron en la categoría de enantiómero simple resultando en un declive progresivo en el desarrollo de racematos en años recientes.

Estos cambios impulsados desde las autoridades regulatorias han ido aumentando el número de inscripciones de enantiómeros simples en las oficinas de patentamiento desde hace más de una década.

En la Figura 3 se observa una clara tendencia hacia el patentamiento de drogas enantioméricamente puras por sobre el racemato. Por ejemplo, considerando 15 drogas aprobadas por la FDA² en el período Enero-Agosto de 2003, el 64% eran enantiómeros simples, 14% racematos y 22% aquirales.

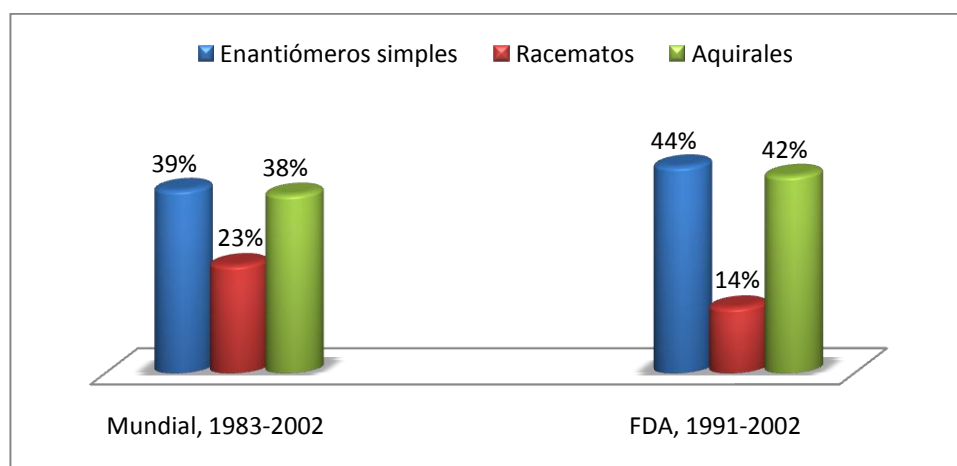


Figura 2. Distribución de las drogas aprobadas teniendo en cuenta su carácter quiral. (a) Aprobadas mundialmente, período 1983-2002 (b) Aprobadas por FDA, período 1991-2002.

El cambio en la legislación y la necesidad de producir y comercializar drogas en su forma de enantiómero simple en lugar del compuesto racémico obligó a las compañías farmacéuticas a rediseñar sus estrategias de patentamiento. Tanta es la importancia de las drogas enantioméricas simples que las tres drogas más vendidas del año 2008 a nivel global, Lipitor (atorvastatin calcio), Plavix (clopidogrel bisulfato) y Nexium (esomeprazol magnesio) por un total de 30 mil millones de dólares, son drogas enantioméricas simples.

Hasta mediados de la década de los años 80 la tendencia de patentamiento de fármacos se basaba en las solicitudes sobre racematos o mezclas de diastereoisómeros, luego denominadas patentes básicas. Hacia finales

¹ Drogas quirales = enantiómeros simples + racematos

² FDA: Food and Drug Administration

de la misma década y con el cambio de paradigma se comenzó a utilizar la figura de patente de enantiómero la cual es una patente que reclama un enantiómero simple de un compuesto quiral que había sido previamente patentado en forma de patente básica. A este proceso se lo denominó “quiral switch”.

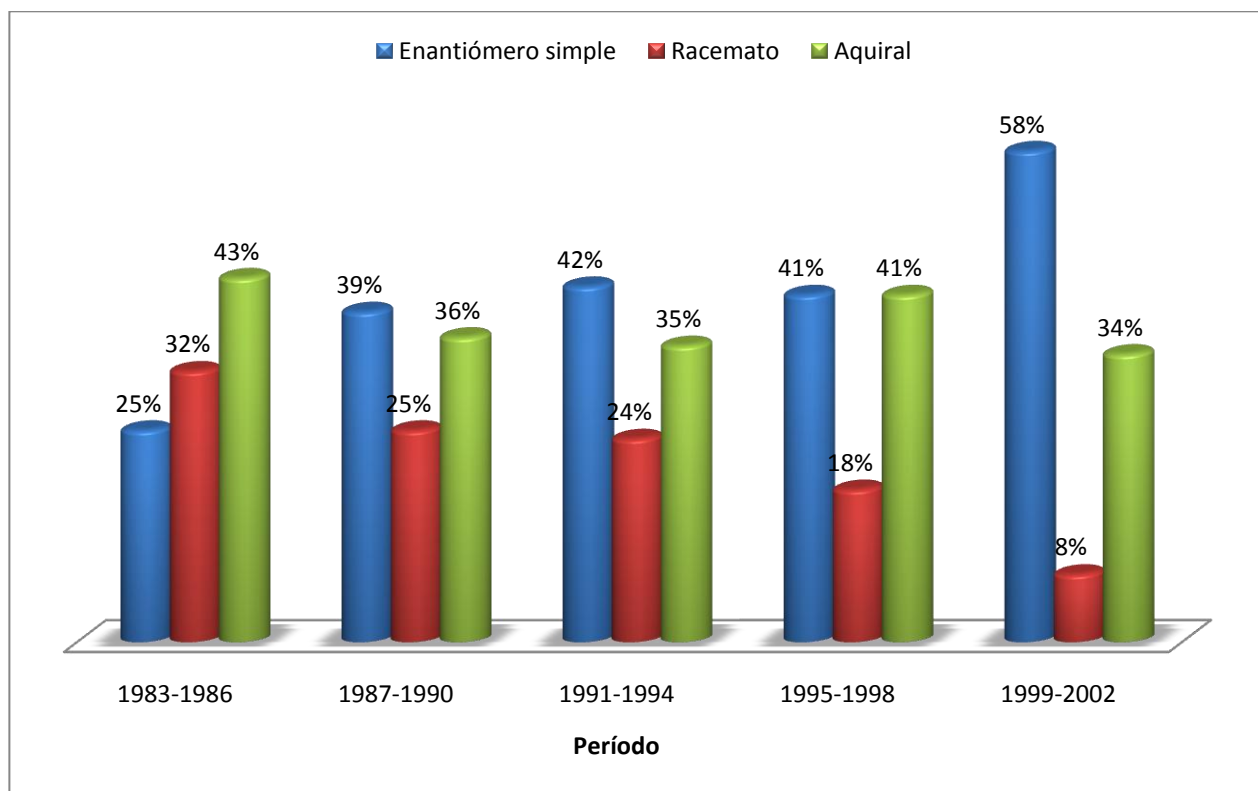


Figura 3. Distribución de las drogas aprobadas mundialmente teniendo en cuenta su carácter quiral en rangos de cuatro años.

Este cambio de estrategia suscitó y suscita aún serios conflictos de intereses entre las compañías que fabrican productos marca y las empresas que producen drogas genéricas quienes alegan generalmente la falta de novedad, obviedad, falta de utilidad e información, selección inválida, doble patentamiento, etc.

La validez de las patentes enantioméricas no es un tema sencillo de evaluar y son revisados caso por caso. Por lo pronto, en la mayoría de las jurisdicciones se acepta que, en el caso de que el racemato haya sido descrito con anterioridad, la novedad de la descripción de los enantiómeros no puede ser invalidada [7, 8].

Las estructuras mostradas en la Figura 4 corresponden a algunas sustancias de uso farmacéutico re-patentadas en los últimos años en sus formas enantioméricas puras.

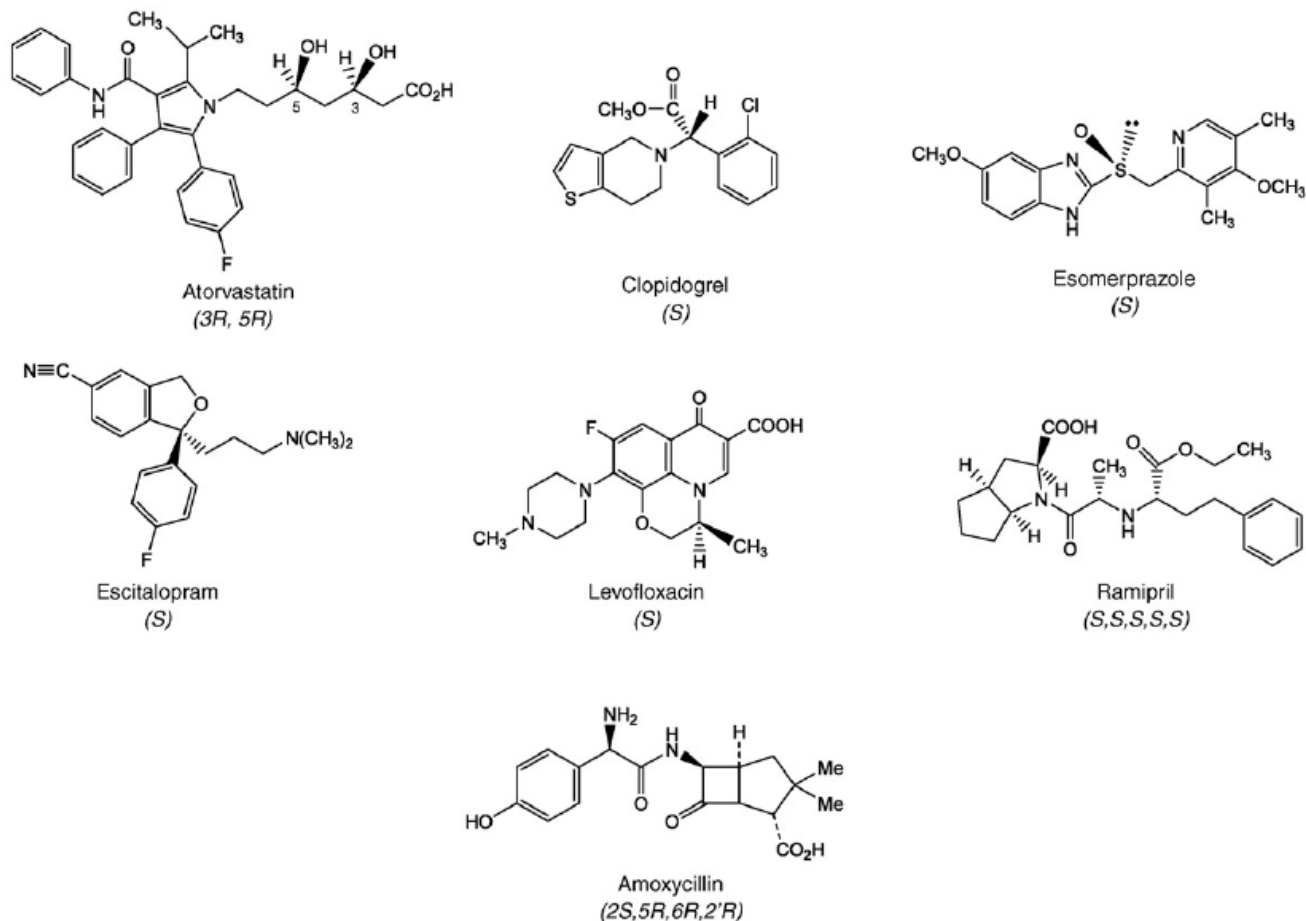


Figura 4. Estructuras químicas de fármacos representativos de sustancias repatentadas como enantiómeros simples. Lipitor es atorvastatin calcio, Plavix es clopidogrel bisulfato, Nexium es esomeprazol magnesio, Lexapro/Cipralext es escitalopram oxalato, Levaquin/Tavanic es levofloxacin y Altace es ramipril.

1.3. Desarrollo de drogas enantioméricamente puras

En la producción de compuestos enantioenriquecidos han evolucionado cuatro aproximaciones económicamente viables.

a.- La separación de enantiómeros vía resolución clásica; por ejemplo, la cristalización de aductos diastereoméricos es responsable aún de más del 50% de las drogas enantioenriquecidas. En las etapas tempranas del desarrollo del producto es posible utilizar cromatografía líquida de alta performance (HPLC) utilizando la tecnología "simulated moving bed" (SMB); que consiste en una serie de columnas adsorbentes conectadas formando un circuito dividido en cuatro zonas por dos puertos de entrada y dos puertos de salida. Los cuatro puertos son desplazados periódicamente en la dirección del flujo del desorbente (solvente/fase móvil) siguiendo dirección de las bandas que están migrando, tal como se muestra en la Figura 5. Si el caudal del sorbente y los puertos están coordinados adecuadamente, la siembra de analitos se realizará siempre en zonas donde las bandas se solapan y los productos serán extraídos siempre en zonas donde las bandas se separan [9, 10]. La metodología permite la separación de dos sustancias (los enantiómeros) reciclando el material (fase estacionaria y solvente). Sin embargo esta metodología requiere de un equipamiento complejo. La cristalización de aductos diastereoméricos, en cambio, puede implementarse en cualquier escala [11-16].

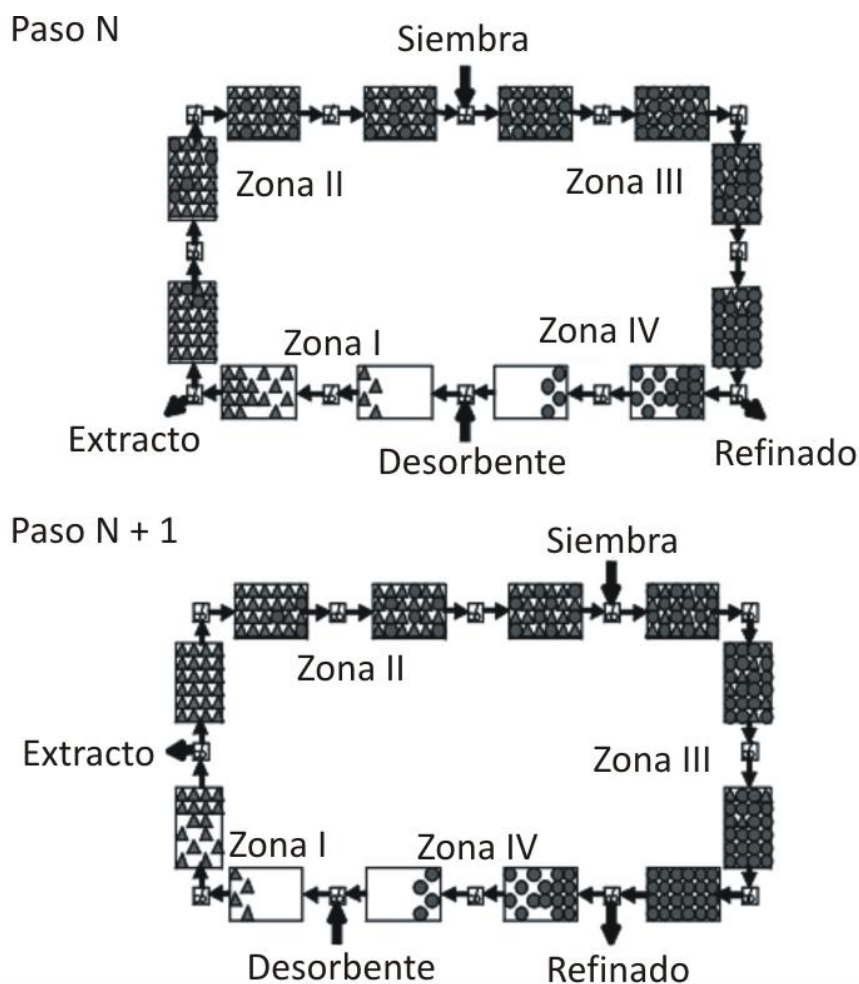


Figura 5. Diagrama del concepto SMB utilizando cuatro zonas en dos etapas consecutivas.

b.- La aproximación “pool” quiral que se basa en el uso de bloques de síntesis con centros asimétricos, que son originados a partir de productos naturales, y se emplean como materia prima para la construcción de la molécula final. Esta aproximación es utilizada frecuentemente en etapas tempranas del desarrollo de un enantiómero pero dependiendo de la disponibilidad comercial del material de partida. Dado que los productos naturales normalmente (aunque no siempre) tienen una pureza enantiomérica elevada, si se evitan reacciones que puedan inducir la racemización, en esta estrategia no es necesario el enriquecimiento posterior [17].

c.- Utilización de transformaciones enzimáticas y microbianas. La biocatálisis tiene propiedades especiales altamente deseables como una selectividad alta, condiciones de reacción no extremas y mínima generación de residuos. Los métodos enzimáticos han sido descritos en la síntesis de intermediarios quirales para agentes antivirales, fármacos ansiolíticos, anticancerígenos, antidiabéticos y medicamentos contra el mal de Alzheimer [18, 19].

d.- Síntesis enantioselectiva con la ayuda de auxiliares quirales que no son incorporados en la molécula diana, y que luego pueden perderse o reciclarse. La variante más atractiva de esta aproximación es la catálisis química enantioselectiva donde el auxiliar quiral es utilizado en cantidades catalíticas. Los procesos catalíticos no enzimáticos más importantes son la hidrogenación asimétrica, la epoxidación en oxidaciones asimétricas y las cicloadiciones [2].

1.4. Cromatografía enantioselectiva

Esta evolución de tres décadas en el desarrollo, producción y patentamiento de enantiómeros puros ha sido acompañada por el desarrollo de metodologías analíticas capaces de analizar enantiómeros puros, en todas las etapas de producción de la formulación final.

Entre estas metodologías, las técnicas enantioseparativas han sido las que más se han empleado. En el mercado farmacéutico, específicamente, la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC, por su sigla en inglés) empleando columnas quirales ha prevalecido sobre la electroforesis capilar y la cromatografía de gases (CG).

La CG enantioselectiva también ha evolucionado en este período, pero asociada a la enantioseparación de sustancias volátiles en industrias tales como de las de producción de fragancias, de feromonas y alimenticias y, más recientemente, cumpliendo un rol importante en el control de residuos ópticamente activos en matrices medioambientales.

La enantioresolución mediante cromatografía de gases empleando columnas capilares de alta resolución (HRC-CG) presenta como ventajas una alta eficiencia, sensibilidad y velocidad de separación. Debido al elevado poder de separación de la HRC-CG, las impurezas y contaminantes son separados de los analitos quirales y el análisis de mezclas de múltiples enantiómeros (por ejemplo, α -amino ácidos proteínogénicos derivatizados) es simple. A la salida de la columna se puede conectar un detector de ionización de llama (FID³), considerado universal, que es lineal sobre un rango de cinco órdenes de magnitud; los límites de detección pueden incrementarse al nivel del picograma utilizando un detector de captura electrónica (ECD⁴)[20]. 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 CG. Sin embargo, su potencial implementación presenta prerequisites ineludibles para los analitos, a saber, volatilidad y estabilidad térmica restringiendo así su utilización [20].

Las ventajas de los métodos cromatográficos por sobre métodos como polarimetría, RMN, etc. incluyen la determinación del exceso enantiomérico sobre un 99% en un amplio rango de linealidad aun en matrices muy complejas, la posibilidad de determinar el exceso enantiomérico⁵ de varios compuestos en un único análisis cromatográfico, la facilidad para asociarse con técnicas de identificación como espectrometría de masas y la posibilidad de realizar análisis rápidos y totalmente automatizados.

Es debido a estas ventajas que la cromatografía en todas sus variantes es una técnica dominante en el análisis farmacéutico utilizado en la investigación, el desarrollo y el control de calidad cumpliendo funciones importantes en las siguientes etapas:

- Descubrimiento de potenciales fármacos: etapa en la cual se buscan nuevas entidades químicas para la adopción de nuevos candidatos para su posterior desarrollo.
- Desarrollo químico: en esta etapa se desarrollan rutas sintéticas viables y procesos de escalamiento para la síntesis de ingredientes farmacéuticos activos.
- Desarrollo farmacéutico: en esta etapa se desarrollan formas de dosaje optimizando la distribución del fármaco y los perfiles de estabilidad para suplementos clínicos y productos finales.
- Metabolismo/farmacocinética de fármacos: en esta etapa se evalúan los perfiles metabólicos y farmacocinéticos de las drogas candidatas en modelos animales y estudios clínicos humanos.

³ FID: Flame Ionization Detector

⁴ ECD: Electron Capture Detector

⁵ El exceso enantiomérico se define como $ee, \% = ((R - S)/(R + S)) \times 100$

- Control de calidad: se ensaya la calidad del producto final manufacturado según las especificaciones publicadas [21].

La separación cromatográfica de enantiómeros puede lograrse de dos maneras. La primera, directa, a través de asociaciones diastereoméricas transientes mediante el agregado de aditivos quirales a la fase móvil o utilizando fases estacionarias quirales y la segunda, indirecta, mediante una etapa de síntesis previa de pares diastereoméricos estables utilizando agentes derivatizantes quirales. Cada una de estas estrategias tiene ventajas y desventajas.

1.4.1. Separación indirecta

La separación indirecta se basa en la formación de diastereoisómeros por reacción con un reactivo ópticamente puro, los que difieren en su comportamiento químico y físico por lo que pueden separarse luego empleando columnas aquirales. Esta aproximación es más flexible y evita la necesidad de utilizar columnas costosas con fases estacionarias quirales; sin embargo, la derivatización representa un paso adicional que puede involucrar reacciones secundarias no deseadas, la formación de productos de descomposición y/o racemización. Además, el reactivo derivatizante quiral tiene que tener una pureza enantiomérica elevada y el analito debe presentar grupos funcionales derivatizables. En el caso de cromatografía gaseosa, la separación indirecta se realiza generalmente empleando los siguientes reactivos derivatizantes quirales: cloruro de S(-)-heptafluorobutiril propilo, (-)-cloroformiato de metilo, cloruro de (S)- α -metoxi- α -trifluorometilfenil acetilo, cloruro de S(-)-trifluoroacetil propilo y R(-)-2,2,2-trifluoro-1-(9-antrilo) etanol. Otros agentes derivatizantes propuestos más recientes son la isopinocanfenilamina y anhídridos derivados del ácido tartárico.

1.4.2. Separación directa

La aproximación directa que utiliza columnas con fases estacionarias quirales es más conveniente y aplicable para la separación en escala preparativa, pero requiere contar con una colección de columnas, en general muy costosas, para resolver la variedad de problemas que pueden presentarse en un laboratorio. Por otra parte, el enfoque basado en la utilización de aditivos en la fase móvil en el caso de cromatografía de líquidos representa una alternativa simple y flexible aunque no siempre es aplicable. Dado que la fase móvil que contiene el selector quiral no puede reutilizarse es que esta técnica no puede ser aplicada utilizando reactivos costosos.

En CG, la separación directa se efectúa fundamentalmente mediante la utilización de fases estacionarias quirales basadas en los siguientes selectores:

- **Amino ácidos y diamidas**

El grupo de Gil-Av, pionero en el estudio de separaciones quirales, desarrolló la primera fase quiral para CG basada en un derivado de amino ácido, el éster de N-trifluoroacetil-L-isoleucin laurilo [22] y el cicloéster de N-trifluoroacetil-L-valil-valina [23] logrando resolver N-trifluoroacetil aminoácidos. Cuando se emplean estas fases, el reconocimiento quiral se basa en la formación de múltiples puentes de hidrógeno diferenciados con cada uno de los enantiómeros del par. A partir de estas primeras fases derivadas de aminoácidos se desarrolló, la fase estacionaria comercialmente denominada Chirasil-Val, basada en valin diamida unida a polisiloxanos. La misma presenta un amplio espectro de aplicación para la enantioseparación de amino ácidos y otros compuestos racémicos polares luego de su transformación en derivados volátiles [24-26].

- **Complejos metálicos**

Schurig introdujo el principio de cromatografía gaseosa de complejación utilizando dicarboxilato de rodio(I)-3-trifluoroacetyl-(1R)-camphorate disuelto en escualano como fase estacionaria para resolver 3-metilciclopenteno [27]. Luego fueron investigados una serie de quelatos de manganeso(II), cobalto(II) y níquel(II) con 1,3-dicetonato derivados de terpenen-cetonas perfluoroaciladas [28]. Para incrementar la termoestabilidad, se desarrolló una fase estacionaria con el selector metálico inmovilizada en polisiloxano (Chirasil-Níquel) [29]. Las aplicaciones de GC quiral basadas en complejación incluyen la separación enantiomérica de numerosas feromonas, fragancias y oxiranos.

Ciclodextrinas

Se investigaron diferentes aproximaciones para la preparación de fases estacionarias quirales basadas en ciclodextrinas. Schurig y Novotny utilizaron β -ciclodextrina permetilada disuelta en un polisiloxano moderadamente polar. Luego este selector fue unido químicamente a un esqueleto de polisiloxano creando la fase conocida comercialmente como Chirasil-Dex [29, 30]. König y colaboradores sintetizaron éteres derivados de ciclodextrinas con cadenas alifáticas más extensas, las cuales son líquidas a temperatura ambiente, a las que denominaron con el nombre de fantasía LIPODEX. Las fases de este tipo muestran enantioselectividad por un amplio rango de compuestos. En el capítulo siguiente se describen en detalle todos los derivados de ciclodextrinas que se han descrito.

La capacidad de reconocimiento quiral que poseen estas fases se basa en muchos casos en la inclusión de la molécula en la cavidad quiral aunque se asume también como posibles las interacciones por puente de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, e interacciones electrostáticas en el exterior de la molécula de ciclodextrina, la que posee un elevado número de centros quirales e interacciones hidrofóbicas en el caso de soluciones acuosas.

Ciclocolatos

Se han preparado fases estacionarias basadas en derivados del ácido cólico ligados a sílice modificada con hidruros y evaluado su performance en HPLC, siendo exitosa la separación quiral de derivados de 2,2'-dihidroxi-1,1'-binaftilos e hidantoínas [31]. A partir de este antecedente, Buaille y colaboradores prepararon dos ciclocolatos quirales y estudiaron su capacidad para el reconocimiento quiral en mezclas con polisiloxanos en GC capilar [32]. En la Figura 6 se muestra la estructura del ciclocolato sintetizado y utilizado como selector quiral en el mencionado trabajo. Estas columnas resultaron útiles para separar aminoácidos derivatizados y determinados alcoholes.

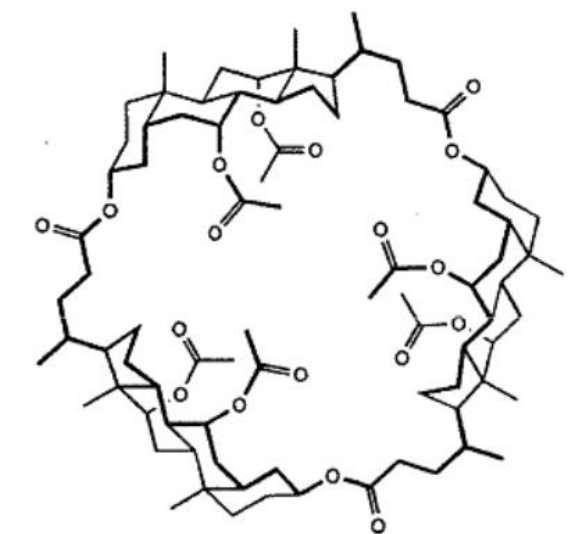


Figura 6. Estructura del ciclocolato utilizado como selector quiral.

- **Calixarenos**

Los calixarenos representan una nueva clase de selectores quirales aplicados a la cromatografía enantioselectiva. La estructura general de un calix[4]areno se representa en la Figura 7.a. Recientemente, Pfeiffer y Schurig sintetizaron un calixareno quiral mediante la unión entre L-valin tert butilamida y ocho grupos hidroxilo de un resorcareno. Este selector fue unido a un dimetilpolisiloxano; esta fase estacionaria se conoce comercialmente como Chirasil-Calix [33] y su estructura se representa en la Figura 7.b. Se ha sugerido que el reconocimiento quiral cuando se usan estos selectores podría estar basado parcialmente en la inclusión en una cavidad en forma de canasta y enlaces de hidrógeno. Estas fases se aplican para separar derivados de amino ácidos, alcoholes y aminas [3].

- **Líquidos iónicos**

Los líquidos iónicos (LIs) son sales o mezclas de sales cuyos puntos de fusión se encuentran por debajo de los 100°C. Los líquidos iónicos a temperatura ambiente (RTILs⁶) son LIs cuyos puntos de fusión se encuentran a temperatura ambiente o debajo de ella. La parte catiónica de la mayoría de los LIs son iones orgánicos tales como los iones imidazolio, N-alkilpiridinio, tetraalkilamonio y el tetraalkilfosfonio. La parte aniónica puede ser orgánica o inorgánica e incluye especies químicas como haluros, nitratos, acetatos, hexafluorofosfatos, tetrafluoroborato, trifluorometilsulfonato y bis(trifluorometanosulfonil)imida. Los LIs más comunes se listan en la Fig. 8. Las propiedades que tienen los LIs como solventes [34] han sido aprovechadas para preparar columnas capilares en CG recubiertas con fases estacionarias que contenían ciclodextrinas disueltas. Se utilizó el cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio ([BMIM][Cl]) como solvente de ciclodextrinas di- o per-metiladas [35]. Sin embargo, con este líquido iónico se ha demostrado que la cavidad quiral de las CDs era ocupada por el anillo imidazolio del LI, bloqueándolo y no permitiendo la inclusión-complejación con el soluto. La superficie externa de la CD fue capaz de entregar una enantioselectividad escasa sobre los pares enantioméricos ensayados [35]. Más recientemente se han desarrollado también LIs quirales para preparar columnas capilares en CG. El LI basado en un catión efedrinio fue capaz de resolver enantiómeros de una variedad de alcoholes, dioles, sulfóxidos, epóxidos y aminas acetiladas [36].

⁶ RTILs: room-temperature ionic liquids

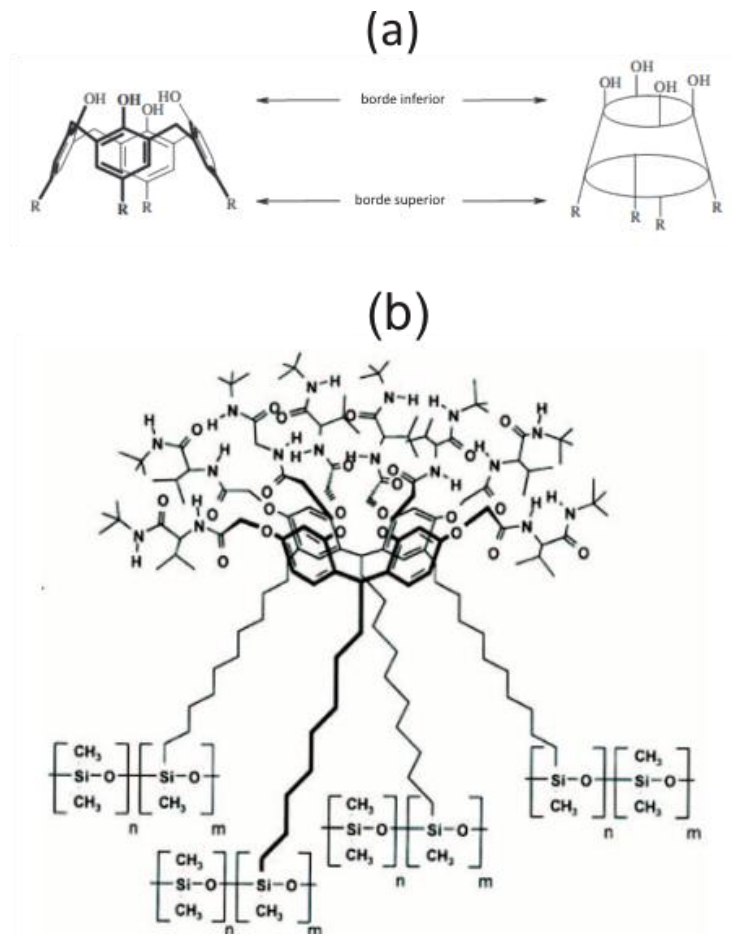


Figura 7. (a) Representación de la estructura de un calix[4]areno y la designación de sus caras. (b) Fase estacionaria Chiralisil-Calix utilizada en CG.

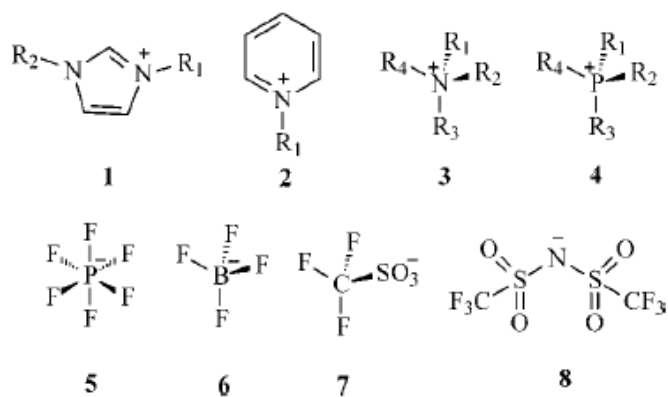


Figura 8. Aniones y cationes de líquidos iónicos a temperatura ambiente más comunes. Cationes: 1, Ion imidazolio; 2, ion N-alkilpiridinio; 3, ion tetraalquilamonio; 4, ion tetraalquifosfonio. R1, R2, R3 y R4 son grupos alquilo y pueden similares o diferentes. Aniones: 5, hexafluorofosfato; 6, tetrafluoroborato; 7, trifluorometilsulfonato; 8, bis(trifluorometanosulfonyl)imida.

2. Ciclodextrinas en cromatografía

Los hidratos de carbono nativos y derivatizados tienen un rol importante en las separaciones analíticas y representan las fases estacionarias quirales (FEQs⁷) más importantes para las separaciones de enantiómeros mediante cromatografía y métodos basados en electromigración.

Los selectores quirales basados en polisacáridos derivados de carbamatos y carboxilatos de amilosa y celulosa son los más versátiles en HPLC enantioselectiva [37, 38]. Una revisión en la literatura estableció que entre el 80 y 90% de todos los racematos investigados pueden ser resueltos por, al menos, un derivado de amilosa/celulosa [39]. Respecto de las ciclodextrinas nativas y derivatizadas (CDs), se las emplean con frecuencia como aditivos quirales adicionados a la de fase móvil (CMPAs⁸) [40, 41] y como pseudo-fases estacionarias en varios métodos electroforéticos enantioselectivos [41, 42]. En CG enantioselectiva, las CDs derivatizadas han demostrado ser la base de fases estacionarias más versátiles en comparación con selectores quirales basados en α -amino ácidos [43-45].

2.1. Desarrollo histórico

En el dominio aquiral, las ciclodextrinas aciladas fueron utilizadas, a temperaturas por encima de su punto de fusión, para la separación de compuestos polares en el modo de cromatografía gas-líquido (CGL) [46, 47]. En relación a esta aplicación, en una aproximación pionera se utilizaron ciclodextrinas permetiladas en CGL [48] y ciclodextrinas nativas en cromatografía gas-sólido (CGS) [49], en ambos casos, diluidas en polisiloxanos.

En el dominio quiral, la primera enantioseparación fue descrita por Koscielsky, Sybilska y Jurczak quienes, utilizando un hidrato de α -ciclodextrina disuelta en formamida y recubriendo celita con esta solución, lograron resolver α - y β -pineno, *cis*- y *trans*-pinano y careno [50-52]. Desafortunadamente, utilizando columnas rellenas, la eficiencia lograda resulto baja, la temperatura fue limitada a 70°C debido a la presión de vapor propia de la formamida usada como solvente y el tiempo de vida del sistema cromatográfico fue corto debido al sangrado de la columna y la deshidratación de la CD. Posteriormente se identificó a la presencia de agua como el componente esencial de la configuración del sistema para el mantenimiento de una enantioselectividad alta [53]. Sin embargo, a pesar de las dificultades encontradas, este trabajo fue el punto de partida del gran desarrollo que se produjo posteriormente de la CG quiral empleando como FEQs ciclodextrinas derivatizadas selectivamente.

2.2. Ciclodextrinas derivatizadas

El elevado potencial que tienen CDs para las separaciones enantioselectivas se debe a la presencia de bloques de D-glucosa que juntos forman cavidades de diferentes dimensiones moleculares y, además, a las diferencias de reactividad de los grupos 2-, 3- y 6-hidroxilo de la glucosa los que pueden ser derivatizados mediante alquilación o acilación regioselectiva [54]. En 1987 se introdujeron las primeras CDs derivatizadas en CG capilar enantioselectiva y a partir de entonces comenzaron a tener un rol destacado en las separaciones quirales [54]. Con el objeto de recubrir columnas capilares (originalmente construidas de vidrio, y sustituidas luego por sílice fundida) la fase estacionaria debe ser fluida, pero de una viscosidad alta para lograr el mojado uniforme del interior del capilar. Los derivados alquilados de bajo peso molecular, como las permetil ciclodextrinas α , β y γ , son sólidos y su fusión ocurre a temperaturas cercanas a la de descomposición del sólido. No ocurre lo mismo

⁷ FEQs: Fases Estacionarias Quirales

⁸ CMPAs: Chiral Mobile Phase Additives

con otros derivados acilados de cadenas más largas ni con otros derivados. Frente a esta dificultad, se desarrollaron dos aproximaciones: (1) Schurig y Novotny disolvieron ciclodextrinas per-alquiladas (principalmente permetilciclodextrinas) en un polisiloxano moderadamente polar como por ejemplo OV1701 combinando entonces la enantioselectividad inherente a las CDs derivatizadas con las propiedades únicas de viscosidad y, en consecuencia, de capacidad de formar películas uniformes de fase estacionaria líquida, que tienen los polisiloxanos [55, 56] y (2) König y colaboradores utilizaron derivados de CDs de bajo punto de fusión conteniendo grupos *n*-pentilo (por ejemplo, per-*O*-pentiladas y 3-*O*-acil-2-6-di-*O*-pentil α -, β - y γ -CD) como fase estacionaria líquida no diluida recubriendo columnas capilares de vidrio Pyrex [44, 57]. Esta aproximación fue extendida luego por el grupo de Armstrong a permetil 2-hidroxiopropil CDs y *n*-pentil/acil CDs [58, 59]. A partir de esos desarrollos se produjo una actividad explosiva en este campo con el desarrollo de múltiples CDs sustituidas; esto ha sido extensivamente analizado en las referencias siguientes [43, 44, 54, 60, 61]. La estrategia de Schurig y Nowotny de diluir ciclodextrinas derivatizadas en polisiloxanos semipolares emergió como el método más utilizado empleando β -CD permetilada y heptakis(2,3-*O*-metil-3-*O*-trifluoroacetil)- β -ciclodextrina. [55, 56]. A pesar del gran número de enantioseparaciones descritas por König, utilizando ciclodextrinas sin diluir [44], este grupo posteriormente extendió sus investigaciones hacia sistemas diluidos empleando columnas capilares de sílice fundida [45]. El uso de α -, β - y γ -CDs diluidas en polisiloxanos posee las siguientes ventajas [62]:

- Se combina la selectividad propia de los polisiloxanos la cual es combinada con la capacidad enantioselectiva inherente de las CDs
- Los polisiloxanos tienen excelentes propiedades para lograr un recubrimiento homogéneo, es decir, para producir columnas capilares de alta resolución, eficiencia y termoestabilidad (hasta temperaturas de 250°C) en CG
- Los elevados puntos de fusión o de transición de fases observados en estudios térmicos realizados con numerosas ciclodextrinas no son perjudiciales para la performance de la columna
- Pueden emplearse fases estacionarias mixtas basadas en más de una ciclodextrina con el fin de modular la selectividad

En un amplio estudio involucrando más de 150 racematos, se demostró las ventajas de β -CD permetilada como FEQ en GC enantioselectiva [63]. En un estudio en que se comparó α -, β - y γ -CD permetiladas se observó que racematos nunca antes resueltos con β -CD fueron separados por α - y γ -CD y en algunos casos especiales se observó una inversión en el orden de elución de los enantiómeros [64]. König compiló una colección de factores de enantioseparación de racematos obtenidos empleando las columnas octakis(6-*O*-metil-2,3-di-*O*-pentil)- γ -CD (Lipodex G), heptakis(2,6-di-*O*-metil-3-*O*-pentil)- β -CD, octakis(2,6-di-*O*-metil-3-*O*-pentil)- γ -CD y octakis(3-*O*-butanoil-2,6-di-*O*-pentil)- γ -CD (Lipodex E) [65-67]. A pesar de tener una gran cavidad, Lipodex E representa uno de los selectores quirales más universales en GC enantioselectiva [68] razón por la cual ha sido seleccionado para este trabajo.

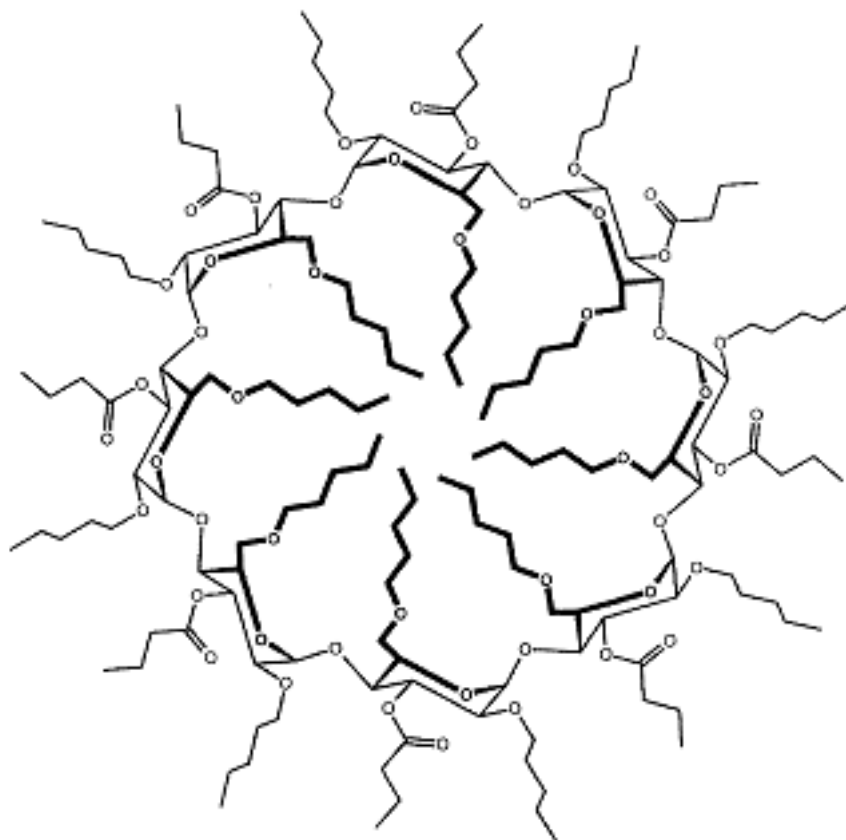


Figura 9. Estructura de octakis(3-O-butanoil-2,6-di-O-pentil)- γ -ciclodextrina (Lipodex E).

Diferentes tipos de columnas capilares recubiertas con CDs derivatizadas están disponibles comercialmente bajo el nombre de Lipodex (distribuidas por Macherey Nagel, Düren, Alemania), obtenidas de acuerdo al procedimiento descrito por König y sus colaboradores. Las columnas capilares con CDs diluidas del tipo Schurig-Nowotny son distribuidas por Chrompack (ahora Varian, Inc., Middelburg, Holanda) y ChiralDEX es una marca registrada para α -, β - y γ -CDs permetil-2-hidroxiopropiladas y trifluoroacetil-dipentiladas, desarrolladas por Armstrong y sus colaboradores y producidas por Astec, Advanced Separation Techniques (Whippany, NJ, USA).

El residuo voluminoso *tert*-butildimetilsililo (TBDMS⁹) representa un grupo protector importante en la química de las CDs. La *per*-TBDMS- β -CD disuelta en el polisiloxano PS-086 ha demostrado ser una FEQ muy versátil en la resolución de numerosas familias químicas por CG quiral [69]. Mosandl y sus colaboradores prepararon dos derivados de CD sustituidos solo en la posición 6 por grupos TBDMS, heptakis(2,3-di-O-acetil-6-O-*tert*-butildimetilsilil)- β -CD y heptakis(2,3-di-O-metil-6-O-*tert*butildimetilsilil)- β -CD, las cuales emergieron como nuevas FEQs importantes en el presente campo [70]. La presencia de este sustituyente de gran volumen sobre la función 6-hidroxilo influencia la conformación de las CDs y bloquea la entrada a la cavidad desde el borde pequeño lo cual ha tenido impacto en la enantioselectividad. Comparadas con las β -CDs permetiladas, los derivados TBDMS de β -CD presentan una mejor solubilidad en polisiloxanos semipolares. La empresa BGB Analytik KG, Adliswil (Suiza) comercializa columnas capilares para CG quiral recubiertas con CDs sustituidas con grupos TBDMS. Otros fabricantes de columnas capilares quirales se detallan en [60].

La disolución de CDs derivatizadas en polisiloxanos semipolares (ejemplo, OV1701) representa la aproximación más útil en GC quiral. En sistemas diluidos el factor de enantioseparación, α , es dependiendo de la concentración de selector quiral debido a dos mecanismos diferentes de retención que se originan por la

⁹ TBDMS: *tert*-butyldimethylsilyl

presencia del solvente aquiral y la CD como selector quirral [71, 72]. Un tratamiento teórico ha mostrado que α no aumenta de forma lineal con la concentración de ciclodextrina en el solvente sino que alcanza una concentración óptima, usualmente baja, más allá de la cual la enantioselectividad es prácticamente constante [73]. Al no mejorar la enantioselectividad por sobre el valor óptimo, los estudios del uso de CD sin diluir se encuentra en un declive progresivo.[20, 45].

La estrategia de disolver CDs derivatizadas en polisiloxanos semipolares derivó en una extensión procedimental que consistió en la fijación de la CD a un esqueleto de poli(dimetilsiloxano) mediante un enlace químico permanente produciendo las fases estacionarias conocidas como Chirasil-Dex (un polisiloxano quirral conteniendo ciclodextrina) siguiendo la nomenclatura de la FEQ Chirasil-Val [24]. La síntesis de Chirasil- β -Dex ha sido realizada independientemente por dos grupos [29, 30, 74]. La inmovilización por reacción química de Chirasil- β -Dex sobre la superficie de sílice fundida ofrece una aplicabilidad universal de esta FEQ en diferentes modos cromatográficos y de electromigración como por ejemplo la cromatografía líquida capilar en tubo abierto (OTLC), cromatografía de fluido supercrítico (SFC) y electrocromatografía capilar (CEC) [75].

3. Parámetros termodinámicos

3.1. Expresiones de $K(T)$

Las aproximaciones actualmente utilizadas para obtener expresiones de constantes de partición con la temperatura en la literatura cromatográfica pueden clasificarse en (a) empíricas y (b) basadas en la termodinámica convencional. En el primer grupo están incluidas aquellas aproximaciones que no tienen como objetivo conocer el significado termodinámico explícito que los parámetros de un modelo matemático tienen que tener. Este grupo de ecuaciones se desarrollan con fines prácticos como por ejemplo realizar predicciones de la performance de simulaciones numéricas de retención utilizando CG con temperatura programada [76]. Una de estas expresiones es la siguiente:

$$\ln K(T) = A + \frac{B}{T} + CT \quad (1.1)$$

donde $K(T)$ es la constante de equilibrio de partición entre fases y los parámetros A , B y C del modelo son independientes de la temperatura y dependen del sistema soluto y solvente [77].

Por otro lado, aquellos modelos clasificados en el grupo b se caracterizan por explicitar la interpretación física de todos los parámetros del modelo matemático. El tratamiento más general de la dependencia de la constante de partición de un soluto entre una fase vapor y una fase líquida con la temperatura, $K(T)$, es el desarrollado por Castells y colaboradores quienes adaptaron el procedimiento propuesto por Clarke y Glew [78] para estimar los parámetros termodinámicos del equilibrio de disociación del cianuro de hidrógeno en agua. Esta aproximación considera que la constante de equilibrio es una función continua de la temperatura y, en consecuencia, las variaciones en energía libre de Gibbs, en entalpía y capacidad calorífica a presión constante para la transferencia de fases, ΔG^0 , ΔH^0 y ΔC_p^0 , respectivamente, son también funciones de la temperatura. Si se toma una temperatura de referencia, los cambios en las funciones termodinámicas y sus derivadas respecto de T pueden expresarse como perturbaciones de los valores a la temperatura de referencia usando una serie de Taylor para cada expresión. [79]. Con objeto de simplificar el concepto, en la siguiente expresión se escriben solo los cuatro primeros términos de la forma resultante de $K(T)$:

$$\ln K(T) = A + \frac{B}{T} + C \ln T + DT \quad (1.2)$$

El significado físico de los parámetros depende del número de términos que son utilizados. Si se utilizan solo dos primeros términos de la sumatoria, se obtiene la clásica expresión de van't Hoff:

$$A = \frac{\Delta S^0}{R} \quad (1.3)$$

$$B = \frac{\Delta H^0}{R} \quad (1.4)$$

donde ΔS^0 y ΔH^0 representan el cambio en la entropía y en la entalpía de transferencia del soluto entre las fases vapor y estacionaria, respectivamente. Teniendo en cuenta estas ecuaciones, se asume que estas funciones son constantes con la temperatura, lo que equivale a decir que el cambio en la capacidad calorífica isobárica de la transferencia del soluto es cero ($\Delta C_p^0 = 0$).

Cuando se toman tres términos de la ecuación (1.2), el significado físico de los parámetros es:

$$A = \frac{\Delta S_{Tr}^{\circ}}{R} - \frac{\Delta C_p^{\circ}}{R} (1 + \ln T) \quad (1.5)$$

$$B = -\frac{\Delta H_{Tr}^{\circ}}{R} - \frac{\Delta C_p^{\circ}}{R} T \quad (1.6)$$

$$C = \frac{\Delta C_p^{\circ}}{R} \quad (1.7)$$

Como se establece en la ecuación (1.7), este modelo asume que ΔC_p° es constante con T , y las cantidades ΔH_{Tr}° y ΔS_{Tr}° corresponden a los cambios en entalpía y en entropía para la transferencia entre fases a la temperatura de referencia T_r .

En la literatura cromatográfica, frecuentemente se encuentran trabajos en donde implícitamente se impone la condición de $\Delta C_p^{\circ} = 0$, negando la posible dependencia que tienen ΔH° y ΔS° con la temperatura. También, aunque en menor número, es posible encontrar trabajos en donde se asume un ΔC_p° constante [80-85]. Sin embargo, es altamente probable que ninguna de estas cantidades sea constante en un rango de temperaturas más amplio y que, generalmente los errores asociados a la medida experimental de la constante de partición impidan observar no linealidades en las regresiones de estos valores con la inversa de la temperatura.

3.2. Selectividad aparente vs. Selectividad verdadera

La separación de los enantiómeros de un par racémico mediante GC empleando una FEQ está gobernada por la termodinámica asociada a las interacciones posibles entre cada enantiómero del par y el medio quiral al que se los expone. Esto es, la magnitud en las diferencias en estabilidad entre las asociaciones diastereoméricas transientes AD y AL formadas entre el selector quiral A presente en la fase estacionaria y los enantiómeros selectandos D y L, respectivamente, darán lugar a una mayor o menor magnitud en la enantioseparación [86]. Las constantes de asociación K_D y K_L cuantifican el equilibrio de la formación de diastereómeros energéticamente diferentes:

$$A + L = AL \quad (1.8)$$

$$A + D = AD \quad (1.9)$$

$$K_L = \frac{a_{AL}}{(a_A a_L)} \quad (1.10)$$

$$K_D = \frac{a_{AD}}{(a_A a_D)} \quad (1.11)$$

donde a_L , a_D representan la actividad de cada uno de los enantiómeros en la fase líquida constituida por el selector disuelto en una matriz aquiral S, a_A es la actividad del selector en la fase estacionaria y a_{Ai} representa la actividad para cada uno de los complejos transientes formados. La relación entre estas constantes de asociación está definida como el verdadero factor de enantioseparación, α o factor de enantioselectividad:

$$\alpha = \frac{K_D}{K_L} \quad (1.12)$$

Por lo tanto, α cuantifica la verdadera enantioselectividad absoluta impartida por el selector quiral A sobre los enantiómeros selectandos D y L donde, arbitrariamente, se adjudicó mayor constante de asociación al complejo formado entre selector A y el enantiómero D. Por otra parte, el factor de enantioseparación aparente, α_{ap} ,

representa la relación de los factores de retención de los dos enantiómeros, k_D y k_L , y es frecuentemente utilizado como una medida práctica, y ampliamente difundida, de la enantioselectividad:

$$\alpha_{ap} = k_D/k_L \quad (1.13)$$

La diferencia entre estas dos cantidades, α y α_{ap} , se debe a que los factores de retención k_i de los enantiómeros D y L son una magnitud que incluyen, no solo la retención cromatográfica debida al proceso de enantioconocimiento sino también contribuciones no enantioméricas a la retención originadas por la presencia del solvente aquiral S. Esto es,

$$k_i = \frac{n_i^s + n_{Ai}^s}{n_i^m} = \left(\frac{1}{\beta}\right)(K^\circ + K_i a_A) \quad (1.14)$$

donde k_i representa el factor de retención del enantiómero i , n_i^s y n_{Ai}^s son el número de moles de i y del complejo entre selector quiral y enantiómero i , Ai , en la fase estacionaria (s), respectivamente, y n_i^m es el número de moles de i en fase vapor. En la ecuación (1.14), β , representa la relación de fases y K° es la constante de equilibrio para la partición de i entre fase vapor y el solvente aquiral S, valor que es idéntico para ambos enantiómeros del par racémico. Finalmente, K_i y a_A fueron definidas en relación con los equilibrios (1.8) y (1.9). Reemplazando (1.14) en (1.13), se obtiene:

$$\alpha_{ap} = \frac{K^\circ + K_D a_A}{K^\circ + K_L a_A} \quad (1.15)$$

Desde un punto de vista termodinámico, es ineludible la distinción entre α_{ap} y α si se pretende describir correctamente al proceso de enantioconocimiento. En presencia de contribuciones aquirales a la retención, α_{ap} siempre será menor que α y la capacidad de enantioselectividad verdadera $-\Delta_{D,L}(\Delta G)$ del selector quiral A hacia este par de enantiómeros será subestimada.

Solo el valor de α , y por lo tanto el $-\Delta_{D,L}(\Delta G)$, es independiente de la concentración A en S. En la Fig. 10, se representó el α_{ap} en función de la concentración de selector quiral en fase líquida para dos hipotéticas situaciones: una de ellas representa un proceso donde K° es significativamente menor en relación con la magnitud de las constantes de asociación K_D y K_L (curva superior). La curva inferior describe una situación en la que las constantes para los equilibrios en enantioconocimiento y la partición de soluto en el solvente aquiral S son del mismo orden de magnitud. En esta última situación, la enantioselectividad es fuertemente dependiente de la concentración debido a un mecanismo de retención mixto que no es compatible con una cantidad termodinámica verdadera [73, 87].

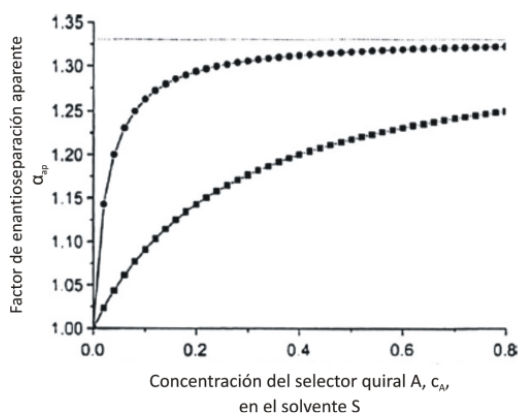


Figura 10. Gráfico del factor de enantioseparación en función de la concentración de selector quiral A en el solvente S. Para ver los parámetros utilizados, ver [87].

Mediante el conocimiento del factor de enantioseparación α , es posible calcular la verdadera diferencia de energía de Gibbs, $-\Delta_{D,L}(\Delta G)$ entre los diastereómeros AD y AL a partir de la ecuación de Gibbs-Helmholtz [20]:

$$-\Delta_{D,L}(\Delta G) = -\Delta_{D,L}(\Delta H) + T\Delta_{D,L}(\Delta S) = RT \ln(\alpha) \quad (1.16)$$

donde R es la constante universal de los gases y T es la temperatura absoluta y $\Delta_{D,L}(\Delta H)$ y $\Delta_{D,L}(\Delta S)$ son, respectivamente, las diferencias de entalpía y de entropía para la formación de los complejos transientes AD y AL. Utilizando la relación de Van't Hoff:

$$\ln(\alpha) = \frac{\Delta_{D,L}(\Delta S)}{R} - \frac{\Delta_{D,L}(\Delta H)}{R} \frac{1}{T} \quad (1.17)$$

el verdadero factor de enantioseparación α está relacionado con las diferencias de entalpía y entropía $\Delta_{D,L}(\Delta H)$ y $\Delta_{D,L}(\Delta S)$ entre las asociaciones diastereoméricas selector-selectando las cuales pueden calcularse a partir de la gráfica del $\ln(\alpha)$ en función de $1/T$.

La Figura 11 representa valores de $\ln \alpha$ en función de la inversa de T para una situación hipotética en la que $\Delta_{D,L}(\Delta H)$ es independiente de la temperatura ocurre una inversión en el orden de elución de los enantiómeros D y L de una columna cromatográfica conteniendo el selector A a partir de una temperatura intermedia (aproximadamente 110 °C en este ejemplo). A esta temperatura intermedia, en la que no existe enantioseparación, se la designa temperatura de isoelución, T_{iso} . A temperaturas inferiores a T_{iso} , las interacciones entre D y el selector A dan lugar a una constante de asociación mayor que las correspondientes al enantiómero L y el selector quiral. La inversión en el orden de elución permite inferir que podría existir, desde un punto de vista teórico, un cambio en la magnitud entre ambas constantes de asociación y, en consecuencia, un posible cambio en el mecanismo de enantiodiscriminación,

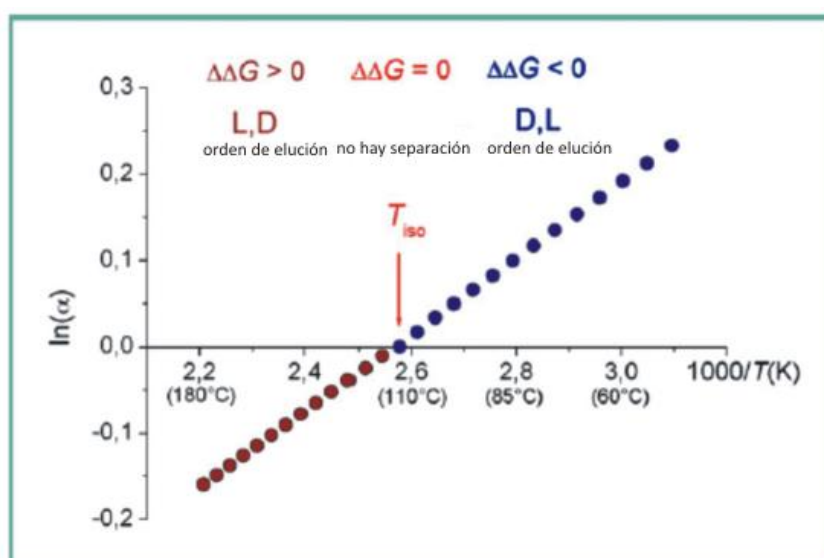


Figura 11. Representación esquemática hipotética de la dependencia de la enantioselectividad con la temperatura considerando la ecuación de Gibbs-Helmholtz.

3.3. Modelo de incremento de la retención R'

La aproximación del incremento de la retención R' ha sido propuesta para diferenciar cuantitativamente la contribución a la retención originada tanto por la partición gas-líquido que involucra al solvente aquiral y definida por la constante K° , de la contribución a la retención originada por la interacción enantioselectiva selector-selectando y definida por la constante termodinámica de complejación (o asociación) K_i . La

aproximación del incremento de retención R' [28, 88, 89](anteriormente denominada aumento de la retención [90]) es una extensión de una aproximación utilizada para la determinación de las constantes de complejación entre electrones donores π de hidrocarburos insaturados y elementos aceptores como plata por CG de argentación [91-94]. Para su determinación se utiliza (i) una columna de referencia que contiene el solvente puro y (ii) una columna de complejación (o reactiva) que contiene al selector diluido en, o ligado químicamente a, el solvente. El principio se detalla en la Figura 12.

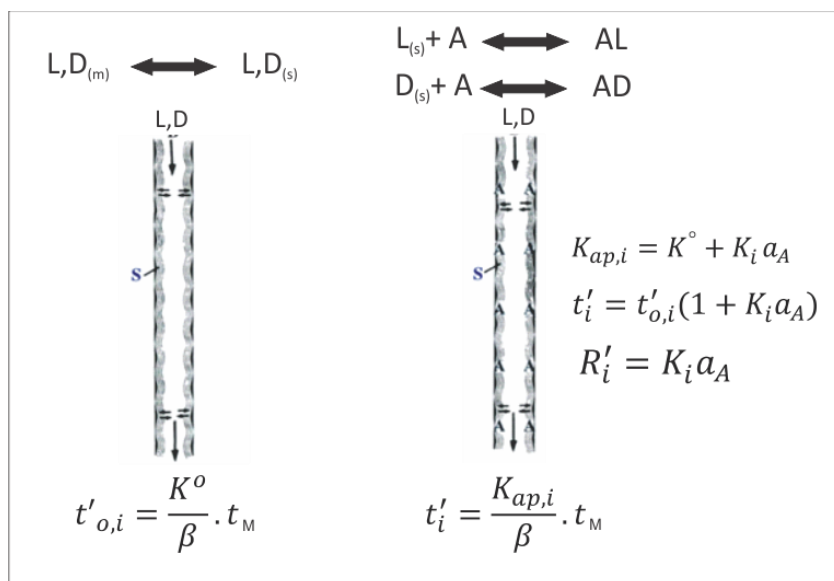


Figura 12. Principio de la GC de complejación. Izquierda: columna de referencia que contiene solvente puro S. Derecha: columna de complejación que contiene el selector A (aditivo) en el solvente S. K_c es la constante de distribución del analito en la columna de referencia y β es la relación de fases. K es la constante de complejación entre A y el analito y a es la actividad (o concentración c a alta dilución) de A en S (de referencia [95]).

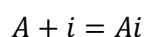
En la columna de referencia, el selectando L o D se particiona entre la fase móvil y la fase estacionaria que contiene el solvente S:



La constante de partición, K^o , se define como:

$$K^o = \frac{a_{i(s)}}{a_{i(m)}} \quad (1.19)$$

Si el selector A, que posee afinidad química por L y por D, se adiciona al solvente S a una actividad a (o concentración c a alta dilución) se introduce selectividad química en el proceso de separación. En términos generales los equilibrios expresados en (1.8) y (1.9) se puede escribir como:



y la constante termodinámica de complejación K_i será:

$$K_i = \frac{a_{Ai}}{(a_A a_i)} \quad (1.20)$$

Como la cantidad de soluto presente en la fase líquida es $a_{Ai} + a_{i(s)}$, se puede definir una "constante" aparente de partición como:

$$K_{ap,i} = \frac{a_{i(s)} + a_{Ai}}{a_{i(m)}} \quad (1.21)$$

Combinando las ecuaciones (1.19) y (1.20), la ecuación (1.21) puede reescribirse como:

$$K_{ap,i} = K^o(1 + K_i a_A) \quad (1.22)$$

Empleando la ecuación fundamental de cromatografía, es posible definir el tiempo de retención ajustado del selectando i en una columna de referencia aquiral, $t'_{o,i}$, y en una columna de complejación, t'_i :

$$t'_i = \frac{K_{ap,i}}{\beta} \cdot t_M \quad (1.23)$$

$$t'_{o,i} = \frac{K^o}{\beta} \cdot t_M \quad (1.24)$$

donde t_M es el tiempo muerto.

En las expresiones (1.23) y (1.24), la relación de fases difícilmente sea exactamente la misma, dado que se trata de dos columnas diferentes.

Es posible entonces escribir una ecuación análoga a la ecuación (1.22) para el tiempo de retención ajustado del analito en la columna quiral, combinando las expresiones (1.22) a (1.24), si y solo si, la relación de fases β y el t_M fuese exactamente el mismo en la columna de complejación y en la de referencia:

$$t'_i = t'_{o,i}(1 + K_i a_A) \quad (1.25)$$

donde el sumando 1 representa la contribución aquiral o "física" y el producto $K_i a_A$ a la contribución "quiral" o química a la retención.

En la ecuación (1.25), se define el incremento de la retención R' se define como:

$$R'_i = K_i a_A \quad (1.26)$$

R' es una medida cuantitativa del aumento en la retención de i causado por la adición del derivado de ciclodextrina A al solvente aquiral S. Por lo tanto, la determinación de R' permite la cuantificación de las contribuciones no-enantioselectivas (K^o) y enantioselectivas (K_i) a la retención total.

Dado que es experimentalmente imposible determinar t'_i y $t'_{o,i}$ con parámetros de columna idénticos como longitud, diámetro, espesor de fase depositada (film) o caudal, todas variables experimentales que variarán la relación de fases y la medición de tiempo muerto, es de mayor utilidad, de acuerdo al modelo del incremento de la retención, reescribir la ecuación (1.25) en términos de *datos de retención relativa* con el objeto de obtener una ecuación que sea independiente de estos parámetros experimentales:

$$r = r_o(1 + R') \quad \text{o} \quad R' = \frac{r}{r_o} - 1 \quad (1.27)$$

$$r = \frac{t'_i}{t'^*} \quad \text{columna quiral (A en S)} \quad (1.28)$$

$$r_o = \frac{t'_{o,i}}{t'^*_o} \quad \text{columna de referencia aquiral (solo S)} \quad (1.29)$$

donde r es la retención neta relativa del selectando i respecto de un analito de referencia B^* (por ej., un n -alcano pequeño), t'_i es la retención del analito en la columna quiral, t'^* es la retención del soluto de referencia B^* en la columna quiral, $t'_{o,i}$ es la retención de analito en la columna aquiral y t'^*_o es la retención del soluto de referencia B^* en la columna aquiral.

El factor de separación $\alpha_{ap} = k_D/k_L$ solo debería ser usado como criterio de enantioselectividad cuando las contribuciones aquirales están ausentes. Dado que este caso no suele ser frecuente, solo α es una medida certera de la enantioselectividad. El modelo de incremento de la retención permite, según sus autores, reemplazar las constantes de complejación de cada enantiómero de la siguiente manera:

$$-\Delta_{D,L}(\Delta G) = RT \ln\left(\frac{K_D}{K_L}\right) = RT \ln\left(\frac{R'_D}{R'_L}\right) = RT \ln \alpha \quad (1.30)$$

Esta aproximación, que se postuló en un proceso de retención en GC de complejación [89], luego se extendió a GC de inclusión utilizando ciclodextrinas modificadas como selectores [73, 96] y ha sido considerado en CL enantioselectiva. Pirkle y col. [97] establecieron previamente que “mecanismos adicionales de retención diferentes a aquellos responsables del reconocimiento quiral atenúan el valor de α y por lo tanto las diferencias de estabilidad entre los solvatos diastereoméricos calculados a partir de los valores de α observados representarán valores mínimos”.

Este modelo de incremento de la retención R' descrito y ampliamente usado por Schurig y sus colaboradores permite calcular valores de constantes de partición evadiendo la determinación de la relación de fases β [98]. Sin embargo, existen evidentes desventajas en el uso de esta aproximación:

- Este procedimiento se basa en un soluto estándar B^* cuya constante de partición se supone que no varía con la adición del selector enantiomérico al polisiloxano aquiral. Esta condición es muy difícil de alcanzar dado que, aun en el caso de una muy baja afinidad del estándar por el aditivo, la presencia del selector quiral modificará el volumen molar de la fase estacionaria y por lo tanto la constante de partición, K^o de la sustancia de referencia [98].
- Los valores obtenidos utilizando esta aproximación no son las constantes de asociación entre la ciclodextrina y el enantiómero sino los del parámetro R' que es el producto entre dichas constantes y la actividad del selector en la mezcla.
- De acuerdo al n -alcano utilizado como sustancia estándar elegida se han observado diferencias en el valor calculado de R' ; Schurig acepta diferencia de hasta un 10 % trabajando con los n -alcanos C_9H_{20} y $C_{12}H_{26}$ [73].

3.4. Determinación de la relación de fases, β

Las mediciones cromatográficas de constantes de partición gas-líquido y las funciones termodinámicas asociadas al proceso de partición se han llevado a cabo, tradicionalmente, empleado columnas rellenas. De igual modo, las mediciones de equilibrios de complejación donador-aceptor por CG se han realizado usando columnas rellenas. Son sumamente escasos los estudios en los que se usaron columnas capilares con este fin. Una de las razones es histórica; los primeros estudios dedicados a medir estas propiedades de solución fueron realizados cuando aún las columnas capilares no se habían desarrollado. Otra de las razones radica en que las constantes de partición desde la fase vapor a una fase líquida se pueden obtener del cálculo de volúmenes de retención de un soluto en la columna conteniendo esa fase, a partir del conocimiento preciso de variables

experimentales difíciles de medir cuando se emplean columnas capilares, por ejemplo el caudal de gas portador y el volumen de fase líquida contenida en la columna. Los caudales a los que se opera una columna rellena de varios milímetros de diámetro interno se pueden medir con buena precisión. Por otra parte, la construcción de columnas rellenas de CG de las dimensiones usuales, requiere de una masa de relleno para el llenado de la columna fácilmente medible con varias cifras significativas. Esto permite conocer el volumen de líquido con buena precisión, y el cambio de volumen del líquido a distintas temperaturas se puede estimar a partir de mediciones de su densidad a cada temperatura.

Sin embargo, estas constantes de partición pueden calcularse en forma directa a partir del tiempo muerto y del tiempo de retención del soluto en la columna (en lugar de calcular inicialmente el volumen neto que, en su cálculo, requiere medir exactamente el caudal de gas portador). La expresión básica es:

$$K = \left(\frac{t_R}{t_M} - 1 \right) \beta \quad (1.31)$$

la sencillez en esta expresión, en comparación con la expresión obtenida a partir del volumen de retención neto es notable. Sólo se requiere conocer con buena precisión la relación de fases y los tiempos de retención y el tiempo muerto.

Más aún, el empleo de capilares en estas mediciones en reemplazo de columnas rellenas posee varias ventajas.

- (i) Las mayores eficiencias logradas permiten obtener picos más angostos y con máximos mejor definidos;
- (ii) Estas mayores eficiencias permiten que, en una única inyección se puedan eluir y resolver bien un número relativamente grande de n-alcenos, cuyas retenciones son necesarias para medir el tiempo muerto de la columna (ver abajo),
- (iii) Dada las mayores permeabilidades de estas columnas capilares en comparación con las rellenas, la presión de gas portador en la entrada del capilar es relativamente baja. En consecuencia, tanto las correcciones por no idealidad de la fase vapor como la extrapolación de K desde varias presiones de entrada a presión igual cero no son necesarias, simplificando los cálculos y reduciendo los errores asociados a estas correcciones.

Respecto de la relación de fases β , se trata de un parámetro de la columna esencial (i) para comparar medidas realizadas sobre diferentes columnas, (ii) para estimar valores absolutos de K a partir de la ecuación (1.31) y (iii) para la determinación de diferencias de entropía de transferencia de solutos. La dificultad aparente que conlleva el conocimiento preciso de β en capilares de GC ha llevado, en algunos casos, a la evasión de su determinación directa [73, 99, 100] lo cual obliga a la utilización de distintas aproximaciones con niveles de precisión [101] tales que podrían enmascarar fenómenos de interés, por ejemplo, de solvatación [98, 102-106].

Sin embargo, se ha demostrado que si se construyen columnas capilares de GC a través del método de recubrimiento estático [107] es posible determinar β con gran exactitud a cualquier temperatura [108, 109]. La expresión para calcularla deriva de considerar la geometría del capilar recubierto homogéneamente con el polímero y el cambio en esta geometría con el aumento de la temperatura. La expresión resultante es:

$$\beta(T) = \frac{\rho_s(T)}{C_o} e^{\alpha_{SiO_2}(T-T_o)} - 1 \quad (1.32)$$

donde $\rho_s(T)$ es la densidad de la fase estacionaria a la temperatura T, C_o es la concentración molar de la solución de recubrimiento a la temperatura de llenado T_o , α_{SiO_2} es el coeficiente de expansión térmica de la sílice que constituye la pared sólida del capilar.

El método estático de construcción de columnas capilares es un procedimiento que demanda mucho tiempo debido al proceso de evaporación del solvente empleado en preparar las soluciones de recubrimiento. Sin embargo, es el método de construcción adoptado por la industria porque el método dinámico, una alternativa más rápida [107], no permite realizar una estimación confiable de la cantidad de fase estacionaria depositada en el capilar. Usualmente, los fabricantes proveen datos de espesor de film depositado y de β de las columnas capilares comerciales con solo dos cifras significativas. La precisión de estas especificaciones puede ser incrementada notablemente si se tienen en cuenta unos pocos detalles experimentales necesarios para la aplicación de la ecuación (1.32).

El número de cifras significativas de la concentración C_o y de la densidad ρ_s medidas experimentalmente determina el nivel de precisión en la estimación de β . La precisión de C_o puede incrementarse preparando un gran volumen de la solución de llenado y dejando a la densidad como la medida limitante [98]. Para la medición de la densidad suelen utilizarse dos métodos, la picnometría clásica [108, 110-114] y mediciones electrónicas a través de un tubo transductor vibrante [115-117]. En principio, si se tienen en cuenta estos detalles experimentales, β puede estimarse con el mismo número de cifras significativas que t_R y t_M , generalmente cuatro.

3.5. Determinación del tiempo muerto

El valor del tiempo muerto de una columna cromatográfica a una dada temperatura es un dato fundamental para realizar distintos tipos de cálculos, entre los que se incluyen, cálculos de optimización de resolución y tiempo de análisis y estimación de propiedades termodinámicas para las cuáles son necesarios los tiempos de retención ajustados una vez eliminada la contribución a la retención debida a efectos extracolumna. Un valor preciso de tiempo muerto es imprescindible para calcular el factor de retención y la velocidad promedio de gas portador [118].

Los métodos utilizados para medir este parámetro pueden clasificarse en: (1) métodos de estimación basados en la mecánica de fluidos; (2) medición del tiempo de elución de un compuesto supuestamente no-retenido; (3) a partir del frente del pico del solvente; y (4) deducida de ecuaciones de regresión basada en la gráfica semilogarítmica de factores de retención de analitos pertenecientes a una serie homóloga en función de su número de átomos de carbono [119, 120]. Teniendo en cuenta que la aproximación de la dinámica de fluidos se basa en modelos bien establecidos parecería apropiada para su utilización en columnas capilares pero en realidad la exactitud es pobre porque los parámetros de la columnas requeridos para su cálculo (por ej., diámetro interno de la columna, relación de fases, etc.) no se conocen con suficiente precisión y no son fáciles de medir en el laboratorio [121, 122]. Las columnas de sílice fundida son permeables al helio (mucho menos al nitrógeno e hidrógeno) a altas temperaturas lo cual produce un error de hasta el 15% en la determinación del tiempo muerto [123].

En el caso de columnas rellenas y capilares el método más utilizado es la co-inyección junto con la muestra de un compuesto marcador supuestamente no retenido. El analito marcador seleccionado no debe tener interacción (sorción) con la fase estacionaria y debe ser fácilmente detectado. Algunos ejemplos son: los gases permanentes (ej., nitrógeno, helio, argón, neón) o aire con un detector de conductividad térmica o espectrómetro de masa; metano con un detector de ionización de llama (FID¹⁰); cloruro de metileno con un detector de captura electrónica, acetonitrilo con un detector de ionización termiónica; y hexafluorosulfuro con un detector fotométrico de llama. Para cada uno de estos compuestos existen fases estacionarias y temperaturas en las cuales la retención es significativa por lo que no puede recomendarse una única sustancia para todas las aplicaciones. Los factores más importantes que determinan la selección de un compuesto

¹⁰ FID: Flame Ionization Detector

marcador mínimamente retenido son la temperatura, la relación de fases de la columna, y la intensidad de la posible interacción entre el analito y la fase estacionaria. El uso intensivo del detector FID dicta que sea el metano el compuesto más utilizado como marcador de tiempo muerto. A temperaturas superiores a los 100°C la retención del metano en columnas capilares recubiertas con fases estacionarias polares o de polaridad intermedia y con una relación de fases mayor a 200 es prácticamente inexistente [122, 124, 125]. En el rango de temperaturas de 30 – 120°C se han informado desviaciones de 0,2% y del 4-5% en columna capilares y rellenas, respectivamente, utilizando metano en referencia al pico de aire [121]. Esto indica claramente que para mediciones muy precisas, no puede usarse estos marcadores, especialmente cuando los analitos cuyos factores de retención deben ser medidos son solutos poco retenidos.

Los métodos de regresión para la estimación del tiempo muerto se basan en el empleo de compuestos retenidos que pertenecen a una serie homóloga, normalmente *n*-alcanos, asumiendo un modelo lineal [120, 122, 125-128] o no lineal [125, 128, 129] para relación semilogarítmica del tiempo de retención en función del número de átomos de carbono. Para aplicar el modelo lineal se necesita los tiempos de retención de tres o más homólogos (no necesariamente consecutivos) los cuales luego se ajustan mediante un método estándar de regresión [119, 127, 128]. El valor del tiempo muerto calculado por cualquiera de los modelos lineales depende hasta cierto punto del rango de compuestos homólogos utilizados [130]. García Domínguez y colaboradores detectaron desviaciones estadísticamente significativas de la linealidad entre $\ln k$ y *n* empleando seis columnas rellenas y tres capilares. Por lo que para describir correctamente esta dependencia, los autores ensayaron numerosas ecuaciones empíricas conteniendo desde tres a cinco parámetros de ajuste, y optaron por dos de ellas en base a la calidad del ajuste y a las diferencias entre el t_M predicho y el tiempo de retención del neón. Las expresiones son:

$$t_{R(n)} = A + e^{(B+Cn+Dn^2)} \quad (1.33)$$

y

$$t_{R(n)} = A + e^{(B + Cn^D)} \quad (1.34)$$

donde *n* representa el número de átomos de carbono para un *n*-alcano y las letras en mayúscula representan los coeficientes de la regresión. El t_M corresponde a la retención de un *n*-alcano con *n* = 0, esto es:

$$t_M = A + e^B \quad (1.35)$$

Los resultados que obtuvieron los autores con ambas ecuaciones fueron muy similares.

A partir de conceptos de termodinámica estadística, González dedujo un modelo de retención de *n*-alcanos y, del mismo obtuvo una ecuación que permite estimar el t_M de una regresión no lineal de los tiempos de retención de alcanos con $n \geq 5$ [98]. La expresión es:

$$t_{R(n)} = t_M + e^{(A + B(n-1) + \ln(1-Cn^2))} \quad (1.36)$$

Los t_M obtenidos por este modelo fueron ligeramente menores que los obtenidos de las ecuaciones propuestas por García Domínguez.

4. Objetivos

Considerando los antecedentes expuestos, en esta tesis se plantearon los siguientes objetivos:

4.1. Objetivo general

Desarrollo de métodos separativos quirales para la enantioseparación de compuestos de distintas familias químicas por cromatografía gaseosa empleando columnas capilares que contienen sistemas mixtos formados por una matriz polimérica quiral a base de polisiloxanos en los que se disolvió un derivado de γ -ciclodextrina.

4.2. Objetivos específicos

- Preparación y desarrollo de capilares para cromatografía de gases conteniendo como fase estacionaria depositada una película uniforme de espesor conocido. Las fases que se prepararon contienen distintos porcentajes de octakis(3-O-butanoil-2,6-di-O-pentil)- γ -ciclodextrina disuelta en un polisiloxano de polaridad intermedia como OV-1701 (7% fenil-7% ciano-metilpolisiloxano). Los capilares se evaluaron cromatográficamente (medición de eficiencia de la columna y capacidad de enantioconocimiento). Este derivado de ciclodextrina elegido es líquido a temperatura ambiente, por lo que se prepararon mezclas desde 0 hasta aproximadamente un 30% p/p de selector en el polisiloxano.
- Determinación de las constantes de asociación absolutas entre el derivado de ciclodextrina y solutos ópticamente activos de diversas familias químicas en un rango de temperaturas determinado fundamentalmente por la presión de vapor del soluto estudiado
- Evaluación de la contribución ejercida por la matriz quiral sobre la retención cromatográfica total y sobre la enantioselectividad de las columnas.
- Medición e interpretación de los parámetros termodinámicos involucrados en la enantioseparación a partir de la dependencia de las constantes de asociación soluto-selector con la temperatura.
- Comparación de las constantes absolutas obtenidas a una dada temperatura con los valores que se obtendrían a partir del modelo de incremento de la retención a la misma temperatura. Evaluación crítica de los resultados.

Capítulo II - Experimental

5. Materiales

5.1. Columnas cromatográficas

Para el desarrollo de las fases estacionarias quirales se utilizó el polisiloxano conocido comercialmente como OV-1701 (5% cianopropil, 7% fenil, 88% metilpolisiloxano) suministrado por Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Como selector quiral se utilizó octakis-(2,6-di-O-pentil-3-O-butiril)- γ -ciclodextrina (LIPODEX-E) adquirida a Cyclolab Ltd. (Budapest, Hungría) con una pureza mayor al 97%. En la construcción de las columnas el selector se empleo tal como se recibió.

Se utilizó capilar de sílice fundido de 250 μm de diámetro interno y 365 μm de diámetro externo, proveniente de MicroQuartz (München, Alemania).

Con la finalidad de seleccionar los analitos de interés y comparar la eficiencia de las columnas quirales fabricadas en este trabajo se adquirió una columna comercial de 25 metros de longitud y 250 mm de diámetro interno con el mismo selector quiral: octakis-(2,6-di-O-pentil-3-O-butiril)- γ -ciclodextrina disuelta en un polisiloxano no especificado, de marca LIPODEX-E, fabricada por Macherey-Nagel (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany).

5.2. Reactivos derivatizantes

Para realizar las derivatizaciones de ácidos e hidroxiácidos se utilizaron dos agentes derivatizantes: cloroformiato de etilo (ECF) provisto por Aldrich (Milwaukee, WI, USA, 97%) y anhídrido trifluoroacético (TFAA) adquirido a Fluka (Ronkonkoma, NJ, USA, >99%, grado GC).

5.3. Solventes

En las distintas etapas del desarrollo experimental de esta tesis se utilizaron los siguientes solventes: acetonitrilo (CH_3CN), metanol (MeOH), diclorometano, agua destilada (H_2O), etanol, piridina y hexano. El agua destilada se obtuvo mediante el sistema Simplicity Milli-Q Water Purification System (Millipore, MA, USA). El acetonitrilo (CH_3CN) fue adquirido a Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ, USA, grado HPLC, >99.5%). Los demás solventes fueron adquiridos a Merck (Darmstadt, Germany).

5.4. Analitos

Los analitos utilizados se listan en la Tabla 1. Los mismos fueron obtenidos de Aldrich (Milwaukee, WI, USA), Sigma (St. Louis, MO, USA) o Fluka (Ronkonkoma, NJ, USA). Sus estructuras y presiones de vapor se indican en la Figura 13 y la Tabla 1, respectivamente.

Tabla 1. Analitos quirales utilizados con la presión de vapor correspondiente a la temperatura indicada.

Nº	Analito	Presión de vapor (Pa)	T (°C)
1	2,3-dimetilpentano	13120	25
2	3-metilhexano	8200	25
3	2-bromopentano	1680	20
4	2-butanol	1700	20
5	2-pentanol	550	20
6	4-metil-2-pentanol	400	20
7	2-hexanol	267	25
8	2-heptanol	18	20
9	1-fenil-1-etanol	19	25
10	1-fenil-1-propanol	27	20
11	1-fenil-1-butanol	s/d	s/d
12	1-cloro-2-propanol	653	20
13	2-metil-1-butanol	420	25
14	3-metil-2-butanol	1220	25
15	3-hexanol	641	25
16	2-octanol	32	25
17	2-amino-1-propanol	133	20
18	1,2-hexanodiol	3	25
19	1,3-butanodiol	8	20
20	2,4-pentanodiol	s/d	s/d
21	2,5-dimetoxi tetrahidrofurano	s/d	s/d
22	2,5-dimetil tetrahidrofurano	s/d	s/d
23	3,3,5-trimetil ciclohexanona	80	25
24	5-metil-3-heptanona	671	25
25	canfeno	400	20
26	isopinocanfeol	4	25
27	mentol	107	20
28	limoneno	40	14,4
29	β-pineno	390	25
30	ácido 2-cloropropiónico	100	20
31	ácido 2-bromopropiónico	13	25
32	ácido 2-bromobutírico	11	25
33	ácido 2-bromoaléico	s/d	s/d
34	ácido 2-bromohexanoico	3	25
35	ácido 2-aminobutírico	s/d	s/d
36	ácido 3-hidroxibutírico	s/d	s/d
37	leucina	s/d	s/d
38	isoleucina	s/d	s/d
39	norleucina	s/d	s/d

Pa: pascales; s/d: sin dato. Los datos de presión de vapor se obtuvieron de la ref. [131] y de las hojas de seguridad de los analitos.

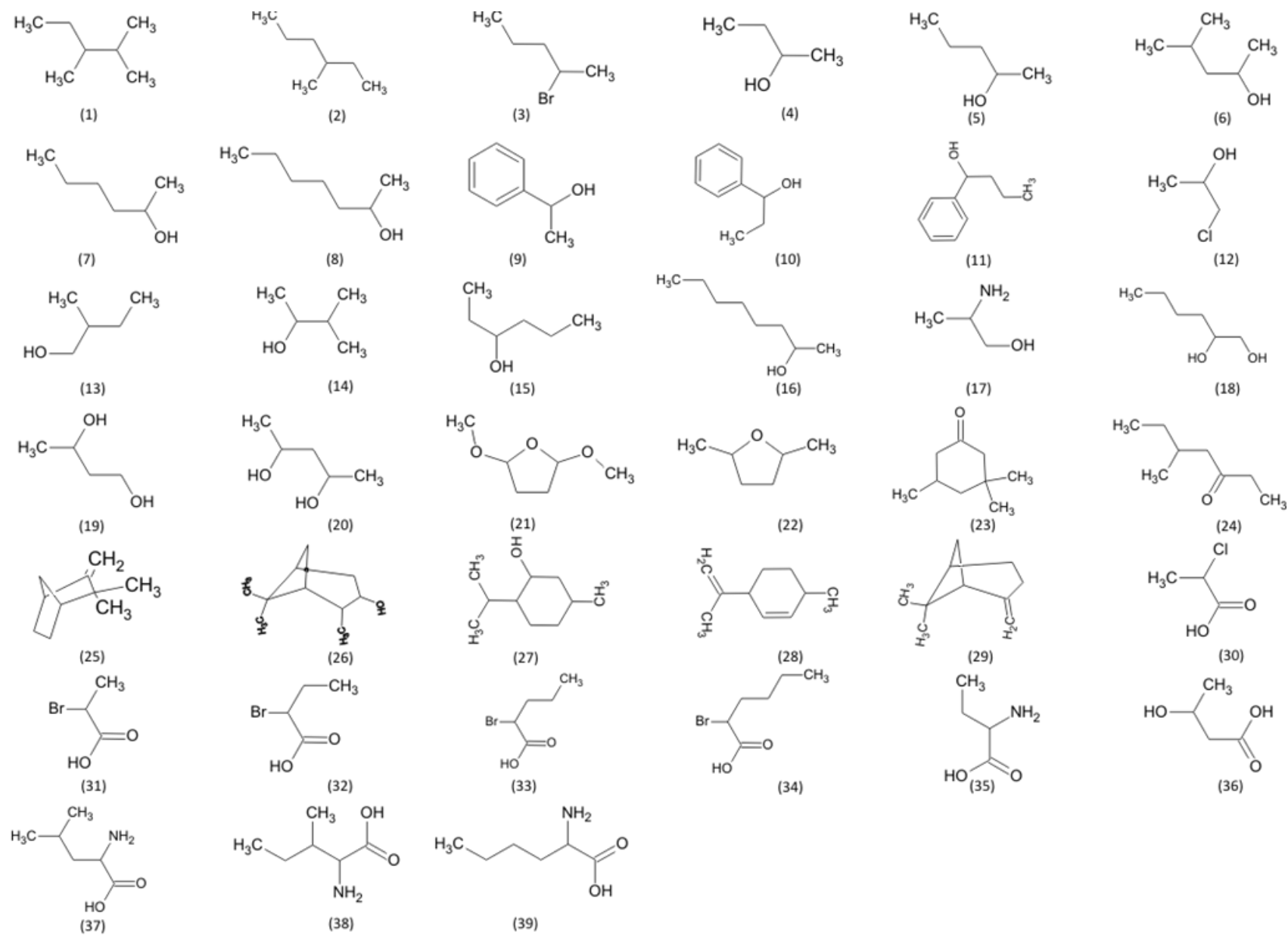


Figura 13. Estructura química de los analitos quirales listados en la Tabla 1.

6. Métodos

6.1. Determinación de la densidad de las fases estacionarias

Se utilizó un picnómetro de Guy-Lussac de 2 mL, cuyo volumen fue previamente calibrado a todas las temperaturas en el rango comprendido entre 50 y 100°C con n-tetradecano (C₁₄H₃₀) de alta pureza. La densidad del C₁₄H₃₀ se puede calcular en el mismo rango de temperaturas de 50 – 100 °C con un error del 0,1% [132] mediante la ecuación:

$$\rho_{C_{14}}\left(\frac{kg}{m^3}\right) = 942,486 - 0,5355T - 2,6334 \times 10^{-4}T^2 (T: K) \quad (2.1)$$

Las densidades del polisiloxano puro OV-1701 y de una mezcla con el selector quiral fueron determinadas en el mismo rango de temperaturas.

6.2. Fabricación columnas cromatográficas

Se construyeron columnas de 20 m de longitud utilizando capilares de sílice fundido recubiertos con fase estacionaria de modo tal de tener un espesor de película de 0.2 a 0.3 µm.

El depósito de la fase estacionaria se realizó mediante el método de recubrimiento estático a alta temperatura. Esta técnica consiste en el llenado del capilar con una solución de concentración perfectamente conocida de la fase estacionaria a depositar en un solvente volátil. El conocimiento de la concentración y de la densidad de la fase estacionaria a cada temperatura permite calcular el espesor de la película finalmente depositada, así como la relación de fases del capilar a cada temperatura. Una vez llenado, el capilar es introducido en un horno a una velocidad constante y a una temperatura mayor a la del punto de ebullición del solvente usado en la disolución de la fase. La velocidad de entrada del extremo del capilar se regula de manera que el menisco de la interfase líquido-vapor, producto de la evaporación en el interior del capilar, se mantenga en la región de entrada del horno con el fin de evitar explosiones de la solución por efectos del sobrecalentamiento de una masa considerable de líquido. El control del menisco se hace visualmente a través de una ventana en el horno y el avance del capilar se regula mediante un motor de paso de velocidad variable.

El equipo de construcción utilizado consistió en un horno cromatográfico en desuso que fue modificado para este fin y para regular la velocidad de entrada del capilar, se adosó un motor de pasos con un controlador de marca "servo driver up 1205" (Fig. 5). Esta técnica ha sido utilizada exitosamente para depositar poli(oxietilenglicol) en el interior de columnas capilares [108, 133-135]. Una vez depositada la fase estacionaria y evaporado el solvente, la columna es acondicionada toda la noche a 120 °C con un flujo de nitrógeno bajo. Un esquema del equipo se muestra en la Figura 14.

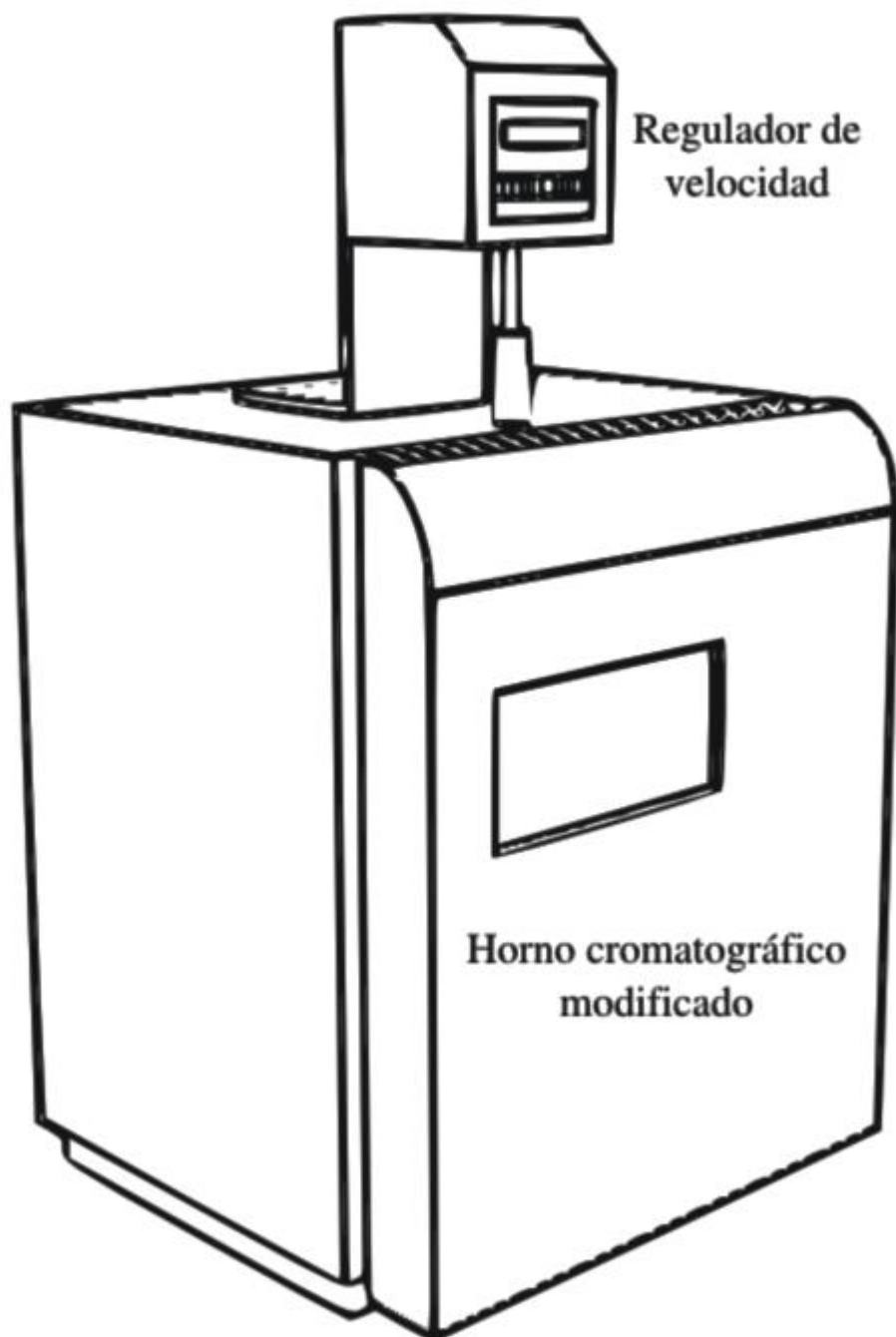


Figura 14. Dibujo del horno cromatográfico modificado para construir columnas capilares y su regulador de velocidad.

6.3. Derivatizaciones

Se utilizaron dos protocolos para la derivatización de ácidos, hidroxiaácidos y aminoácidos. Uno con anhídrido trifluoroacético (TFAA) y otro con etilcloroformiato (ECF).

Protocolo 1. Derivatización con ECF

Medio de reacción: H₂O (10 %), metanol (5 %) en CH₃CN

Muestra: 1-5 mg o 1-5 μL

Procedimiento: colocar la muestra en un tubo Eppendorf de 1,5 mL junto con 200 μL de medio de reacción, 10 μL de ECF y 15 μL de piridina. Se agita durante 5 min. Se extrae el analito derivatizado con 200 μL de hexano y se inyecta.

Protocolo 2. Derivatización con TFAA

Muestra: 1-5 mg o 1-5 μL

Procedimiento: se coloca la muestra en un tubo Eppendorf de 1,5 mL junto con 1 mL de HCl 4M en MeOH, 1 h durante a 40 $^{\circ}\text{C}$. Se evapora en vacío. Se disuelve el residuo con diclorometano. Se agrega 0,25 mL de TFAA, 1 h a temperatura ambiente. Se evapora en vacío y se resuspende el residuo con diclorometano, finalmente se inyecta.

6.4. Medidas cromatográficas

Se utilizó un cromatógrafo de gases HP 6890+ con las siguientes características: detector FID, control electrónico de la neumática y adquisición de datos mediante el software Clarity[®] (DataApex, República Checa). El gas portador fue nitrógeno de grado cromatográfico. Se hicieron inyecciones en modo “split” con una relación 1/100, la temperatura del inyector fue fijada en 180 $^{\circ}\text{C}$ y la del detector 250 $^{\circ}\text{C}$, las medidas se hicieron de forma isotérmica a temperaturas entre 50 $^{\circ}\text{C}$ y 100 $^{\circ}\text{C}$ operando a presión constante. Para la introducción de las muestras se utilizó la técnica de la aguja mojada y se utilizó metano para estimar luego el tiempo muerto (ver abajo). Se ensayaron los solutos descritos en la Tabla 1.

6.5. Caracterización de las columnas capilares

Para determinar el espesor de la fase estacionaria depositada (e.f.) se utilizó la ecuación [98]:

$$ef_{\mu\text{m}} = \frac{d_c}{2} \left[1 - \sqrt{\left(\frac{\beta}{\beta + 1} \right)} \right] \quad (d_c: \mu\text{m}) \quad (2.2)$$

donde d_c corresponde al diámetro interno de la columna. La relación de fases β se determinó utilizando la ecuación descrita en la Introducción (Ver 3.4. Determinación de β).

Para la evaluación de la eficiencia de las columnas preparadas se midió el tiempo de retención y el ancho del pico a mitad de altura de la inyección de n-dodecano a 100 $^{\circ}\text{C}$ en las condiciones cromatográficas descritas anteriormente. La eficiencia en platos por metro (N/m) se calculó utilizando la ec. (2.3) sobre picos simétricos y dividiendo el resultado de la ecuación por el largo de la columna preparada.

$$N = 5,545 \left(\frac{t_R}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (2.3)$$

donde t_R es el tiempo de retención del analito y $w_{1/2}$ es la medida en minutos del ancho del pico a mitad de su altura.

6.6. Determinación de tiempo muerto

El procedimiento para la determinación precisa de este parámetro de importancia fundamental en la determinación de valores precisos de K consta de varios experimentos. En primer lugar se inyectaron una serie de n -alcanos con una longitud de cadena $n \geq 5$ junto con metano en un rango de temperatura entre 50 °C y 100 °C en cada una de las columnas del estudio [98]. Los datos de $t_R(n)$ se ajustaron a las ecuaciones no lineales (1.33), (1.34) y (1.35) mediante una regresión por cuadrados mínimos. Se analizaron la calidad de estos ajustes y, además se estimaron los valores de $K_{(CH_4)}$ en cada columna y a cada temperatura según:

$$k_{(CH_4)} = \frac{t_{R(CH_4)} - t_M}{t_M} \quad (2.4)$$

$$K_{(CH_4)(T)} = k_{(CH_4)(T)} \times \beta_{(T)} \quad (2.5)$$

El criterio para estimar el t_{Mexp} fue la bondad del ajuste (comparación de errores residuales) y que los valores de $K_{(CH_4)}$ resultantes siguieran una tendencia lógica.

Este experimento se realizó para cada temperatura del rango establecido y para cada columna utilizada. Los datos calculados son el resultado de cuadruplicados de los tiempos de retención de los alcanos.

6.7. Cálculo de las constantes de partición aparentes

Se calcularon utilizando los datos de obtenidos para cada columna y a cada temperatura y los tiempos de retención y tiempo muerto calculados considerando las condiciones individuales de cada analito inyectado en el rango de temperatura 50 °C - 100 °C en todas las columnas construidas. Los factores de retención son el resultado de al menos tres inyecciones.

En primera instancia se calculó el tiempo muerto de cada inyección individual utilizando $K_{(CH_4)}$ calculada a cada temperatura:

$$t_{M,calc} = t_{R(CH_4)} \frac{\beta_{(T)}}{\beta_{(T)} + K_{(CH_4)(T)}} \quad (2.6)$$

Luego,

$$k_{ap,i(T)} = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M} \quad (2.7)$$

$$K_{ap,i(T)} = k_{ap,i(T)} \times \beta_{(T)} \quad (2.8)$$

6.8. Cálculo de las constantes de partición termodinámicas

Utilizando los valores de las constantes de partición aparentes de cada analito inyectado en cada una de las columnas construidas y considerando que la constante aparente depende de la actividad de selector en el polímero según la ecuación (1.22):

$$K_{ap,i(T)} = K^0 (1 + K_i a_A) \quad (2.9)$$

donde K^0 corresponde a las constantes de partición de cada analito calculadas para la columna construida con fase estacionaria sin selector quiral, K_i corresponde a la constante de asociación entre enantiómero y selector y a_A es la actividad de la CD en OV1701.

El coeficiente de actividad γ_A del selector quiral en el polisiloxano es una magnitud no accesible. Una aproximación consiste en suponer que su valor es constante y cercano a la unidad, entonces $a \approx Cx$, donde C_x es la concentración molal de la CD disuelta en el polisiloxano y K_i será la constante estequiométrica de formación del complejo entre el enantiómero i y el selector quiral A. La elección de la escala de concentración molal tiene la ventaja de que la concentración no cambia con la temperatura de la columna.

6.9. Análisis estadístico

En la determinación de las ecuaciones de las curvas que mejor se ajustaban a los datos experimentales obtenidos, lineales y no-lineales, se utilizó el programa comercial Sigmaplot© (Systat Software Inc., San José, CA, USA). El método de regresión utilizado fue por cuadrados mínimos.

Capítulo III - Resultados y Discusión

1. Densidad de las fases estacionarias

En primer lugar se determinó por picnometría la densidad de las fases estacionarias utilizadas en la construcción de las columnas quirales. El volumen del picnómetro en el rango entre 30 y 130 °C se determinó empleando un estándar de *n*-tetradecano de densidad conocida. La Tabla 2 muestra los resultados de estas determinaciones. Con estos valores de volumen para cada temperatura, se realizó un análisis de regresión por cuadrados mínimos para obtener una ecuación polinómica que se ajustase a los datos obtenidos y permitiera obtener el volumen a cualquier temperatura dentro del intervalo. La ecuación hallada es:

$$V_{(mL)} = 2.00_4 (\pm 0.02_1) + 0.0003 (\pm 0.0001) T - 3.6 (\pm 1.7) \times 10^{-7} T^2 \quad (T: K) \quad (3.1)$$

Tabla 2. Datos de la calibración del picnómetro.

T (K)	Densidad C ₁₄ (g/mL)	Peso (g)	Vol. del picnómetro (mL)	Vol. calc (mL)	Parámetros
303,15	0,7559	1,5611	2,0652	2.0652	R ² = 0.949
313,15	0,749	1,5475	2,0661	2.0660	Sy.x = 0.0005
323,15	0,7419	1,533	2,0663	2.0668	
333,15	0,7349	1,5198	2,0680	2.0676	
343,15	0,7277	1,5055	2,0688	2.0683	
353,15	0,7205	1,4902	2,0683	2.0689	
363,15	0,7133	1,476	2,0693	2.0695	
373,15	0,706	1,4615	2,0701	2.0699	
383,15	0,6987	1,4463	2,0700	2.0703	
393,15	0,6913	1,4319	2,0713	2.0706	
403,15	0,6838	1,4158	2,0705	2.0708	

Una vez calibrado el picnómetro, se procedió a determinar la densidad del polímero OV1701 y de una solución de selector en OV1701 en un rango de temperatura de 303.15-373.15 K. Luego, mediante un análisis de regresión por cuadrados mínimos de los datos experimentales se obtuvo una ecuación polinómica de segundo grado con la que se procedió a recalcular los valores de densidad para cada temperatura.

$$\rho_{OV1701(g/mL)} = 1,29_7 (\pm 0.03_2) - 0.0010 (\pm 0.0002) T + 2,7 (\pm 1,7) \times 10^{-7} T^2 \quad (T: K) \quad (3.2)$$

Los valores de densidad experimental y calculada se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos de la densidad experimental y calculada del polisiloxano OV1701.

T (K)	Densidad (g/mL)	Densidad (calc. g/mL)	Parámetros
303,15	1,0245	1,0246	R ² = 0.9998
313,15	1,0167	1,0165	Sy.x = 0.0004
323,15	1,0079	1,0084	
333,15	1,0009	1,0004	
343,15	0,9923	0,9924	
353,15	0,9843	0,9845	
363,15	0,9767	0,9767	
373,15	0,9689	0,9689	

Estos datos proveen la información necesaria para el cálculo correcto de la relación de fases de las columnas capilares construidas solo con el polisiloxano OV1701. Para calcular la relación de fases de las columnas construidas con mezclas de polisiloxano OV1701 y ciclodextrina es necesario determinar la variación de densidad de estas mezclas junto con la temperatura. Para ello se utilizó una mezcla con una concentración de 10 % (p/p) ($m = 0,0383$) en un rango de temperatura de 323.15-373.15 K. Los resultados obtenidos son mostrados en la Tabla 4; la ecuación de ajuste de estas densidades es la siguiente:

$$\rho_{90/10}(\text{g/mL}) = 1,19(\pm 0,13) - 0,00020(\pm 0,00008) T - 1,1(\pm 1,0) \times 10^{-6} T^2 \quad (T: \text{K}) \quad (3.3)$$

Tabla 4. Datos de la densidad experimental y calculada de la mezcla de selector quiral y polisiloxano OV1701 con una concentración de 10% (p/p).

T (K)	Densidad (g/mL)	Densidad (calc. g/mL)	Parámetros
323,15	1,0246	1,0247	$R^2 = 0.9991$
333,15	1,0156	1,0153	$Sy.x = 0.0007$
343,15	1,0063	1,0064	
353,15	0,997	0,9975	
363,15	0,9888	0,9882	
373,15	0,9777	0,9779	

Comparando las densidades calculadas para ambas fases estacionarias se halló que la densidad de la fase estacionaria con selector quiral es más densa que la fase sin selector quiral a todas las temperaturas (Figura 15). Teniendo en cuenta la ausencia de cambios en la presión entre los ensayos de las distintas fases, esta modificación en la densidad implica un aumento en la masa por unidad de volumen.

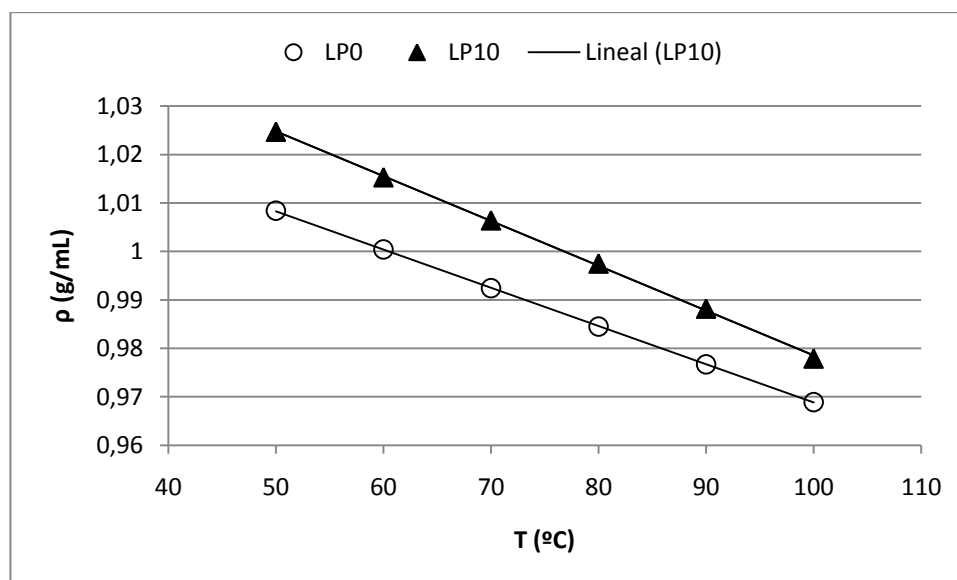


Figura 15. Variación de la densidad en función de la temperatura para las fases estacionarias LPO (sin selector quiral) y LP10 ($m=0,0383$).

Una posible hipótesis compatible con estos resultados es que el polisiloxano OV1701 y este derivado de γ -CD formen una estructura mixta tal que les permite reducir su volumen molar. Se ha observado que algunas CDs pueden incluir dentro de su estructura grandes moléculas huésped como son algunos polímeros. Al respecto, Harada y Kamachi reportaron por primera vez en 1990 la formación de complejos de inclusión entre ciclodextrinas y polímeros hidrofílicos de bajo peso molecular [136, 137]. En 2000, Okumura y colaboradores [138] encontraron mediante estudios cuantitativos que las γ -CDs son capaces de formar complejos de inclusión cristalinos con poli(dimetilsiloxano)(PDMS). Estos complejos tendrían una estequiometría 2:3 (mómonero de

PDMS: γ -CD). Estudios de patrones de difracción de rayos X y de modelado molecular indicarían que estos polímeros son capaces de penetrar la cavidad de la γ -CD adquiriendo una estructura de tipo "head-to-head channel" (Figura 16) en donde moléculas de ciclodextrina estarían ordenadas a lo largo de un eje formado por el polímero [139]. Es importante aclarar que estos estudios se realizaron trabajando con polisiloxanos cuyos pesos moleculares (MW) eran del orden de 1000 dado que en medio acuoso resulta complejo trabajar con pesos moleculares mayores. Posteriormente, Porbeni y colaboradores confirmaron por diversas metodologías la formación de esta estructura en forma túnel con PDMS de alto peso molecular (MW = 62.700). El polisiloxano utilizado en nuestro trabajo tiene un peso molecular de 50.000 [140], y en su estructura contiene un 7% de grupos fenilos y otro 7% de grupos cianopropilos.

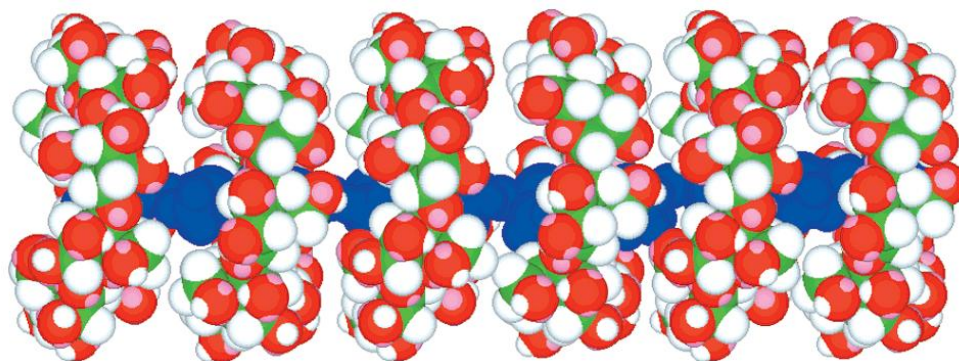


Figura 16. Estructura "head-to-head channel" formada entre ciclodextrina y el polímero polisiloxano.

No obstante esta hipótesis, se puede argumentar que la formación de complejos con estructura similar a la propuesta por Harata impediría la formación de complejos de inclusión enantiómero-CD inhabilitando el reconocimiento enantiomérico y por lo tanto la separación quiral. Al respecto, se ha demostrado que dextrinas acíclicas son capaces de producir enantio-reconocimiento y separar α -amino ácidos derivatizados y compuestos halogendos al ser utilizadas como FEQs [141, 142] asignándole un rol preponderante a la superficie polar externa de las CDs en la enantioselectividad [143], pero este enantio-reconocimiento de los carbohidratos acíclicos hacia otras familias de analitos se perdió totalmente.

2. Determinación de la relación de fases, β

La construcción de columnas capilares mediante el método estático de llenado y depósito del polímero permite conocer la relación de fases, β , la cuál puede estimarse con el mismo número de cifras significativas que t_R y t_M , generalmente cuatro. En este estudio, utilizando las ec. (1.32) y la ec. (2.2) (ver Introducción y Experimental) se logro determinar la relación de fases con cuatro cifras significativas y en el caso del espesor de film depositado, tres. Esto representa una clara ventaja del método de fabricación utilizado, dado que, si lo comparamos con la información que generalmente proveen los fabricantes de columnas comerciales estos parámetros no se informan o bien se suministran sin ninguna indicación acerca de la precisión con que fueron calculados. Los resultados para cada una de las columnas construidas en el rango de temperatura 50 – 100°C se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Características de las columnas capilares construidas.

COLUMNA LP0	0 % CD	
Concentración	4,084 mg/ml \pm 0,005	
L= 20 m	d.i.= 250 μ m	
T ($^{\circ}$ C)	β (\pm 0.2)	e.f. (\pm 0.004; μ m)
50	245,9	0,253
60	244,0	0,255
70	242,0	0,257
80	240,1	0,260
90	238,2	0,262
100	236,3	0,264
COLUMNA LP10	10,03 % CD (p/p) m= 0,0383	
Concentración	4,065 mg/ml \pm 0,005	
L= 20 m	d.i.= 250 μ m	
T ($^{\circ}$ C)	β (\pm 0.2)	e.f. (\pm 0.004; μ m)
50	251,1	0,248
60	248,8	0,251
70	246,6	0,253
80	244,4	0,255
90	242,1	0,257
100	239,6	0,260
COLUMNA LP16	16,82 % CD (p/p) m= 0,0695	
Concentración	4,874 mg/ml \pm 0,005	
L= 20 m	d.i.= 250 μ m	
T ($^{\circ}$ C)	β (\pm 0.2)	e.f. (\pm 0.004; μ m)
50	211,3	0,298
60	209,2	0,300
70	207,2	0,303
80	205,3	0,306
90	203,2	0,309
100	200,8	0,312
COLUMNA LP26	26,26 % CD (p/p) m= 0,1223	
Concentración	5,000 mg/mL \pm 0,005	
L= 20 m	d.i.= 250 μ m	
T ($^{\circ}$ C)	β (\pm 0.2)	e.f. (\pm 0.004; μ m)
50	209,2	0,304
60	206,8	0,307
70	204,7	0,309
80	202,7	0,312
90	200,3	0,315
100	197,4	0,318

3. Propiedades cromatográficas

Para evaluar si las columnas construidas eran apropiadas para su utilización se seleccionaron dos parámetros de comparación: la eficiencia cromatográfica y la asimetría de los picos. A su vez, estos parámetros fueron determinados sobre la columna comercial LIPODEX E con el objeto de tener una columna de referencia de similares características a las construidas. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6. En ella se puede observar que para el rango de temperatura utilizado la columna LP26, construida con un 26 % (p/p) de selector quiral, fue más eficiente con un promedio de 500 platos/metro por sobre los platos teóricos medidos con la columna comercial, eluyendo además picos mucho más simétricos. En la Figura 17 se comparan las eficiencias logradas con todas las columnas construidas en comparación con la columna comercial; y en la Figura 18 se muestran los cromatogramas correspondientes a n-dodecano en la columna comercial y en la columna LP26 a varias temperaturas. Cabe mencionar que en el caso de la columna comercial no se dispone de información alguna respecto del polímero usado como solvente del selector quiral, tampoco se conoce la concentración de selector en el mismo ni el espesor de film depositado en el capilar; esta información no fue suministrada por el fabricante. Inesperadamente, la columna comercial presentó una marcada asimetría, “coleo” o “tailing”, en el rango de temperaturas 60 – 100°C, aun cuando el analito inyectado es un alcano.

La asimetría de picos puede originarse a partir de una variedad de fuentes instrumentales y cromatográficas. En esta última categoría podemos encontrar uno o más de las siguientes causas: efectos extracolumna, isotermas de sorción no lineales, resolución incompleta de los componentes de la muestra, procesos de transferencia de masa lentos, reacciones químicas y la formación de “pozos” en la columna, esto es, zonas de la columna donde la fase estacionaria no cubre homogéneamente la superficie del capilar dejando al descubierto porciones de la pared interna [144-146].

Las causas más comunes de isotermas no lineales son la inyección de muestras concentradas y la existencia en la columna de zonas de adsorción energéticamente heterogéneas con constantes de asociación/disociación varios órdenes de magnitud mayor que los procesos de partición, por lo cual, aún cuando las muestras estén suficientemente diluidas para el proceso de partición, sus concentraciones están fuera de la zona lineal de las isotermas de adsorción. En particular, el “coleo” o “tailing” tiene un efecto negativo en cromatografía analítica; reduce considerablemente la resolución entre analitos, causa interferencia entre las bandas y disminuye la precisión de los resultados cuantitativos dado que hace confusa el área de localización entre los analitos separados [144]. Para el caso de mediciones de constantes de equilibrio a partir de datos de tiempos de retención, como las efectuadas en este estudio, los resultados deben obtenerse a partir de picos simétricos. Si bien se han propuesto alternativas para obtener constantes de partición a partir de picos asimétricos, estas son matemáticamente engorrosas y han sido desaconsejadas [147].

Tabla 6. Comparación de la eficiencia y la asimetría de los picos obtenidos de la inyección de C₁₂ en las columnas LP26 y LIPODEX-E.

T (°C)	Eficiencia (N/m)		Asimetría	
	LP26	LIPODEX-E	LP26	LIPODEX-E
100	1439	1088	1.057	1.556
90	1639	958	1.000	1.564
80	1477	835	1.027	1.524
70	1482	773	1.064	1.427
60	1614	731	1.184	1.296

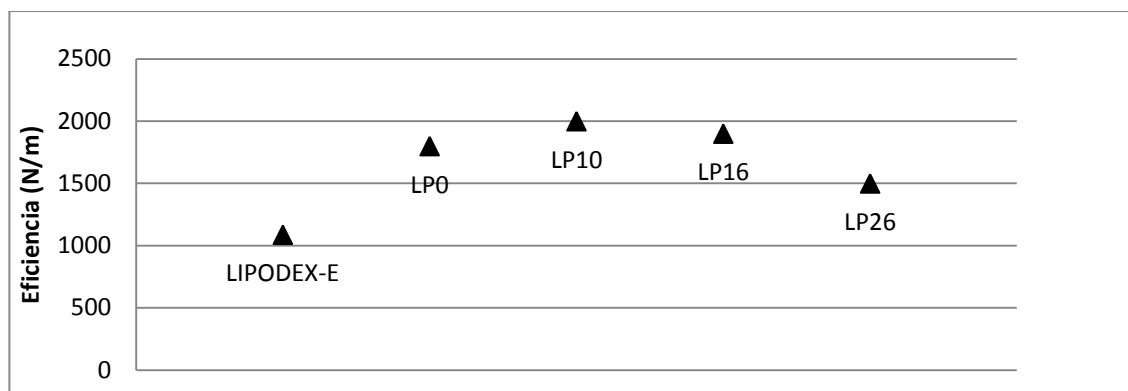


Figura 17. Eficiencias logradas en las columnas construidas en comparación con la columna comercial LIPODEX-E.

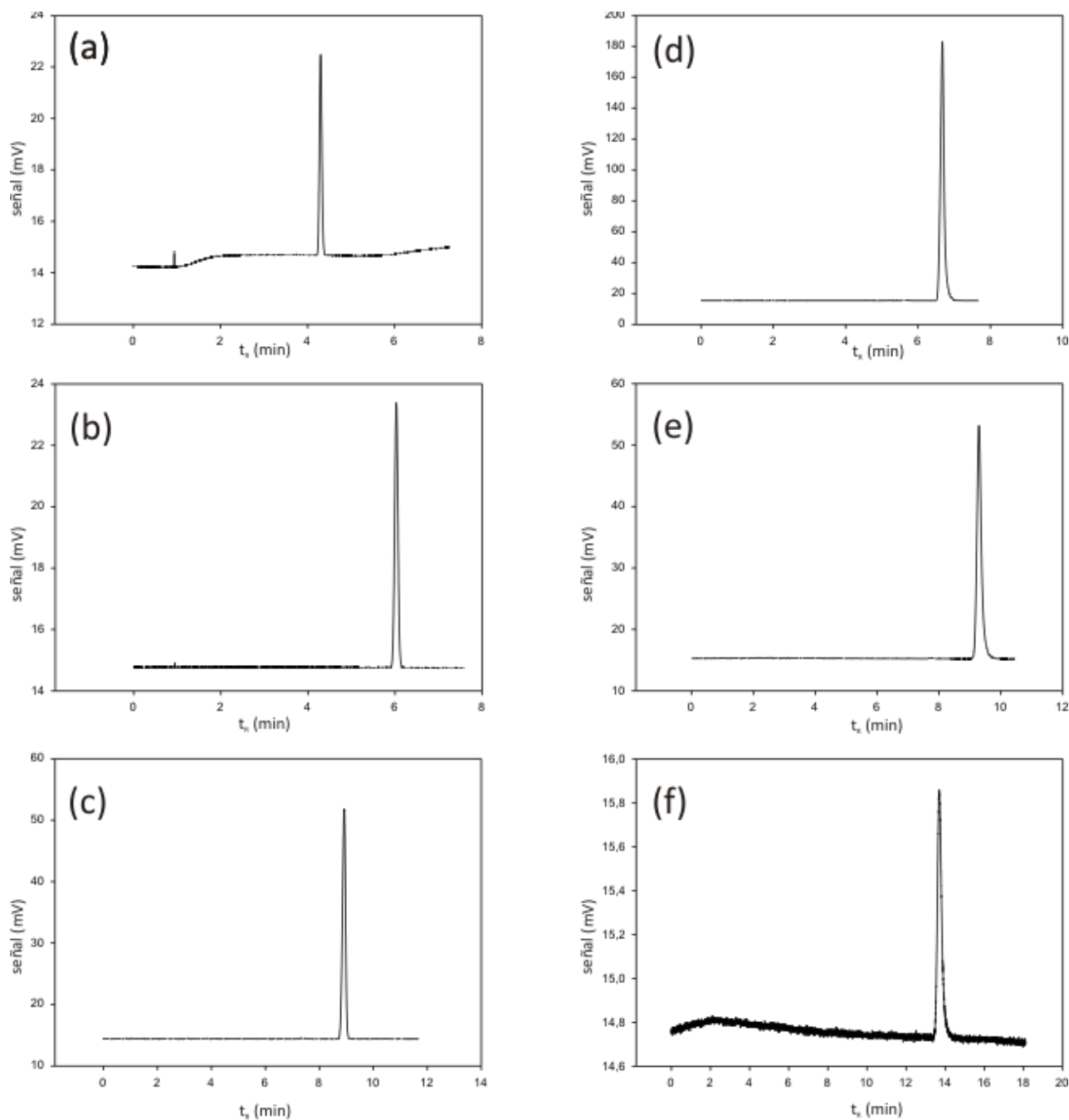


Figura 18. Cromatogramas de la inyección de n-dodecano (C_{12}) en las columnas LIPODEX-E y LP26 a distintas temperaturas. (a) LP26 – 100°C (b) LP26 – 90°C (c) LP26 – 80°C (d) LIPODEX-E – 100°C (e) LIPODEX-E – 90°C (f) LIPODEX-E – 80°C.

4. Determinación de coeficientes de partición de metano

La medición de las constantes de partición del metano, $K_{(CH_4)}$, a todas las temperaturas y en cada uno de los sistemas estudiados permitió estimar luego el tiempo muerto en cada cromatograma. Para su determinación se siguió el procedimiento descrito en los Métodos (ver Determinación de tiempo muerto); fue necesario calcular el t_M teórico a partir de una regresión por cuadrados mínimos sobre las ecuaciones no lineales (1.33), (1.34) y (1.36). Los resultados de estos ajustes y los valores de t_M obtenidos se informan en el Anexo A1.

Los resultados de t_M obtenidos de a partir del ajuste según las tres ecuaciones son muy similares entre sí, pero claramente muy diferentes del tiempo de retención del metano, aún a 100 °C. Dado que no existe un único método aceptado para la determinación del tiempo muerto, el criterio seguido aquí para seleccionar una de las ecuaciones empíricas se fundamentó en dos condiciones:

- (i) un menor error en el ajuste, $s_{y/x}$, (siendo $s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_i^*)^2}{(n - 2)}}$, y_i e y_i^* son los valores experimentales y predichos de $\ln t_{R C(n)}$ y n es el número de pares de datos), y
- (ii) que los valores calculados de K_{CH_4} a partir de los tiempos muertos obtenidos de la regresión presentasen una tendencia razonable.

En la Figura 19 se representaron los valores de $\ln K_{(CH_4)}$ obtenidos utilizando los t_M calculados a partir de las regresiones sobre las ecuaciones (1.33) y (1.36) para la columna LP10 en función de la inversa de la temperatura. Ambas representaciones muestran una tendencia creciente con la disminución de la temperatura. Los datos calculados a partir de la ecuación (1.36) mostraron sistemáticamente menores errores del ajuste para todas las columnas (ver Anexo A1). Cabe mencionar que la dispersión observada en estas gráficas no es despreciable. Se atribuye a que $K_{(CH_4)}$ es un número finito, aunque pequeño, que se obtiene de la sustracción entre dos números muy similares entre sí (t_M y $t_{R(CH_4)}$). Teniendo en cuenta el criterio impuesto arriba es que se seleccionó la ecuación (1.36) para calcular los t_M teóricos.

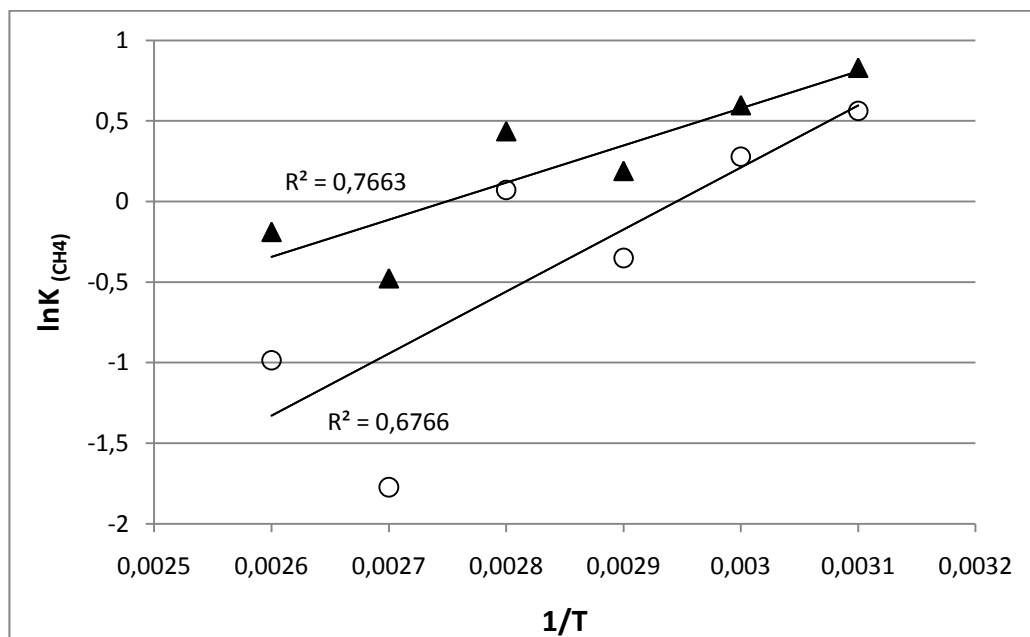


Figura 19. Gráficos de del $\ln K_{(CH_4)}$ en función de $1/T$. Los valores de $K_{(CH_4)}$ fueron calculados a partir del tiempo muerto calculado con las ecuaciones (1.33) (círculos) y (1.36) (triángulos).

Una estimación de los errores aleatorios que se cometen en la determinación de las constantes de partición ($K = k \times \beta$), indica que, comparativamente, el mayor desvío estándar relativo corresponde a los factores de retención. El desvío estándar relativo asociado a la relación de fases, β , medida con cuatro dígitos, es algo menos de un orden menor que el desvío estándar relativo en la determinación del t_M . Por otra parte, la tabla 7 muestra los errores *sistemáticos* que se cometerían en la determinación de los factores de retención de los n -alcanos a 80 °C cuando se emplea la retención del metano como medida del t_M . Los resultados indican que estos errores son significativamente más altos cuanto menor es la retención del soluto, pero aún para solutos retenidos como el decano la diferencia no es despreciable. Esta comparación permite apreciar la importancia que posee la determinación correcta del tiempo muerto en *cada una* de las experiencias cromatográficas.

Tabla 7. Errores sistemáticos al utilizar el $t_{R(CH_4)}$ como medida del t_M .

T (°C)	Alcano	t_M teórico	$t_{R(CH_4)}$	k^{*a}	k	error%
80	C5	0,811	0,817	0,054	0,062	-12,528
	C6			0,122	0,131	-6,353
	C7			0,262	0,271	-3,442
	C8			0,552	0,563	-2,038
	C9			1,153	1,169	-1,363
	C10			2,394	2,419	-1,038

$$a: k^* = \frac{[t_{R(C_nH_{2n+2})} - t_{R(CH_4)}]}{t_{R(CH_4)}}$$

5. Selectividad

Considerando los extensos estudios realizados por König y colaboradores sobre la capacidad de enantioseparación de la ciclodextrina utilizada en este trabajo hacia numerosas familias químicas [68], se seleccionaron los racematos que cumplieran con dos requisitos; (i) que fuesen separados con la columna comercial LIPODEX E y (ii) que exhibieran una enantioselectividad razonable en la columna construida con la menor concentración CD disuelta, lo que permitiría evaluar la retención de ambos enantiómeros en todo el rango de concentraciones de selector.

Tal como fuera postulado originalmente por Nowotny y colaboradores [56], se encontró que la enantioselectividad alcanzada por las columnas construidas con sistemas diluidos está fuertemente influenciada por la concentración de selector quiral disuelto en el solvente aquiral. La Figura 20 muestra valores de enantioselectividad en función de la concentración para cinco mezclas racémicas representativas. Esta gráfica explica el motivo por el cual, de los analitos enumerados en la Tabla 1, se restringieron finalmente los solutos estudiados a dieciocho. Si bien todos los solutos fueron resueltos por la columna comercial, la que se presume que posee un alto contenido de CD disuelta, varios de ellos no pudieron ser suficientemente separados por las columnas de menor concentración de selector quiral construidas para este estudio.

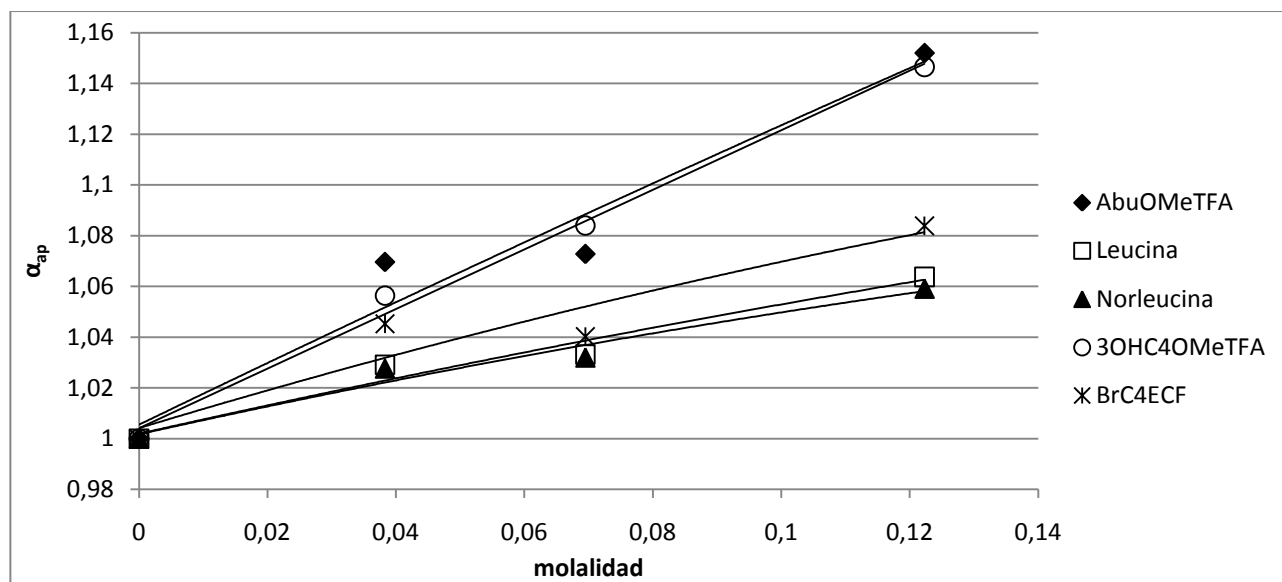


Figura 20. Dependencia de la selectividad aparente con la concentración de selector quiral disuelto para diversos racematos derivatizados. En todos los casos a 80 °C.

Como era de esperar, la columna LP26, conteniendo un 26% de selector es la de mayor capacidad de enantioconocimiento hacia todos los analitos y en todas las condiciones de temperatura ensayadas. La Tabla 8 y la Figura 21 muestran comparativamente los resultados obtenidos con algunos racematos eluidos en esta columna con los obtenidos empleando la columna comercial LIPODEX E. Se observa que en ningún caso los valores de resolución y selectividad logrados con la columna LP26 fueron superiores a los alcanzados con la columna comercial.

Tabla 8. Valores de resolución selectividad y retención comparando la columna LIPODEX E comercial y la columna LP26 construida.

Analito	T (°C)	Columna	Rs	α	k_1	k_2
2-bromopentano	60	LIPODEX E	4,1	1,20	2,217	2,650
		LP26	1	1,04	1,821	1,888
	50	LIPODEX E	4,7	1,25	4,092	5,112
		LP26	1,6	1,05	2,765	2,915
3,3,5-trimetilciclohexanona	100	LIPODEX E	10,2	1,42	3,995	5,659
		LP26	3,8	1,10	4,379	4,822
	90	LIPODEX E	10,7	1,53	7,189	11,027
		LP26	4,2	1,13	6,743	7,641
2,5-dimetoxitetrahidrofurano	60	LIPODEX E	4,8	1,19	3,185	3,802
		LP26	<0,8	1,03	4,406	4,554
	50	LIPODEX E	6,3	1,27	5,542	7,042
		LP26	1,6	1,04	6,971	7,287
4-metil-2-pentanol	60	LIPODEX E	3,2	1,14	3,218	3,673
		LP26	<0,8	1,03	3,368	3,464
	50	LIPODEX E	4,1	1,19	6,165	7,337
		LP26	1,2	1,04	5,662	5,885
1-feniletanol	100	LIPODEX E	1,8	1,10	4,401	4,842
		LP26	<0,8	1,01	9,086	9,208
	90	LIPODEX E	1,5	1,16	-	-
		LP26	<0,8	1,02	-	-

Entre todos los analitos seleccionados para ser estudiados en este trabajo se encontraban sustancias con funciones carboxílicas. Dada la reactividad de estos grupos funcionales se hizo necesario recurrir a métodos de

derivatización que permitieran su elución a temperaturas relativamente bajas y en un tiempo razonable. Tal como se describe en la sección Experimental, se compararon dos métodos de esterificación del grupo carboxilo: por reacción con cloroformiato de etilo (ECF) y empleando cloruro de hidrógeno en medio metanólico (a partir de aquí Método 1 y Método 2, respectivamente). Esto permitió realizar una evaluación de la influencia de los grupos funcionales formados sobre el enantiorreconocimiento.

Los ésteres metílicos de los analitos que fueron esterificados con el método 2 presentaron una mayor enantioselectividad en comparación con los ésteres etílicos formados a partir del ECF aunque, en este último caso, la enantioselectividad continuó siendo importante. Es de destacar que, tanto en el caso del ácido 2-bromobutírico como el ácido 2-bromoalérico, la formación del metil-éster produjo un aumento en la selectividad del 30%. En la Figura 22 se muestran los cromatogramas en los que se comparan los analitos resueltos luego de su funcionalización por ambos métodos.

No obstante las mayores enantioselectividades obtenidas para los metil-ésteres, desde un punto de vista operacional, se debe mencionar algunos aspectos no menos importantes sobre todo cuando se trabaja con un elevado número de muestras. El método 2 implica la preparación del cloruro de hidrógeno por goteo de cloruro de acetilo sobre metanol anhidro. La reacción entre ambas sustancias es fuertemente exotérmica, tóxica y peligrosa dado que si no se lleva a cabo lentamente se producen proyecciones. Esta etapa, así como la etapa de reacción entre la mezcla racémica y el reactivo derivatizante, consume mucho tiempo, más aun si luego de esta reacción es necesario evaporar el medio de reacción, que contiene agua como subproducto, para funcionalizar otro grupo químico de interés (por ejemplo, para la reacción de TFFA sobre grupos amino). Por el contrario, el método 1 es rápido y no requiere la preparación previa del reactivo así como tampoco es necesario ninguna etapa de evaporación [148].

En términos generales, de los 18 analitos seleccionados, el selector quiral, octakis-(2,6-di-O-pentil-3-O-butiril)- γ -ciclodextrina, utilizado demostró una selectividad destacada hacia aquellas sustancias que presentaran una función carboxílica como parte de su estructura. De los analitos utilizados que no presentaron dicha función química, el sistema mostró una alta selectividad hacia 3,3,5-trimetilciclohexanona sugiriendo que la presencia de un átomo de oxígeno carbonílico tiene un rol destacado. De los aminoácidos utilizados, el derivado del ácido 2-aminobutírico fue el que presentó la selectividad más importante. De los analitos inyectados cuya estructura se basa en el ácido butanoico, quien presentó la mejor selectividad fue el éster metílico del ácido 2-bromobutanoico siendo este analito, además, el mejor resuelto de todos los inyectados. En el caso del analito 1-fenil-1-etanol, la presencia del sustituyente arílico no confirió una selectividad destacable por sobre los demás analitos investigados. En el Anexo A2 se muestra de forma completa los valores de retención, selectividad y resolución logrados para todos los solutos racémicos en todas las columnas.

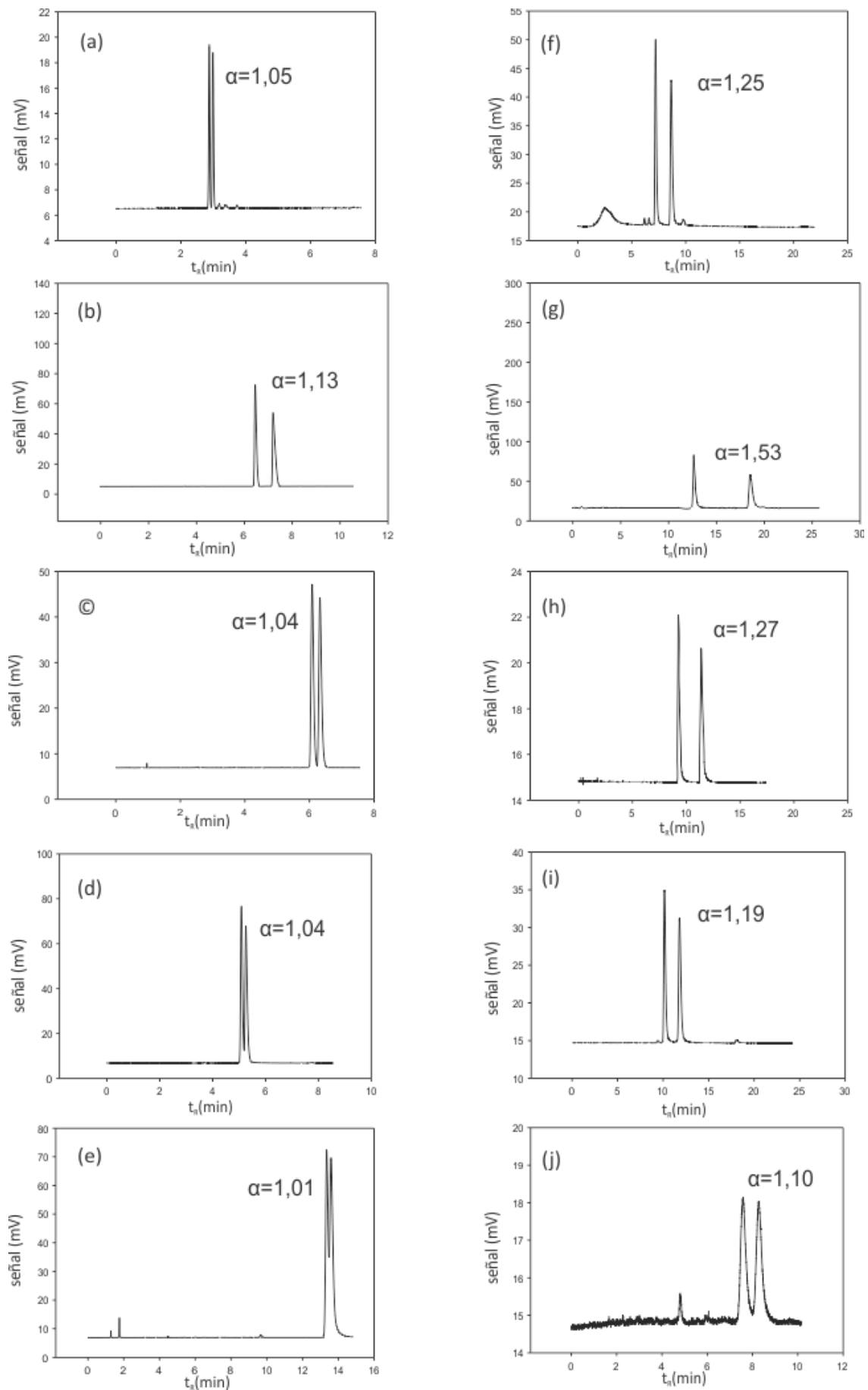


Figura 21. Cromatogramas representativos de la resolución alcanzada utilizando la columna LP26 (a)(b)(c)(d)(e) y la columna comercial LIPODEX E (f)(g)(h)(i)(j). (a)(f) 2-bromopentano-50°C, (b)(g) 3,3,5-trimeticiclohexanona-90°C, (c)(h) 2,5-dimetoxitetrahydrofurano-50°C, (d)(i) 4-metil-2-pentanol-50°C, (e)(j) 1-fenil-1-etanol-100°C.

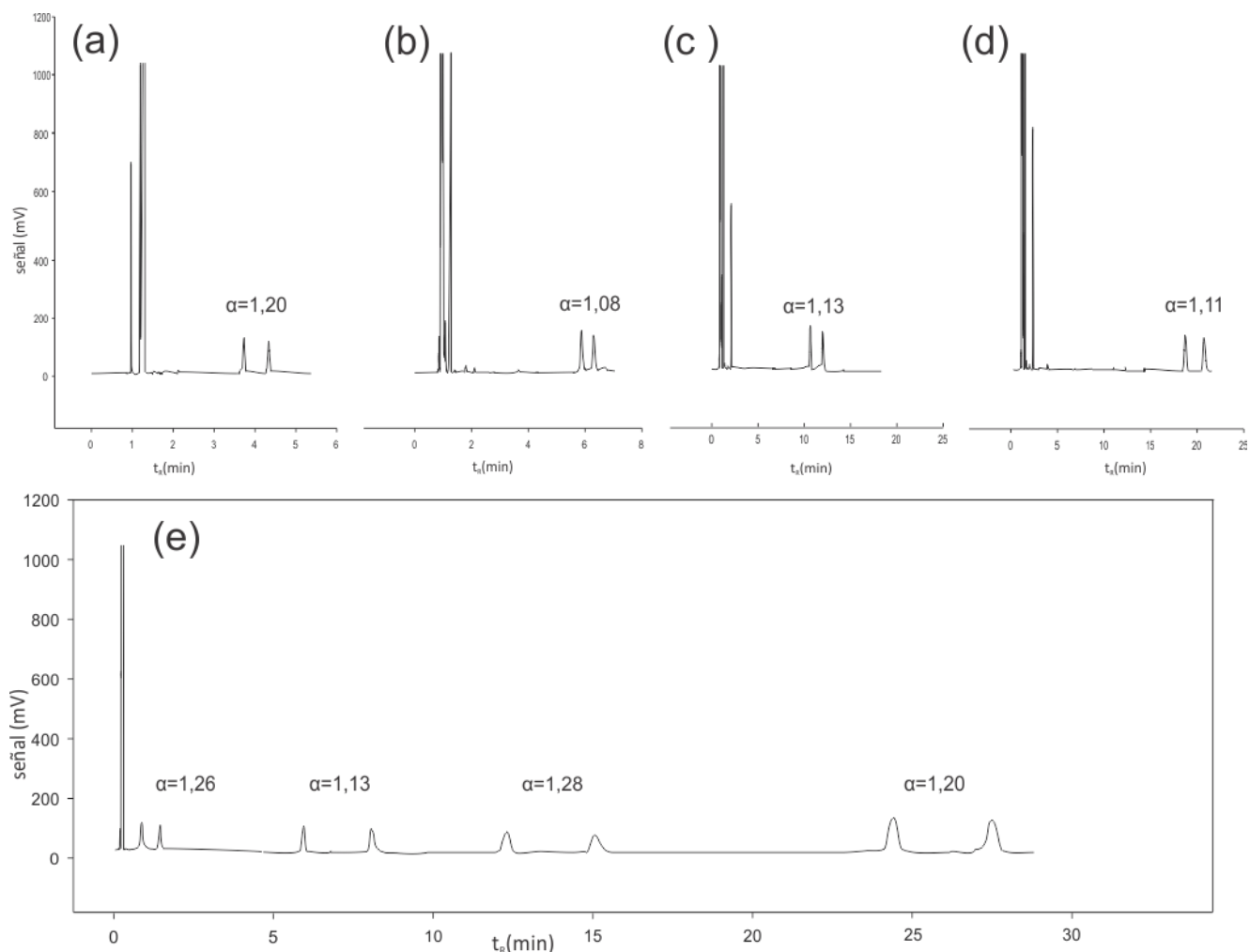


Figura 22. Cromatogramas comparativos de la enantioresolución alcanzada a 70°C utilizando dos métodos de derivatización en la columna LP26. (a) ácido 2-cloropropanoico-ECF, (b) ácido 2-bromopropanoico-ECF, (c) ácido 2-bromobutanoico-ECF, (d) ácido 2-bromoaléxico-ECF y (e) todos los analitos anteriores derivatizados con O-Me.

6. Determinación de constantes de asociación enantiómero-selector quiral. Influencia de la temperatura

La temperatura de la columna es una variable fundamental en CG. Su valor determina la retención, la selectividad y, consecuentemente, la resolución entre solutos en cualquier separación cromatográfica, y su influencia es determinante de la separación en cromatografía de gases enantioselectiva. El comportamiento usualmente observado es que tanto los factores de retención como la enantioselectividad disminuyen al aumentar la temperatura de la columna. Este comportamiento es el que se verifica también en todos los sistemas aquí estudiados, la Figura 23 muestra un ejemplo de este comportamiento.

Desde el punto de vista cromatográfico, la mejora en la enantioresolución que se logra a temperaturas relativamente bajas implica un aumento considerable en el tiempo de análisis. En estos sistemas, por ejemplo, el tiempo de retención de la mayoría de los analitos aumenta entre 5 y 10 veces al disminuir la temperatura de la columna desde 100 a 50 °C, dependiendo de sus respectivos calores de evaporación y de sus interacciones específicas con la fase líquida. Las posibles estrategias para lograr separaciones rápidas en estos casos consistirían en disminuir la longitud de la columna y/o aumentar la relación de fases disminuyendo el espesor de la película de fase estacionaria. Si bien un acortamiento en la longitud del capilar reducirá también el número de platos posibles, y como consecuencia, la enantioresolución, esta reducción en la eficiencia es usualmente

menos significativa que las mejoras en enantioselectividad alcanzadas al operar la columna a baja temperatura. Por otra parte, la reducción en el espesor de película no sólo decrecerá el tiempo de análisis sino que también aumentará la velocidad de transferencia de masa con la potencial disminución en el ancho de los picos eluidos para todos los analitos, indistintamente de sus propiedades físicas. La importancia de lograr altos valores de factores de enantioseparación es entonces evidente. En cualquier estrategia de optimización en cromatografía de compuestos quirales no solo se requiere enantioresolver una mezcla racémica, sino hacerlo en el menor tiempo de análisis posible, para lo cual es fundamental tener un conocimiento profundo de los equilibrios involucrados entre cada uno de los enantiómeros y el selector quiral disuelto en polisiloxano.

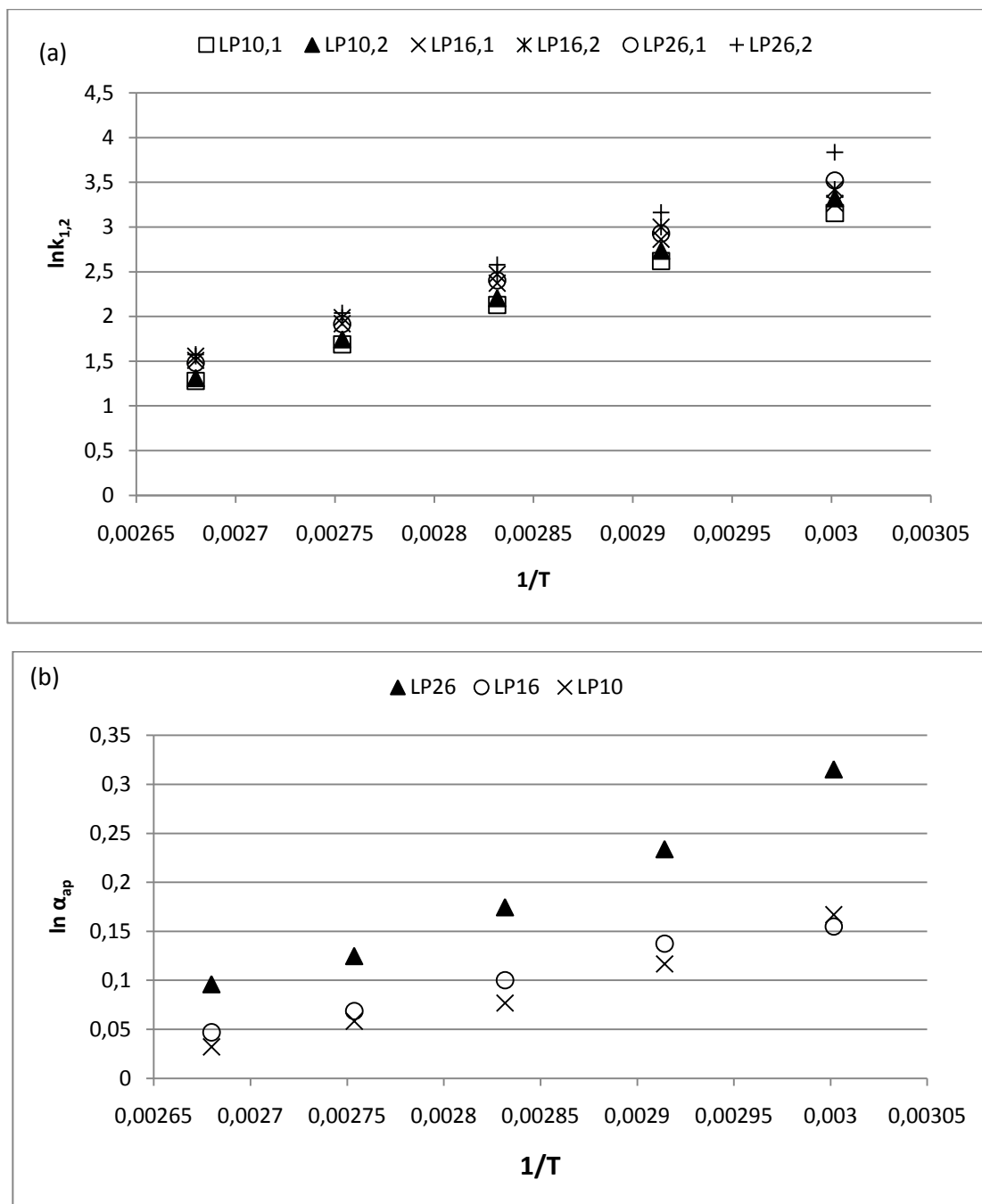


Figura 23. Dependencia de $\ln k_{1,2}$ (a) y enantioselectividad (b) con la temperatura de la columna. Solutos: 3,3,5-trimetilciclohexanona.

Las constantes aparentes de partición para cada enantiómero fueron calculadas a partir de los valores de k y β en todas las columnas y en el rango de temperaturas indicado para cada caso. Por razones eminentemente prácticas, numerosos trabajos de la literatura hacen estimaciones de una “enantioselectividad” que es

“aparente” y de funciones termodinámicas asociadas al proceso de separación quiral a partir de estas constantes aparentes. Sin embargo, cuando un selector está diluido en un solvente, el factor de separación se vuelve dependiente de la concentración de selector. Varios autores reconocen (y han determinado experimentalmente) la diferencia entre las contribuciones debidas al proceso de enantioconocimiento de aquellas contribuciones inespecíficas o no-enantioselectivas (ne), entre cada enantiómero con el entorno aquiral, cuyo componente será de igual magnitud para ambos enantiómeros. Schurig las denominó contribución “física” a la contribución no-enantioselectiva, que en estos sistemas son las interacciones con el polisiloxano OV1701, para distinguirlas de la que ellos denominaron contribución “química” y que corresponde a las interacciones enantioselectivas que hacen posible la separación.

La enantioselectividad aparente no es, en consecuencia, un parámetro de validez termodinámica, dado que los factores de retención contienen un componente no-estereoselectivo, tal como se describe en la ecuación (1.15) de la Introducción, y la consecuencia es que los valores de variación de energía libre, $\Delta(\Delta G^\circ)$, se hacen dependiente de la concentración de selector. Es evidente de la ecuación (1.15) que, cuando la retención no-enantioselectiva es importante, la selectividad “aparente” puede ser muy inferior a la enantioselectividad intrínseca al proceso de separación quiral.

Algunas alternativas han sido propuestas en la literatura para soslayar el inconveniente de determinar el verdadero factor de enantioseparación. Como se discutió en la introducción, una de estas alternativas fue propuesta por Jung y colaboradores [73], quienes adaptaron el concepto de *incremento en la retención*, R' , a la cromatografía de gases enantioselectiva, en principio empleando fases estacionarias basadas en la formación de complejos metálicos y luego implementado en sistemas conteniendo derivados de ciclodextrinas en un solvente polimérico. El valor de R' es experimentalmente accesible a partir de la medición de la retención relativa entre el analito y una sustancia estándar en una columna quiral conteniendo una dada concentración de selector en el solvente aquiral y también en una columna conteniendo solamente al solvente matriz donde solo pueden tener lugar las interacciones no-enantioselectivas. En esta aproximación, la sustancia seleccionada como estándar no debería interactuar con el selector quiral, para que los valores de R' puedan ser considerados estimaciones precisas de las respectivas constantes de asociación.

Otra alternativa la sugirieron Fornstedt y colaboradores [149, 150], quienes propusieron un método para la deconvolución de perfiles de retención de soluto en las magnitudes correspondientes a ambas contribuciones. Esta aproximación matemática fue propuesta para los enantiómeros de propranolol en una fase quiral a base de la proteína celulosa en HPLC. Para distinguir entre ambas contribuciones, los autores determinaron las isothermas de adsorción de cada enantiómero en un rango extendido de concentraciones y luego ajustaron los datos a un modelo de isoterma tipo bi-Langmuir y estimaron los parámetros del ajuste no lineal. Para este tipo de fase estacionaria, donde la cantidad de proteína ligada a la superficie es usualmente baja, y en consecuencia, el número de selectores quirales accesibles es limitado, las interacciones inespecíficas en otras regiones de la superficie de la proteína o con el soporte de sílice fueron importantes en magnitud y justificaron el uso de este sofisticado tratamiento de los datos de factores de retención.

En este estudio, a partir de las constantes aparentes calculadas en este estudio, se procedió a determinar las constantes de complejación termodinámicas (absolutas) entre los analitos y el selector quiral. Una regresión lineal de $K_{ap,i}/K_i^0$ del enantiómero i en función de la molalidad permitiría *a priori* obtener la constante de asociación entre el enantiómero y el selector directamente de la pendiente de esta regresión (ver ecuación (2.9)). Otra posibilidad consiste en obtener los parámetros de la regresión entre las $K_{ap,i}$ en función de la molalidad. Aunque sutil, este punto implica una diferencia de orden conceptual.

La presión parcial del soluto sobre la solución dentro de la zona de cumplimiento de la ley de Henry, p_1 , está determinada por:

$$p_1 = \gamma_1^\infty x_1 p_1^o \quad (3.4)$$

donde p_1^o es la presión de saturación del soluto y x_1 su fracción molar en la solución, y γ_1^∞ es el coeficiente de actividad del soluto infinitamente diluido en el polisiloxano puro. La fracción molar del soluto a dilución infinita puede escribirse como:

$$x_1 = \frac{n_1^L}{n_1^L + n_3^L} \cong \frac{n_1^L}{n_3^L} = \frac{n_1^L \vartheta_3^o}{V_L} \quad (3.5)$$

donde n_1^L y n_3^L son los moles de soluto y de fase estacionaria, respectivamente, ϑ_3^o es el volumen molar de la fase estacionaria y V_L su volumen. Por otro lado, para una fase vapor ideal,

$$p_1 V_M = n_1^M RT \quad (3.6)$$

donde n_1^M y V_M representan los moles de soluto en la fase vapor y su volumen, respectivamente. Combinando las ecuaciones (3.4), (3.5) y (3.6) y considerando que $K^o = C_L/C_M$, se obtiene la relación fundamental entre coeficiente de partición con la presión de vapor y el coeficiente de actividad del soluto infinitamente diluido en la fase líquida pura [92, 147]:

$$K^o = \frac{RT}{p_1^o \gamma_1^\infty \vartheta_3^o} \quad (3.7)$$

Utilizar la relación (K_{ap}/K^o) para realizar el ajuste lineal con la molalidad de la fase líquida implica asumir que K^o , y por lo tanto γ_1^∞ y ϑ_3^o , no modifican su valor con el agregado de ciclodextrina; lo que resulta una aproximación que necesita verificarse.

Por otra parte, en la Figuras 24 se ha representado la relación entre K_{ap} y la concentración molal de selector para algunos solutos representativos y a algunas de las temperaturas estudiadas.

Los gráficos para la mayoría de los casos fueron lineales, lo que permite inferir que la estequiometría 1:1 entre selector y soluto propuesta para los equilibrios de asociación (1.8) y (1.9) sería correcta. Se estimaron, en todos los casos, los parámetros de los ajustes lineales, los que se informan en la Tabla 9. El cociente entre la pendiente y la correspondiente ordenada al origen de estos ajustes permite estimar los valores de constantes de asociación entre cada uno de los enantiómeros y el selector quiral. Sus valores también se informan en la Tabla 9.

Dos conclusiones pueden obtenerse del análisis de estos resultados.

- (i) En principio se observa que las ordenadas al origen no son estadísticamente distintas entre sí para los dos enantiómeros de un dado racemato y tampoco exhiben diferencias significativas respecto de los correspondientes valores de constante de partición K^o medidas experimentalmente, lo que indicaría que la presencia del selector disuelto en el polímero no provoca cambios experimentalmente observables en el coeficiente de partición. Si bien se ha determinado que el volumen molar de la solución disminuye aproximadamente un 1.5% respecto del polisiloxano puro a igual temperatura, esta diferencia es muy poco significativa. También es posible que los respectivos coeficientes de actividad del soluto en las mezclas compensen esa disminución en el volumen molar del solvente mezcla. Esto es, los desvíos estándar asociados a las ordenadas al origen impiden observar diferencias estadísticamente significativas respecto de los valores experimentales de K^o .
- (ii) Los ajustes lineales exhiben una correlación aceptable (ver los R^2 en la Tabla 9), lo que implica que la actividad de la ciclodextrina en el polisiloxano puede aproximarse a su concentración molal; esto es,

dentro del error experimental, actividad y concentración molal son magnitudes proporcionales en el rango de concentración de selector estudiado.

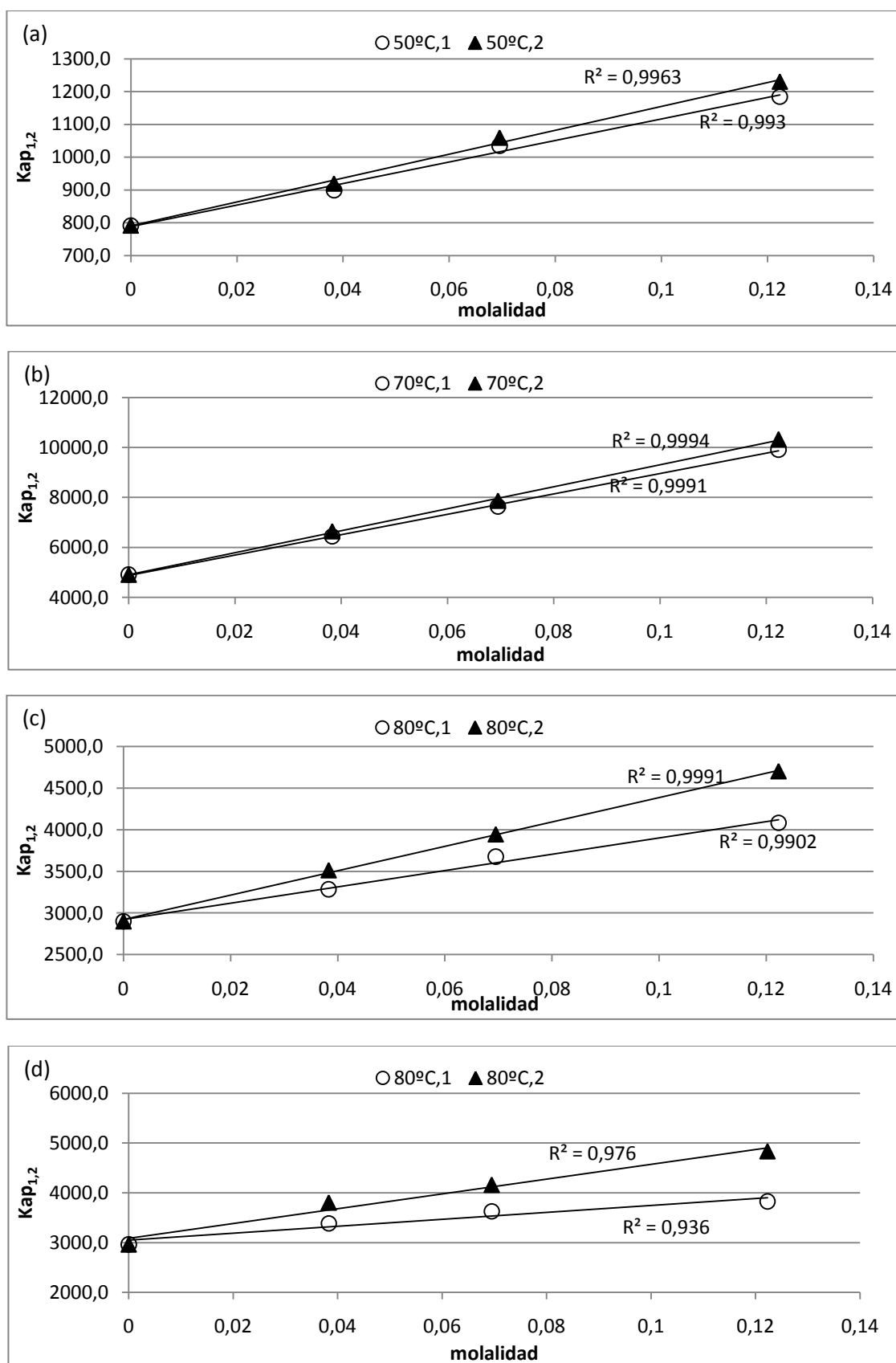


Figura 24. $Kap_{1,2}$ en función de la molalidad. **(a)** 4-metil-2-pentanol, **(b)** 1-fenil-1-etanol, **(c)** ácido 2-aminobutanoico-OMe-TFAA y **(d)** 3,3,5-trimetilciclopentanona.

Tabla 9. Resultados de la regresión por cuadrados mínimos entre $K_{p1,2}$ y molalidad, coeficientes de partición y constantes de asociación enantiomérica.

4-metil-2-pentanol

T (°C)	$K^0 \pm s(K^0)$	Enantiómero 1			Enantiómero 2			$K_1 \pm s(K_1)$	$K_2 \pm s(K_2)$
		ordenada	pendiente	R^2	ordenada	pendiente	R^2		
100	108.7 ±0.2	111 ±4	144 ±57	0.76	111 ±4	144 ±57	0.76	1.3 ±0.5	1.3 ±0.5
90	154.1 ±0.2	155 ±6	268 ±77	0.85	155 ±6	267 ±77	0.86	1.7 ±0.5	1.7 ±0.5
80	221,1 ±0.2	223 ±6	495 ±77	0.95	223 ±6	495 ±77	0.95	2.2 ±0.4	2.2 ±0.4
70	326,5 ±0.2	327 ±8	905 ±105	0.97	325 ±7	963 ±89	0.98	2.8 ±0.3	3.0 ±0.3
60	498,2 ±0.2	497 ±11	1673 ±153	0.98	494 ±13	1847 ±173	0.98	3.4 ±0.3	3.7 ±0.4
50	791,6 ±0.2	789 ±14	3278 ±195	0.99	791 ±11	3642 ±157	0.99	4.2 ±0.3	4.6 ±0.2

2-bromopentano

T (°C)	$K^0 \pm s(K^0)$	Enantiómero 1			Enantiómero 2			$K_1 \pm s(K_1)$	$K_2 \pm s(K_2)$
		ordenada	pendiente	R^2	ordenada	pendiente	R^2		
100	105.2 ±0.2	105.0	62 ±9	0.98	105.0	62 ±9	0.98	0.59	0.59
90	140.8 ±0.2	140 ±2	111 ±45	0.86	140 ±2	111 ±45	0.86	0.8 ±0.3	0.8 ±0.3
80	193.2 ±0.2	193 ±1	207 ±26	0.98	193 ±1	207 ±26	0.98	1.1 ±0.1	1.1 ±0.1
70	271.1 ±0.2	270.8	329 ±14	0.99	270.8	329 ±14	0.99	1.21	1.21
60	389.2 ±0.2	389.5	594 ±18	0.99	494 ±13	1848 ±173	0.98	1.52	1.82
50	575.9 ±0.2	577 ±4	1094 ±86	0.99	579 ±8	1375 ±179	0.98	1.9 ±0.1	2.4 ±0.3

2,5-dimetoxitetrahydrofurano

T (°C)	$K^0 \pm s(K^0)$	Enantiómero 1			Enantiómero 2			$K_1 \pm s(K_1)$	$K_2 \pm s(K_2)$
		ordenada	pendiente	R^2	ordenada	pendiente	R^2		
100	202.6 ±0.2	201 ±5	54 ±111	0.19	201 ±5	54 ±111	0.19	0.3 ±0.6	0.3 ±0.6
90	285.6 ±0.2	282 ±9	91 ±197	0.17	282 ±9	91 ±197	0.17	0.3 ±0.7	0.3 ±0.7
80	416.7 ±0.2	412 ±12	130 ±260	0.20	412 ±12	130 ±260	0.20	0.3 ±0.6	0.3 ±0.6
70	625.8 ±0.2	619 ±17	140 ±370	0.13	619 ±17	140 ±370	0.13	0.2 ±0.6	0.2 ±0.6
60	967.2 ±0.2	954 ±35	177 ±759	0.05	956 ±29	435 ±636	0.3	0.2 ±0.8	0.5 ±0.7
50	1555.7	1536 ±51	221 ±1118	0.04	1539 ±43	811 ±930	0.4	0.1 ±0.7	0.5 ±0.6

3,3,5-trimetilciclohexanona

T (°C)	$K^0 \pm s(K^0)$	Enantiómero 1			Enantiómero 2			$K_1 \pm s(K_1)$	$K_2 \pm s(K_2)$
		ordenada	pendiente	R^2	ordenada	pendiente	R^2		
100	828.2±0.2	825 ±8	1138 ±178	0.97	82 ±5	1771 ±111	0.99	1,4±0.2	2,1±0.1
90	1231.3±0.2	1229 ±6	2204±131	0.99	1236 ±12	3646 ±270	0.99	1,8±0.1	2,9±0.2
80	1879.7±0.2	1879 ±2	4629 ±54	0.99	1890 ±25	8003 ±544	0.99	2,46	4,2±0.3
70	2964.8±0.2	2981 ±42	9600±921	0.99	3019	17415	0.97	3,2 ±0.3	6±1
60	4868.6±0.2	4887 ±367	15799±5040	0.83	4892	35586	0.87	3 ±1	7±2

1-fenil-1-etanol

T (°C)	$K^0 \pm s(K^0)$	Enantiómero 1			Enantiómero 2			$K_1 \pm s(K_1)$	$K_2 \pm s(K_2)$
		ordenada	pendiente	R^2	ordenada	pendiente	R^2		
100	1169.7±0.2	1175±26	5235±356	0.99	1170±21	5430±291	0.99	4.5±0.3	4.6±0.3
90	1838.0±0.2	1833±23	9828±311	0.99	1826±29	10339±399	0.99	5.4±0.2	5.7±0.2
80	2928.4±0.2	2905±31	19803±427	0.99	2911±24	21073±324	1	6.8±0.2	7.2±0.1
70	4912.6±0.2	4881±51	40736±704	0.99	4909±68	43974±928	0.99	8.3±0.2	9.0±0.2

ácido 2-cloropropanoico-ECF

T (°C)	$K^0 \pm s(K^0)$	Enantiómero 1			Enantiómero 2			$K_1 \pm s(K_1)$	$K_2 \pm s(K_2)$
--------	------------------	---------------	--	--	---------------	--	--	------------------	------------------

		ordenada	pendiente	R ²	ordenada	pendiente	R ²		
100	215.4±0.2	215.1±0.8	221±18	0.99	215.6±0.6	324±13	0.99	1.03±0.08	1.50±0.06
90	305.6±0.2	305±2	431±34	0.99	307±3	654±72	0.98	1.4±0.1	2.1±0.2
80	445.5±0.2	446±1	869±31	0.99	451±14	1375±312	0.95	1.95±0.07	3.0±0.7
70	665.6±0.2	672±16	1554±342	0.95	685±49	2756±1068	0.87	2.3±0.5	4±2
60	1032.9±0.2	1048±39	3265±857	9.93	1083±127	6317±2763	0.84	3.1±0.8	6±3
50	1654.9±0.2	1699±112	6954±2454	0.88	1793±351	15150±7659	0.79	4±1	8±5

ácido 2-bromopropanoico-ECF

T (°C)	K ⁰ ± s(K ⁰)	Enantiómero 1			Enantiómero 2			K ₁ ± s(K ₁)	K ₂ ± s(K ₂)
		ordenada	pendiente	R ²	ordenada	pendiente	R ²		
10	349.1±0.2	348±2	482±41	0.9	348±2	482±41	0.9	1.4±0.1	1.4±0.1
90	505.3±0.2	504±3	797±76	0.9	504±1	936±26	0.9	1.6±0.2	1.85±0.0
80	751.6±0.2	751.7±0.	1587±4	1	755±9	1935±195	0.9	2.111±0.00	2.5±0.3
70	1149.4±0.	1158±22	2816±481	0.9	1167±45	3686±972	0.9	2.4±0.4	3.2±0.8
60	1824.0±0.	1849±63	5919±1369	0.9	1874±12	8152±2782	0.8	3.2±0.7	4±2
50	2996.5±0.	3071±19	12786±415	0.9	3144±37	18904±819	0.8	4±1	6±3

ácido 2-bromobutanoico-ECF

T (°C)	K ⁰ ± s(K ⁰)	Enantiómero 1			Enantiómero 2			K ₁ ± s(K ₁)	K ₂ ± s(K ₂)
		ordenada	pendiente	R ²	ordenada	pendiente	R ²		
100	606.0±0.2	605.9±0.3	814±6	0.99	605±4	921±77	0.99	1.34±0.01	1.5±0.1
90	896.8±0.2	896±3	1536±57	0.99	899±6	1914±120	0.99	1.72±0.06	2.1±0.1
80	1371.0±0.2	1376±12	3248±269	0.99	1386±37	4204±816	0.96	2.4±0.2	3.0±0.6
70	2170.0±0.2	2201±75	6177±1646	0.93	2232±155	8742±3388	0.86	2.8±0.8	4±2
60	3547.0±0.2	3640±236	14510±5146	0.88	3731±469	22343±10228	0.82	4±1	6±3

ácido 2-bromovalérico-ECF

T (°C)	K ⁰ ± s(K ⁰)	Enantiómero 1			Enantiómero 2			K ₁ ± s(K ₁)	K ₂ ± s(K ₂)
		ordenada	pendiente	R ²	ordenada	pendiente	R ²		
100	1047.6±0.2	1043±12	1494±263	0.97	1043±12	1494±263	0.97	1.4±0.3	1.4±0.3
90	1609.4±0.2	1603±16	2382±355	0.97	1608±4	2880±94	0.99	1.5±0.2	1.79±0.06
80	2548.5±0.2	2564±39	5082±845	0.97	2392±398	5854±8678	0.313	2.0±0.3	2±4
70	4185.8±0.2	4211±64	9448±1400	0.97	4265±201	13651±4391	0.91	2.2±0.3	3±1
60	7133.3±0.2	7234±276	22077±5610	0.93	7413±711	35312±15520	0.84	3.1±0.8	5±2

ácido 2-cloropropanoico-OMe

T (°C)	K ⁰ ± s(K ⁰)	Enantiómero 1			Enantiómero 2			K ₁ ± s(K ₁)	K ₂ ± s(K ₂)
		ordenada	pendiente	R ²	ordenada	pendiente	R ²		
100	141.6±0.2	144±7	130±90	0.51	142±4	207±62	0.85	0.9±0.6	1.5±0.4
90	192.0±0.2	198±8	166±115	0.51	201±10	370±138	0.78	0.8±0.6	1.8±0.7
80	273.5±0.2	282±11	409±145	0.80	289±16	844±218	0.88	1.5±0.5	2.9±0.8
70	400.7±0.2	416±16	764±224	0.85	433±32	1754±441	0.89	1.8±0.5	4±1
60	600.1±0.2	632±33	1587±446	0.86	676±76	3899±1041	0.88	2.5±0.7	6±2
50	926.9±0.2	994±67	3393±922	0.87	1109±184	8896±2529	0.86	3.4±0.96	8±3

ácido 2-bromopropanoico-OMe.

T (°C)	K ⁰ ± s(K ⁰)	Enantiómero 1			Enantiómero 2			K ₁ ± s(K ₁)	K ₂ ± s(K ₂)
		ordenada	pendiente	R ²	ordenada	pendiente	R ²		
100	228.7±0.2	235±9	238±125	0.64	233±6	323±86	0.88	1.0±0.5	1.4±0.4
90	323.5±0.2	332±12	409±165	0.75	334±13	592±174	0.85	1.2±0.5	1.8±0.5
80	470.4±0.2	484±19	783±254	0.83	488±21	1186±284	0.90	1.6±0.5	2.4±0.6

70	702.1±0.2	728±29	1539±402	0.88	740±39	2437±530	0.91	2.1±0.6	3.3±0.7
60	1080.7±0.2	1139±62	3080±849	0.87	1172±91	5154±1252	0.89	2.7±0.76	4.4±1.1
50	1718.5±0.2	1828±112	6954±1539	0.91	1908±188	12108±2582	0.92	3.8±0.88	6±1

ácido 2-bromobutanoico-OMe.

T (°C)	K ⁰ ± s(K ⁰)	Enantiómero 1			Enantiómero 2			K ₁ ± s(K ₁)	K ₂ ± s(K ₂)
		ordenada	pendiente	R ²	ordenada	pendiente	R ²		
100	398.7±0.2	408±16	318±224	0.50	412±18	546±244	0.71	0.8±0.5	1.3±0.6
90	579.0±0.2	600±28	562±390	0.51	607±31	1160±426	0.79	0.9±0.7	1.9±0.7
80	865.0±0.2	901±43	1360±593	0.72	918±55	2819±752	0.88	1.5±0.7	3.1±0.8
70	1332±0.2	1395±68	3217±930	0.86	1440±107	6964±1464	0.92	2.3±0.7	5±1
60	2121.8±0.2	2247±128	7474±1763	0.90	2366±244	17382±3353	0.93	3.3±0.8	7±2
50	3508.7±0.2	3806±295	17766±4040	0.90	4238±742	44829±10176	0.91	5±1	11±3

ácido 2-bromoaléxico-OMe

T (°C)	K ⁰ ± s(K ⁰)	Enantiómero 1			Enantiómero 2			K ₁ ± s(K ₁)	K ₂ ± s(K ₂)
		ordenada	pendiente	R ²	ordenada	pendiente	R ²		
100	700.8±0.2	724±33	255±459	0.13	724±34	560±472	0.41	0.4±0.6	0.8±0.7
90	1053.1±0.2	1088±56	658±767	0.27	1096±59	1365±813	0.59	0.6±0.7	1.2±0.7
80	1633.7±0.2	1695±86	1715±1186	0.51	1722±103	3479±1412	0.75	1.0±0.7	2.0±0.8
70	2609.9±0.2	2714±129	4614±1772	0.77	2788±185	9495±2540	0.88	1.7±0.7	3.4±0.9
60	4331.5±0.2	4548±246	11501±3379	0.85	4773±442	25393±6062	0.90	2.5±0.8	5±1
50	7483.9±0.2	7958±491	29506±6752	0.91	8687±1193	70606±16371	0.90	3.7±0.9	8±2

ácido 2-bromohexanoico-OMe

T (°C)	K ⁰ ± s(K ⁰)	Enantiómero 1			Enantiómero 2			K ₁ ± s(K ₁)	K ₂ ± s(K ₂)
		ordenada	pendiente	R ²	ordenada	pendiente	R ²		
100	1298.4±0.2	1318±51	-800±1105	0.34	1288±26	2214±577	0.94	-0.6±0.8	1.7±0.4
90	2018.1±0.2	1998±51	3360±1104	0.90	2003±39	4285±854	0.96	1.7±0.6	2.1±0.4
80	3246.2±0.2	3224±57	6263±1243	0.96	3236±25	8628±554	0.99	1.9±0.4	2.7±0.1
70	5393.3±0.2	5370±58	12248±1271	0.99	5408±37	18416±810	0.99	2.3±0.2	3.4±0.2
60	9355.6±0.2	9332±57	26789±1243	0.99	9450±244	43788±5318	0.98	2.9±0.1	4.6±0.6

ácido 3-hidroxitbutanoico-OMe-TFAA

T (°C)	K ⁰ ± s(K ⁰)	Enantiómero 1			Enantiómero 2			K ₁ ± s(K ₁)	K ₂ ± s(K ₂)
		ordenada	pendiente	R ²	ordenada	pendiente	R ²		
100	293.3±0.2	302±21	455±467	0.49	300±17	585±381	0.70	2±2	2±1
90	425.7±0.2	438±31	962±672	0.67	439±34	1316±750	0.76	2±2	3±2
80	638.8±0.2	658±48	2059±1055	0.79	660±54	3007±1186	0.87	3±2	5±2
70	962.5±0.2	1013±129	4771±2822	0.74	1017±140	7428±3045	0.86	5±3	7±3
60	1525.0±0.2	1638±287	10969±6259	0.75	1639±289	18839±6317	0.90	7±4	11±4
50	2506.5±0.2	2785±709	25753±15467	0.73	2769±666	49326±14546	0.92	9±6	18±7

ácido 2-aminobutanoico-OMe-TFAA

T (°C)	K ⁰ ± s(K ⁰)	Enantiómero 1			Enantiómero 2			K ₁ ± s(K ₁)	K ₂ ± s(K ₂)
		ordenada	pendiente	R ²	ordenada	pendiente	R ²		
100	1081.5±0.2	1095±37	1477±511	0.81	1096±33	2277±449	0.93	1.3±0.5	2.1±0.4
90	1734.0±0.2	1752±51	3871±699	0.94	1754±42	5828±572	0.98	2.2±0.4	3.3±0.3
80	2899.3±0.2	2922±50	9801±688	0.99	2922±23	14664±310	0.99	3.4±0.2	5.0±0.1
70	5042.3±0.2	5078±35	23449±487	0.99	5100±127	35941±1743	0.99	4.6±0.1	7.0±0.4
60	9213.2±0.2	9283±94	60490±1296	0.99	9393±373	96288±5120	0.99	6.5±0.2	10.2±0.7

leucina-OMe-TFAA

T (°C)	K ⁰ ± s(K ⁰)	Enantiómero 1			Enantiómero 2			K ₁ ± s(K ₁)	K ₂ ± s(K ₂)
		ordenada	pendiente	R ²	ordenada	pendiente	R ²		
100	2626.0±0.2	2606±50	3485±1091	0.91	2599±69	4112±1516	0.88	1.3±0.4	1.6±0.6
90	4483.5±0.2	4421±160	7802±3497	0.83	4428±140	9575±3061	0.91	1.8±0.8	2.2±0.7
80	8062.5±0.2	7966±247	17813±5384	0.92	7988±190	22336±4142	0.97	2.2±0.7	2.8±0.5

norleucina-OMe-TFAA

T (°C)	K ⁰ ± s(K ⁰)	Enantiómero 1			Enantiómero 2			K ₁ ± s(K ₁)	K ₂ ± s(K ₂)
		ordenada	pendiente	R ²	ordenada	pendiente	R ²		
100	3220.0±0.2	3192±70	4486±1527	0.90	3184±90	5155±1970	0.87	1.4±0.5	1.6±0.6
90	5524.2±0.2	5451±187	9701±4082	0.85	5460±163	11685±3555	0.92	1.8±0.8	2.1±0.7
80	9967.9±0.2	9852±294	21520±6418	0.92	9878±229	26896±4999	0.97	2.1±0.7	2.7±0.5

A continuación se analizan comparativamente los valores de constantes de asociación entre los distintos solutos y sus valores en relación con la constante de partición de cada soluto entre la fase vapor y el polímero OV1701. En la Figura 25 se compara en detalle los valores de K_i de los distintos solutos a una temperatura constante (70°C). Los valores demuestran que la presencia de un grupo aromático como sustituyente en la molécula de soluto (1-feniletanol) prácticamente duplica las constantes de equilibrio para la complejación. Sin embargo esta estabilidad adicional se atribuye a una interacción de tipo no estereoselectiva dado que los complejos formados con ambos enantiómeros son más estables que el resto de los solutos; como consecuencia, la capacidad de enantiodiscriminación del selector octakis-(2,6-di-O-pentil-3-O-butiril)-γ-ciclodextrina no se ve favorecida.

Muy diferentes son los equilibrios de complejación de los ésteres de ácidos carboxílicos. Los valores de K₁ de cualquiera de los metil-ésteres de los ácidos 2-bromocarboxílicos son sistemáticamente algo menores que los correspondientes K₁ de los etil-ésteres, esto es, el grupo metileno adicional le confiere una estabilidad extra al primer enantiómero de estos etil-ésteres; pero los valores de K₂ son mayores para los ésteres metílicos, indicando que estas interacciones específicas (debidas a los grupos -OCH₃ y -OCH₂CH₃) sí son estereoselectivas y es esta diferencia la que resulta en una mayor enantioseparación de los ésteres metílicos respecto de los etil-ésteres. Venema y colaboradores observaron el mismo para la complejación de los 2-bromo y 2-clorocarboxílicos con per-pentil-β-CD [151] y para los complejos formados con permetil-β-CD [152]. Una comparación similar puede realizarse entre los valores de K₁ y K₂ de los ésteres del ácido 2-cloropropanoico respecto de los ésteres del ácido 2-bromopropanoico: K₁ de los dos ésteres (metílico y etílico) del ácido 2-bromopropanoico es algo mayor que la de los ésteres del ácido 2-cloropropanoico, pero la estabilidad del segundo enantiómero de cada par es mayor cuando el sustituyente en el carbono 2 es el átomo de cloro respecto del átomo de bromo. En este caso, las mediciones de enantioselectividad empleando perpentil y permetil-β-CD arrojaron valores mayores para el ácido 2-bromopropanoico respecto del 2-cloropropanoico [151, 152]. También es este un ejemplo de interacción enantioselectiva entre el átomo de halógeno unido al carbono 2 y el selector quiral. Las mismas conclusiones podrían obtenerse del análisis de constantes a cualquiera de las otras temperaturas.

Si se realiza un análisis comparativo entre los valores de constantes para la partición (K⁰) desde la fase vapor al polisiloxano OV1701 respecto de las constantes de asociación (K_i) se observa claramente que estas últimas son entre dos y tres órdenes de magnitud menores. Esta gran diferencia en las constantes condiciona la enantioselectividad experimental (ver ecuación (1.15)). Esto es, las interacciones no-enantioselectivas con el medio aquiral perjudican significativamente al proceso de separación: la selectividad experimental aumenta desde 1 (en el polisiloxano puro) en forma asintótica hasta un valor constante e independiente de la concentración de selector, la que corresponde a la enantioselectividad absoluta, por lo que, en lo posible, es deseable que estas interacciones aquirales sean poco significativas. Varios autores han discutido la influencia que tiene el polímero empleado para disolver diferentes derivados de ciclodextrinas sobre la enantioresolución

de distintos racematos [153, 154]. Con muy pocas excepciones, estos estudios revelaron que manteniendo la misma concentración de selector quiral, el empleo de solventes poliméricos de baja o nula polaridad resulta en sistemas selector/solvente con mayor capacidad de enantioconocimiento.

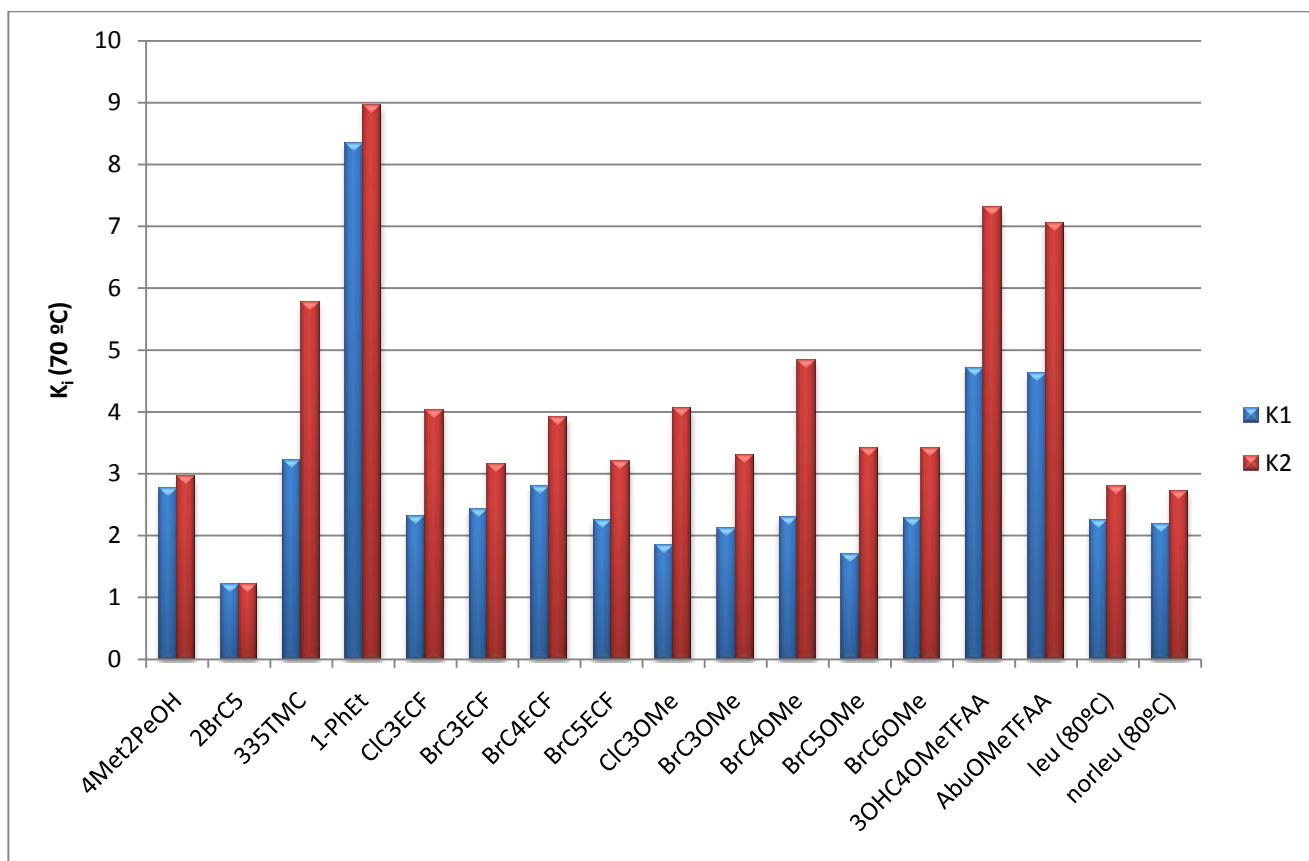


Figura 25. Comparación de valores de constantes de asociación (K_i) a 70 °C entre cada enantiómero y octakis-(2,6-di-O-pentil-3-O-butiril)- γ -ciclodextrina.

Por ejemplo, Dietrich y colaboradores [155] compararon OV-1701-vi con SE-30 (PDMS) y SE-52 (5% fenil 95% dimetilpolisiloxano) como solventes aquirales para 2,3-dimetil-6-*tert*-butildimetilsilil- β -CD y concluyeron que las soluciones de CD disueltas en los polímeros menos polares SE-30 y SE-52 proveían mayores factores de enantioselectividad que las disueltas en OV-1701-vi. Kobor y Schomburg [156], encuentran que con columnas preparadas con CDs disueltas en polisiloxanos polares, se obtienen picos menos anchos y por lo tanto mejores eficiencias a bajas temperaturas, comparadas con las preparadas con CDs disueltas en polisiloxanos poco polares, esto se atribuye a una mayor solubilidad de las CDs, lo cual permite la utilización a bajas temperaturas. Sin embargo, estos autores también encontraron mejores enantioselectividades para soluciones en PDMS OV-1 o SE-30 cuando los analitos no son muy volátiles y la separación debe hacerse a temperaturas superiores a 100°C. Experimentos de RMN llevados a cabo por König y colaboradores [44] han sido contradictorios: con heptakis(3-O-acetil-2,6-di-O-pentil)- β -CD en presencia de ésteres quirales, se observaron importantes diferencias en el desplazamiento químico debido a asociaciones diastereoméricas cuando se emplearon solventes no polares. Sin embargo, experimentos similares con el selector dimetil-6-*tert*-butildimetilsilil- β -CD, no mostraron diferencias en los desplazamientos químicos con ninguno de los solventes utilizados. Osorio Grisales y colaboradores [133, 134] compararon columnas conteniendo 30% permetil- β -CD en los polímeros SE-30, SE-54 y en Carbowax 20M. Las tres columnas fueron preparadas con el mismo espesor de película. Se halló que las mayores enantioresoluciones se alcanzaron con la columna cubierta con permetil- β -CD en SE-54, y algunos pares de enantiómeros no resueltos en las demás columnas fueron satisfactoriamente resueltos en este sistema; la enantioselectividad para el 2,5-dimetoxitetrahidrofurano fue mayor en la columna con SE-30, mientras que 3,3,5-trimetilciclohexanona fue mejor separada en la columna conteniendo Carbowax 20M.

Estos antecedentes indican la importancia que tiene la elección del solvente polimérico empleado en la disolución del selector. Si las condiciones de enantioseparación más favorables consisten en emplear altas concentraciones de selector quiral y bajas temperaturas de separación, el polímero acquiral, en primer lugar, debe ser un buen solvente que permita preparar estas soluciones altamente concentradas del selector quiral a fin de maximizar la enantioselectividad, permitiendo además que el sistema selector/solvente se mantenga homogéneo a temperaturas relativamente bajas. Otra propiedad del polímero altamente deseable es que su tensión superficial sea apropiada para el cubrimiento de la superficie del capilar de sílice. Los polisiloxanos poseen una viscosidad y tensión superficial favorables para el completo cubrimiento del interior de los capilares y, en consecuencia, estos polímeros han sido los polímeros de elección para incrementar las eficiencias alcanzadas con las columnas conteniendo estas fases estacionarias. Por otra parte, las moléculas de la mayoría de los derivados de CD poseen una polaridad relativamente alta que limita la cantidad que es posible disolver en polisiloxanos apolares o poco polares. Es por esto que estos selectores son generalmente disueltos en polisiloxanos moderadamente polares, entre ellos el más usado ha sido OV-1701 (polidimetilsiloxano con grupos fenilos y principalmente grupos cianopropilos). Aunque recientemente se ha comprobado en nuestro laboratorio [134] que las soluciones de OV1701 con 20% de permetil- β -CD no es homogénea a temperaturas relativamente bajas, lo que dá lugar a picos excesivamente anchos a estas temperaturas. En este trabajo de tesis, se optó por OV1701 por su propiedad como solventes hacia el octakis-(2,6-di-O-pentil-3-O-butiril)- γ -ciclodextrina. König y colaboradores han utilizado soluciones de este selector hasta concentraciones del 50% (p/p) en OV-1701 [157].

Un criterio adicional en la selección del polímero debería ser la de *minimizar las interacciones no-específicas* con los enantiómeros a separar por sus efectos negativos. En primer lugar, estas interacciones disminuyen muchas veces en forma significativa la separación enantioespecífica, y en numerosos casos impidiendo la enantioresolución de bandas hasta la línea de base.

En la Figura 26 se comparan los valores de enantioselectividad aparente obtenidos en la columna LP26, y calculadas de los cromatogramas, con los valores de enantioselectividad absoluta, estimada del cociente entre las constantes de asociación de cada enantiómero con el selector quiral. El gráfico claramente indica las enormes diferencias que pueden existir entre estas dos cantidades. Desde el punto de vista analítico, es evidente que con aquellos solutos cuyas interacciones no-específicas son relativamente altas, se requerirá aumentar la concentración de selector quiral a fin de compensar estas diferencias.

Una segunda consecuencia (negativa) de la existencia de fuertes interacciones no-enantioselectivas, es el aumento de los tiempos de retención (y la consecuente disminución en la altura de los picos) en proporción prácticamente proporcional a los valores de K° .

Sobre el eje derecho del gráfico se representó el número de platos teóricos efectivos, N_{ef} , que serían necesarios para lograr una resolución entre los enantiómeros de 1 unidad para los solutos aquí estudiados, si las selectividades fuesen las absolutas. En solo dos casos se requerirían unos 1000 platos efectivos; columnas de unos pocos metros (y, en consecuencia, con tiempos de análisis muy reducidos) serían suficientes para lograr la separación.

6.1. Modelo del incremento de la retención

Schurig propuso estimar los valores de constantes de asociación enantiómero/selector quiral empleando una sustancia de referencia, la que hipotéticamente no interaccionara con el selector. Este modelo ha sido profusamente usado para estudiar numerosos sistemas de CG quiral. Con el objeto de comparar nuestros resultados con las estimaciones realizadas según el modelo de incremento de la retención se calcularon los valores de R'_i de cada analito usando como referencia a los alcanos de C7 a C10 en las columnas con distintas

cantidades de selector en fase estacionaria y a todas las temperaturas. Como ejemplo, algunos de los resultados de R'_1 en la columna LP26 y a 70 °C para todos los solutos se reunieron en la Tabla 10, donde se puede observar claramente que los valores dependen de la sustancia de referencia elegida.

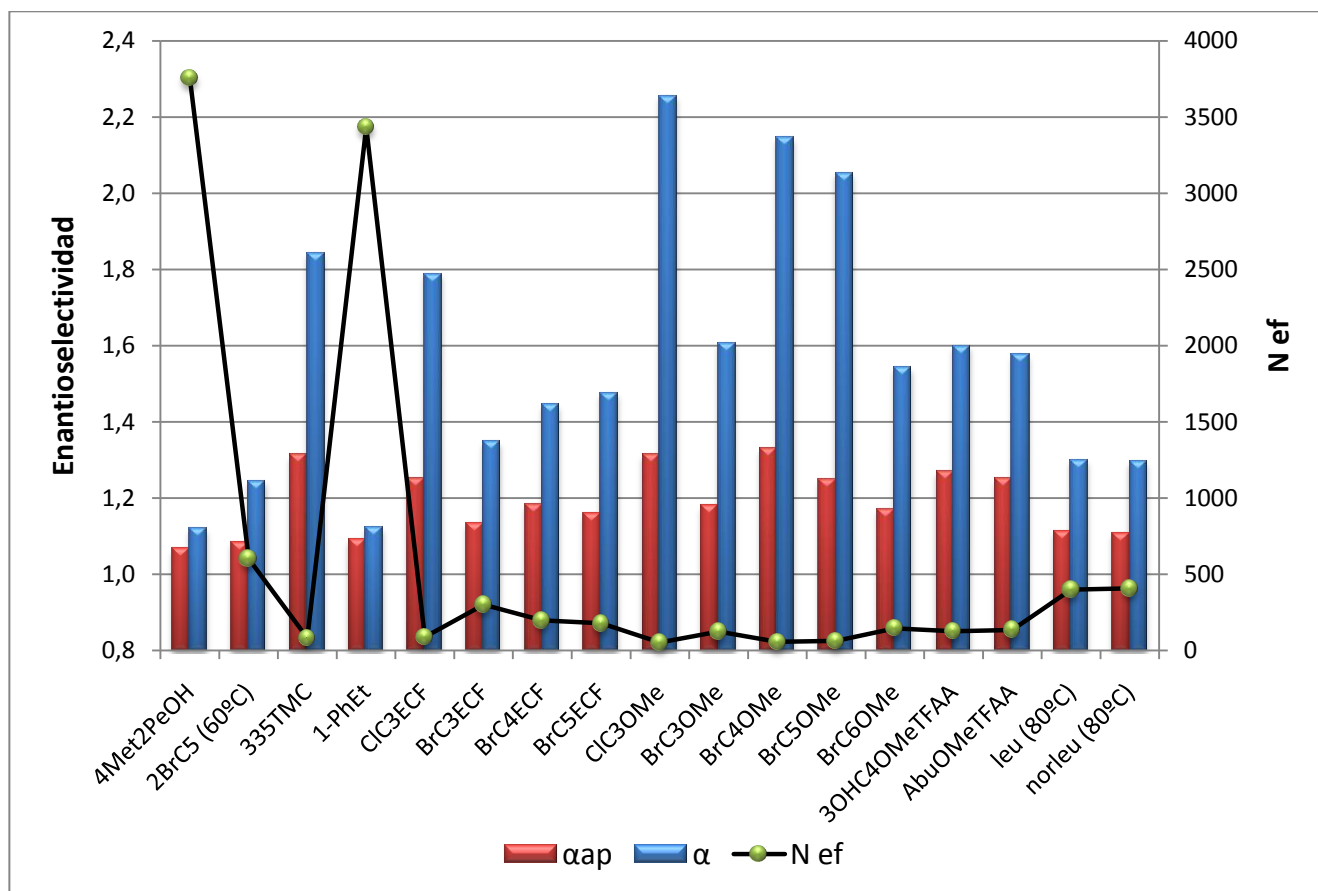


Figura 26. Gráfico de enantioselectividades absolutas y aparentes obtenidas con la columna conteniendo 26% de selector y a 70°C (eje izquierdo) y número de platos efectivos requeridos para lograr enantioresoluciones iguales a 1.0 (eje derecho).

La formación de complejos de inclusión entre n-alcános con permetil- β -CD fue tempranamente observada por Casu y colaboradores [48] quienes aislaron a estos complejos en estado sólido y estudiaron su comportamiento térmico. También Schurig y colaboradores [73, 96] admitieron que los n-alcános no son totalmente inertes a la presencia de algunos derivados de ciclodextrinas. Los valores por ellos obtenidos de R' fueron dependientes del n-alcáno usado como referencia, y las diferencias en R' podían llegar a un 10%. Estas diferencias o incluso mayores también son observadas en los sistemas aquí estudiados. A partir de los valores de incremento de retención R'_1 y R'_2 se realizó una regresión en función de la concentración de selector en el polisiloxano, y las pendientes de estas regresiones, que deberían ser una estimación de K_i , se usaron para estimar las enantioselectividades según este modelo. En las dos últimas columnas de la Tabla 10 se ejemplifican los resultados de enantioselectividad que se obtendrían empleando a n-octano y n-decano como sustancias de referencia, respectivamente. Las diferencias entre ellos son significativas. Cabe mencionar que en todos los casos, las enantioselectividades absolutas calculadas a partir de las constantes K_i fueron algo mayores que las estimadas del modelo de incremento de la retención, lo cual es un claro indicio de la existencia de algún tipo de interacción de estos alcános con el selector quiral presente en la fase estacionaria.

A nuestro entender, esta aproximación empleando una sustancia de referencia no es aceptable a fin de estimar las propiedades termodinámicas correspondientes a la asociación enantiómero/selector.

Tabla 10. Valores de incremento de la retención R_1 para el primer enantiómero eluido del par utilizando como estándares de referencia los n-alcenos de C7 a C10. Enantioselectividades estimadas del modelo de incremento de la retención.

Soluto	C7	C8	C9	C10	$\alpha(=R_2/R_1)^a$	$\alpha(=R_2/R_1)^b$
2M4PeOH	0.71	0.68	0.65	0.63	1.04	1.044
2-Br-C5	0.21	0.19	0.17	0.16	1.17	1.20
335TMC	0.66	0.63	0.61	0.58	1.68	1.71
1-PhEtOH	1.59	1.55	1.51	1.47	1.07	1.07
ClC3ECF	0.49	0.46	0.44	0.42	1.63	1.67
BrC3ECF	0.49	0.46	0.44	0.42	1.26	1.28
BrC4ECF	0.55	0.52	0.50	0.48	1.38	1.41
BrC5ECF	0.44	0.41	0.39	0.37	1.36	1.39
ClC3OMe	0.59	0.56	0.54	0.52	1.71	1.75
BrC3OMe	0.63	0.60	0.58	0.56	1.34	1.36
BrC4OMe	0.67	0.64	0.62	0.60	1.70	1.74
BrC5OMe	0.56	0.53	0.51	0.49	1.56	1.60
BrC6OMe	0.41	0.38	0.36	0.35	1.42	1.46
3OHC4OMeTFAA	0.70	0.66	0.64	0.62	1.60	1.63
AbuOMeTFAA	1.02	1.02	1.02	1.02	1.40	1.41
leu (80°C)	0.47	0.45	0.43	0.41	1.20	1.21
norleu (80°C)	0.46	0.44	0.42	0.40	1.19	1.20

a: soluto de referencia: n-octano

b: soluto de referencia: n-decano

6.2. Influencia de la temperatura

La dependencia entre la constante de asociación del soluto i (K_i) con la temperatura puede expresarse según la siguiente ecuación fundamental:

$$\ln K_i = -\frac{\Delta H_i^\circ}{RT} + \frac{\Delta S_i^\circ}{R} \quad (3.8)$$

donde R la constante universal de los gases, T la temperatura absoluta, ΔH_i° y ΔS_i° son, respectivamente, los cambios en entalpías y entropías molares debidos al proceso de asociación entre i y el selector quiral. Combinando la expresión anterior con el factor de enantioselectividad α ($= K_2/K_1$, donde 1 y 2 se refiere al orden de elución de los enantiómeros) y la relación de Gibbs-Helmholtz, se puede escribir que:

$$-\Delta_{D,L}(\Delta G) = -\Delta_{D,L}(\Delta H) + T\Delta_{D,L}(\Delta S) = RT \ln(\alpha) \quad (3.9)$$

donde $\Delta(\Delta G^\circ)$, $\Delta(\Delta H^\circ)$ y $\Delta(\Delta S^\circ)$ expresan, respectivamente, las diferencias en el cambio de energía libre, de entalpía y de entropía para la asociación de cada enantiómero con el selector quiral disueltos en el polisiloxano. Si estas cantidades son independientes de la temperatura, que es usualmente el caso, del gráfico de $(\ln \alpha)$ vs $(1/T)$ se puede obtener fácilmente $\Delta(\Delta H^\circ)$ y de la diferencia con $\Delta(\Delta G^\circ)$ se puede calcular $\Delta(\Delta S^\circ)$.

Desde un aspecto fisicoquímico, $\Delta(\Delta H^\circ)$ es una medida de las interacciones relativas entre cada enantiómero al transferirse desde la solución en polisiloxano al selector quiral con el que forma un complejo metaestable. El término entrópico, $\Delta(\Delta S^\circ)$, es una medida del cambio en el estado de orden inducido por la interacción específica entre cada enantiómero y el selector quiral. Valores negativos de $\Delta(\Delta H^\circ)$ indican una asociación más exotérmica para el enantiómero preferencialmente complejoado con el selector quiral. Valores negativos de $\Delta(\Delta S^\circ)$ pueden interpretarse como un aumento en el orden o una pérdida en los grados de libertad asociados al

proceso de enantioconocimiento. Usualmente, la formación de asociaciones intermoleculares altamente ordenadas conlleva una pérdida significativa de los grados de libertad y, en consecuencia, representan un proceso termodinámicamente desfavorable. Esta pérdida de entropía puede compensarse (al menos parcialmente) por el proceso de desolvatación parcial que ocurre como consecuencia de la formación del complejo enantiómero-selector en equilibrios de complejación en los que el solvente tiene una participación activa. En las situaciones en que este proceso de desolvatación domina, $\Delta(\Delta S^\circ)$ será positivo y, entonces, el proceso de enantioseparación se favorece al aumentar la temperatura.

De la ecuación (3.9) surge que si $\Delta(\Delta H^\circ)$ y $\Delta(\Delta S^\circ)$ poseen el mismo signo, deberá existir una temperatura en la cual las contribuciones al reconocimiento quiral de origen entálpicas y entrópicas se compensen mutuamente. Esta temperatura, llamada temperatura de isoelución, T_{iso} , será igual a $\Delta(\Delta H^\circ)/\Delta(\Delta S^\circ)$; cuando se alcance dicha temperatura, los enantiómeros coeluyen. Koppenhöfer [158] predijo que más allá de dicha temperatura ocurre una inversión en el orden de elución entre ambos enantiómeros, y la enantioseparación aumenta al aumentar más la temperatura, lo cual ha sido experimentalmente confirmado en CG [159-162]. Desde un punto de vista práctico, y trabajando con columnas quirales empleando un fluido supercrítico como fase móvil, Stringham y colaboradores [163] propusieron modificar la naturaleza química del solvente fuerte usado como eluyente con el objetivo de disminuir las usualmente altas temperaturas de isoelución y controlar las separaciones en el intervalo de temperaturas donde la entropía domina la separación. Esta región de temperaturas tendría la ventaja de lograr mejoras en las eficiencias por una mejora en la cinética de transferencia de masa y, además, una disminución en el tiempo de análisis.

Numerosos estudios sobre el efecto de la temperatura fueron descritos también en HPLC usando varias fases estacionarias quirales, incluyendo ciclodextrinas ligadas a sílice [164]. También en cromatografía líquida usualmente se observa que tanto los factores de retención como la enantioselectividad siguen una relación de van't Hoff clásica, aunque también en HPLC se han informado más ejemplos de separaciones entrópicamente controladas [150, 164-168].

Las propiedades termodinámicas de complejación entre los enantiómeros entre solución y el selector quiral disuelto en fase estacionaria ΔH°_i y los respectivos $\Delta(\Delta H^\circ)$ fueron calculados a partir de una regresión por cuadrados mínimos de las constantes de asociación y de los factores de enantioselectividad con la inversa de la temperatura absoluta, respectivamente, y $\Delta(\Delta S^\circ)$ se obtuvo de la diferencia entre energía libre y entalpía según:

$$\Delta H^\circ_i = -R \partial \ln K_i / \partial (1/T) \quad (3.10)$$

$$\Delta(\Delta H^\circ) = -R \partial \ln \alpha / \partial (1/T) \quad (3.11)$$

$$\Delta(\Delta S^\circ) = [\Delta(\Delta H^\circ) - \Delta(\Delta G^\circ)]/T \quad (3.12)$$

donde todos los parámetros han sido ya definidos. En estas ecuaciones se consideró que las funciones termodinámicas obtenidas son independientes de la temperatura. Un tratamiento más riguroso, como el propuesto por Clarke y Glew (ver Introducción) fue también realizado; sin embargo, el error asociado a la primera derivada del cambio de entalpía con la temperatura fue de magnitud similar al parámetro obtenido de la regresión no lineal. Esto es, en el rango de temperaturas entre 50 y 100°C, los errores asociados a las mediciones de K_i impiden observar una dependencia entre $\ln K_i$ y $(1/T)$ distinta de la linealidad. Las gráficas de la Figura 26 muestran unos pocos ejemplos de esta dependencia.

Las funciones termodinámicas deducidas en estas ecuaciones no son propiedades "aparentes". Las interacciones no-enantioselectivas que contribuyen a la retención de los analitos en estos sistemas han sido aisladas y las constantes de equilibrio de asociación, calculadas mediante las ecuaciones (3.10), (3.11) y (3.12)

resultaron ser independientes de la concentración de selector. Los resultados obtenidos a partir de estas regresiones se informan en la Tabla 9.

En la Tabla 11 se observa que los valores de diferencias en entalpías para el proceso de complejación de todos los enantiómeros con el selector quiral son negativos. También los valores de $\Delta(\Delta H^\circ)$ son negativos y en unos pocos casos son prácticamente cero.

Dado que las variaciones entrópicas del proceso de complejación no se obtienen por mediciones independientes, sino por diferencia, sus valores individuales deben considerarse como estimaciones semi-cuantitativas y no como mediciones exactas de esta función. Esto es, debe aclararse que las afirmaciones que se realicen a partir de estos valores, se basan en la observación de un gran número de sistemas, cuyos valores individuales no pueden considerarse exactos pero que en el conjunto poseen un comportamiento con una tendencia dada en una misma dirección.

En la Figura 28 se representaron los valores de $\Delta\Delta H^\circ$ en función de $T\Delta\Delta S^\circ$ a 70°C de todas las mezclas racémicas. Se observa en el gráfico que las enantioseparaciones en estos sistemas son dominadas por la diferencia en las entalpías de asociación, y la magnitud de las contribuciones entrópicas a la energía libre, desfavorables al proceso de discriminación, están sistemáticamente relacionadas a las diferencias entálpicas. El coeficiente de correlación entre estas magnitudes para todos los solutos es de 0.95. Existe, entre este grupo de moléculas, una excepción: el 2-bromopentanoato de metilo, para el cual la contribución entrópica es aparentemente de mayor magnitud que la entálpica. Sin embargo, el desvío estándar asociado a la pendiente de $\ln \alpha$ vs. $(1/T)$ es del mismo orden que la magnitud $\Delta\Delta H^\circ$ y que $T\Delta\Delta S^\circ$, el cual se obtiene por diferencia.

De estos valores puede observarse que la T_{iso} para estos solutos está por encima del rango de temperaturas estudiado.

Los valores de $\Delta(\Delta H^\circ)$ miden la *diferencia* entre las interacciones entre cada enantiómero y el selector quiral presente en la solución. El enantiómero más retenido del par tiene valores más negativos de ΔH_i° sugiriendo una mayor magnitud para las interacciones atractivas con el selector quiral. Esto es, podría suponerse que el enantiómero más retenido del par formará un complejo más estable debido a interacciones más fuertes con el derivado de ciclodextrina comparado al enantiómero menos retenido. Esto podría explicar también los valores negativos de $\Delta(\Delta S^\circ)$; el enantiómero más retenido por el selector quiral adquiere una conformación más rígida producto de estas interacciones más fuertes respecto del enantiómero menos retenido con una disminución mayor en la entropía de complejación. Así, los ésteres del 2-cloropropiónico son mejor discriminados que los correspondientes al 2-bromopropiónico debido principalmente a diferencias entálpicas; las diferencias estructurales entre estas dos moléculas son principalmente dos: el 2-clorocarboxilato posee un sustituyente (halógeno) de menor tamaño y el momento dipolar de la molécula es mayor. Nuestros resultados podrían indicar que la mayor discriminación enantiomérica podría deberse a interacciones dipolares con el borde exterior de la cavidad. Para las CD nativas se han informado valores de momentos dipolares entre 13 y 20 D dependiendo de la CD [169]. Si bien no se conocen datos de propiedades eléctricas de las CD derivatizadas, es de suponer que la reacción de los grupos -OH disminuya significativamente la magnitud de este vector. Aún así, puede esperarse que la presencia de grupos éter y éster alternados en octakis-(2,6-di-O-pentil-3-O-butiril)- γ -ciclodextrina produzcan una orientación definida de cualquier molécula polar con la que interaccionen. Interacciones de tipo electrostáticas también podrían explicar las diferencias en interacciones entre los ésteres metílicos (más polares) que los correspondientes ésteres etílicos del mismo ácido carboxílico.

Cabe mencionar que el equilibrio entre 2-cloropropionato de metilo y octakis-(2,6-di-O-pentil-3-O-butiril)- γ -ciclodextrina pura ha sido informado en la literatura. Se ha reportado un $\Delta\Delta G^\circ$ de 560 cal/mol, valor muy similar al medido en este trabajo. En cambio el valor de $\Delta\Delta H^\circ$ anteriormente informada es de 3.3 kcal/mol, un 90% mayor que el valor medido aquí [169].

Respecto de la participación que tendría la inclusión del enantiómero en el interior de la cavidad en el proceso de enantioconocimiento podría inferirse a partir de los 2-bromocarboxilatos de metilo que al aumentar la longitud de la cadena alquílica aumentan las interacciones de tipo van der Waals hasta una dada longitud (C5); la introducción de un metileno adicional provoca una disminución importante de ambos ΔH_i° . A partir de estos resultados es posible inferir que la porción no polar de la molécula es acomodada en el interior de la cavidad, un aumento en la longitud de la cadena, aumenta las interacciones dispersivas con el interior de la cavidad de la CD, resultando en menor libertad de movimiento para la porción polar emergente, esto hasta llegar a un tamaño máximo, a partir del cual se excede el tamaño disponible para alojar a la porción no polar de la molécula. Es claro que estas hipótesis deberían ser corroboradas por estudios espectroscópicos.

Se podría postular, *a priori*, la existencia de una correlación entre las contribuciones a la retención (energía libre asociada a la retención) y el grado de discriminación quiral, suponiendo que al aumentar la retención de ambos enantiómeros, debería incrementarse la separación entre ellos. Schurig y colaboradores introdujeron el concepto de "factor de reconocimiento quiral", [28] $\chi = -\Delta(\Delta G^\circ) / -\Delta G_i^\circ$, cuyo valor permite estimar la relación entre capacidad de enantioconocimiento y fuerza de las interacciones enantioselectivas en cromatografía de gases. El concepto aplicado a un grupo de moléculas quirales intenta hallar si existe una correlación entre estas magnitudes. Más allá del concepto, los autores reportaron valores de χ que resultaron completamente aleatorios para un grupo de éteres cíclicos separados en una columna quiral conteniendo un quelato de Ni(II).

La hipótesis acerca de una posible correlación entre retención y enantioselectividad para los sistemas en estudio en esta tesis fue evaluada en gráficos de $-RT \ln K_2$ vs. $\Delta(\Delta G^\circ)$. La Figura 29 indica claramente que no existe correlación alguna cuando se incluyen todos los analitos. Estos resultados están de acuerdo con los informados en la literatura empleando columnas con complejos metálicos [28], y permiten afirmar que la presunción intuitiva de que el proceso de enantioconocimiento requiere de una fuerte interacción con el selector quiral no es correcta. El proceso de reconocimiento quiral es químicamente muy sutil y no parece estar directamente relacionado con la magnitud ni el tipo de interacciones entre analito y selector. Varios ejemplos indican que pequeñas interacciones entre un enantiómero y selector quiral pueden dar lugar a importantes valores de enantioselectividad y viceversa. En estos sistemas, por ejemplo, la magnitud de la constante de complejación de los racematos de 1-feniletanol y los derivados de 3-hidroxi-butírico y aminobutírico es superior a la del resto de los solutos (triángulos blancos) dando lugar a una mayor retención en la columna, sin embargo, esta mayor retención para estos compuestos no contribuye en absoluto a incrementar la enantioselectividad. Por el contrario, el valor más alto de enantioselectividad observado entre estos analitos corresponde al éster metílico del ácido 2-cloropropiónico ($-\Delta\Delta G^\circ = 2.3$ kJ/mol a 70°C), siendo que los complejos formados con el selector son de los menos estables.

Finalmente, cabe mencionar que las interacciones que dan lugar a las enantioselectividades resultantes son sumamente débiles, por lo que resultan en una fuerte dependencia del $\ln \alpha$ con la temperatura. La Figura 30 reúne valores de $\Delta\Delta H^\circ$ en función de los factores de enantioseparación obtenidos a 60°C (línea continua y puntos) y a 50°C (triángulos y línea discontinua). Se observa una tendencia, especialmente a la temperatura menor ($R^2 = 0.54$): $\Delta\Delta H^\circ$ es mayor cuanto mayor es el valor del factor de enantioselectividad indicando que las interacciones de cada enantiómero con la CD que llevan a la discriminación son muy débiles y un aumento en la energía rotacional y/o vibracional por el aumento en la temperatura disminuye drásticamente la fijación del enantiómero en su conformación favorable, disminuyendo así su enantioselectividad.

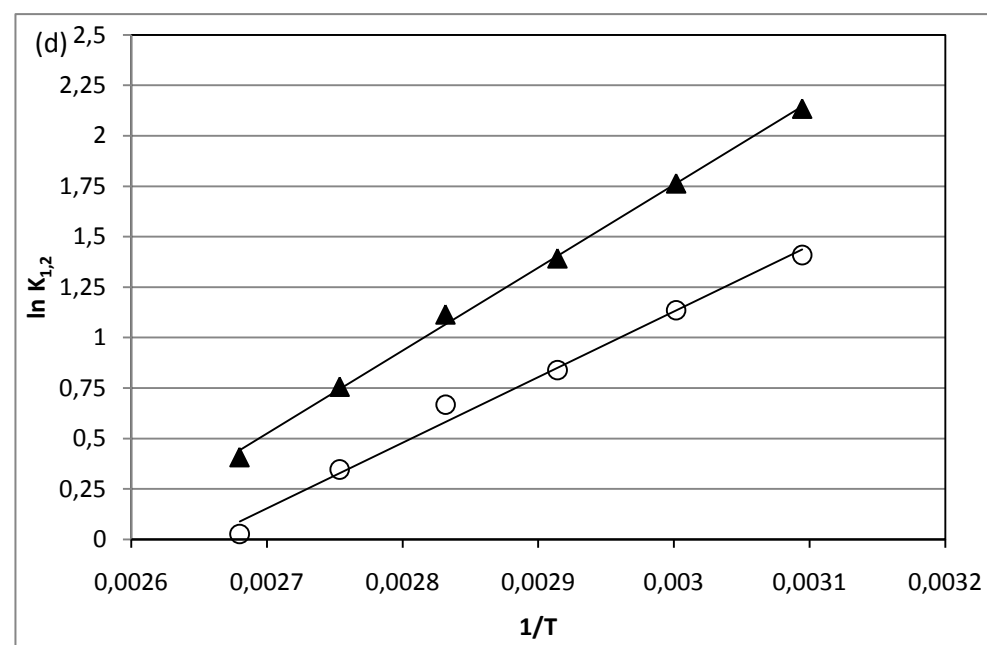
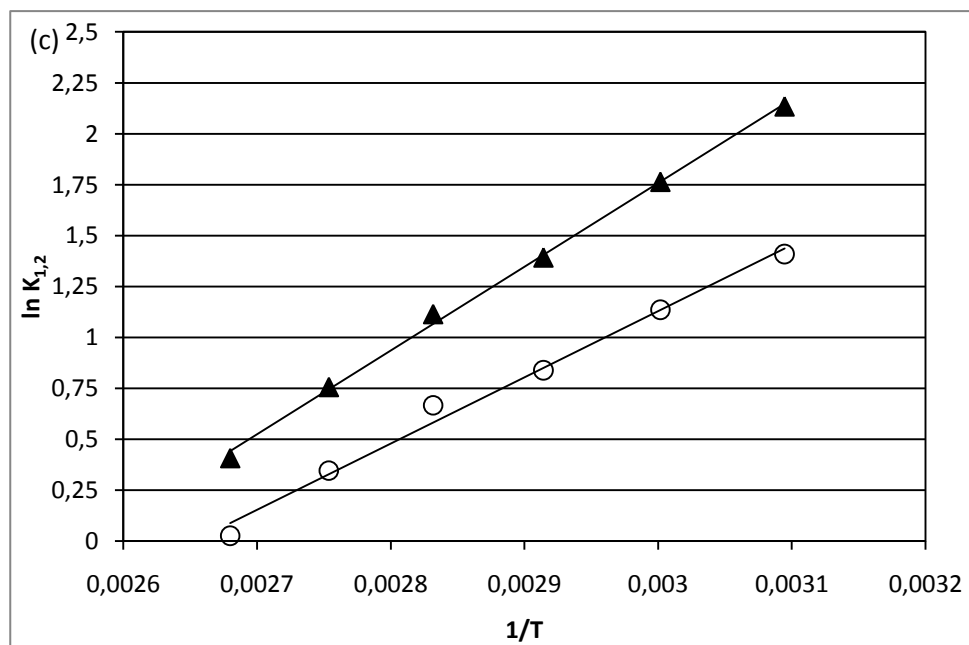
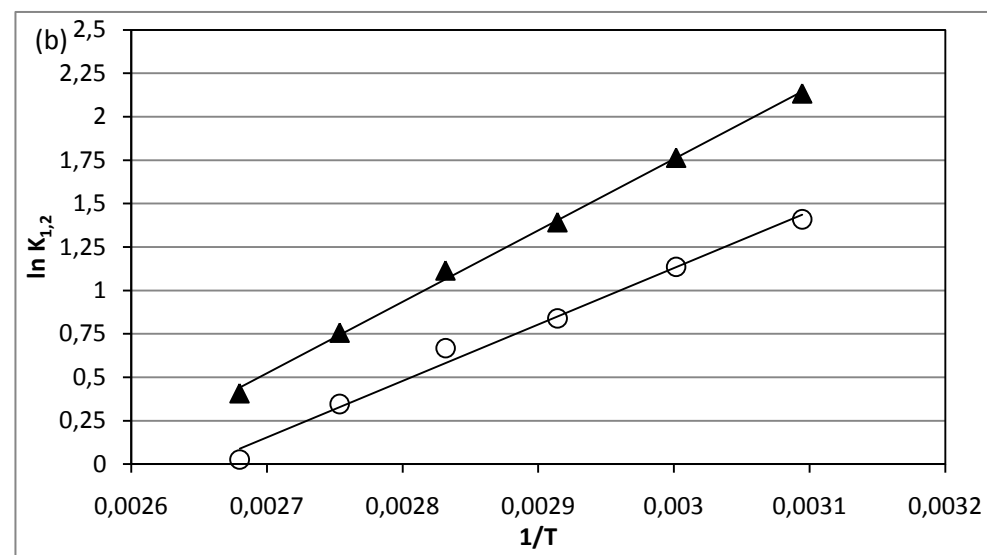
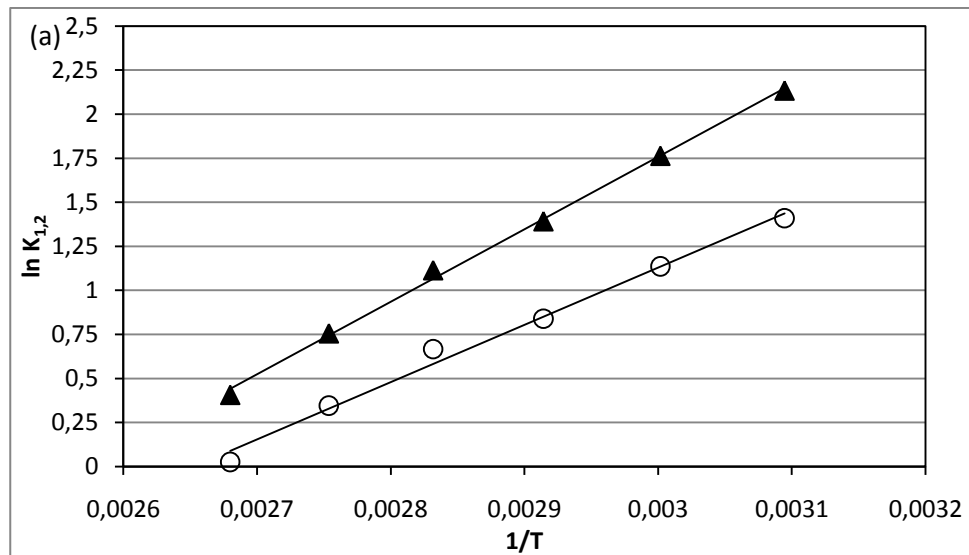


Figura 27. Gráficas de Van't Hoff para los analitos (a) ClC3ECF, (b) BrC3ECF, (c) BrC3OMe y (d) BrC4OMe.

Tabla 11. Propiedades termodinámicas correspondientes a la complejación entre enantiómero y el selector quiral Lipodex E.

Soluto	$-\Delta H_1^\circ$ ^a ($\pm s$) ^b	$-\Delta H_2^\circ$ ^a ($\pm s$) ^b	$-RT \ln K_1$	$-RT \ln K_2$	$-T(\Delta S_1^\circ)$ ^d	$-T(\Delta S_2^\circ)$ ^d	$\Delta(\Delta G^\circ)$ ^e	$\Delta(\Delta H^\circ)$ ($\pm s$)	$-T\Delta(\Delta S^\circ)$
2M4PeOH	-23(± 1)	-26(± 1)	-2,90	-3,10	-20,2	-22,6	-0,19	-2,6($\pm 0,5$)	2,4
2-Br-C5	-23(± 2)	-28(± 1)	-0,55	-0,55	-22,1	-27,0	0,00	-5(± 1)	4,9
335TMC	-24(± 4)	-32(± 2)	-3,34	-5,00	-20,2	-27,2	-1,66	-9(± 2)	7,0
1-PhEtOH	-22,7($\pm 0,7$)	-23,7($\pm 0,6$)	-6,05	-6,26	-16,6	-17,4	-0,20	-1,0($\pm 0,1$)	0,8
C1C3ECF	-25(± 1)	-33,3($\pm 0,7$)	-2,39	-3,97	-23,0	-29,4	-1,58	-7,2($\pm 0,6$)	5,6
BrC3ECF	-23(± 1)	-28(± 1)	-2,54	-3,28	-20,5	-24,9	-0,75	-6,7($\pm 0,9$)	5,9
BrC4ECF	-27(± 2)	-34(± 2)	-2,94	-3,90	-24,3	-30,0	-0,95	-7,0($\pm 0,5$)	6,1
BrC5ECF	-20(± 12)	-31(± 1)	-2,31	-3,32	-17,7	-27,7	-1,01	-11(± 1)	9,9
C1C3OMe	-29(± 5)	-37(± 2)	-1,73	-3,99	-27,7	-32,6	-2,26	-7(± 3)	4,9
BrC3OMe	-27($\pm 0,5$)	-30,6($\pm 0,4$)	-2,14	-3,40	-24,5	-27,2	-1,26	-4,3($\pm 0,2$)	3,0
BrC4OMe	-38(± 2)	-43(± 2)	-2,38	-4,50	-35,5	-38,2	-2,11	-6(± 2)	3,4
BrC5OMe	-47(± 3)	-48(± 2)	-1,51	-3,50	-46,0	-44,2	-1,98	-1(± 1)	-1,3
BrC6OMe	-18(± 1)	-26(± 1)	-2,35	-3,50	-15,5	-22,4	-1,14	-8,0($\pm 0,2$)	6,9
3OHC4OMeTFAA	-37(± 1)	-44,7($\pm 0,8$)	-4,42	-5,67	-32,4	-39,0	-1,26	-7,9($\pm 0,4$)	6,6
AbuOMeTFAA	-40(± 3)	-41(± 2)	-4,36	-5,57	-35,8	-35,2	-1,21	-1,6($\pm 0,5$)	0,4
leu (80°C)	-28(± 2)	-31(± 2)	-2,30	-2,93	-25,9	-28,3	-0,65	-3,3($\pm 0,6$)	2,7
Norleu (80°C)	-24(± 1)	-29(± 2)	-2,23	-2,86	-22,0	-25,7	-0,64	-4,6($\pm 0,4$)	4,0

a: los subíndices 1 y 2 se refieren al orden de elución de los enantiómeros.

b: desvíos estándar de ΔH_1° y ΔH_2°

c: valores a 70 °C

d: calculado como $(\Delta G^\circ - \Delta H^\circ)$

e: calculado de $-RT \ln \alpha$ (70 °C)

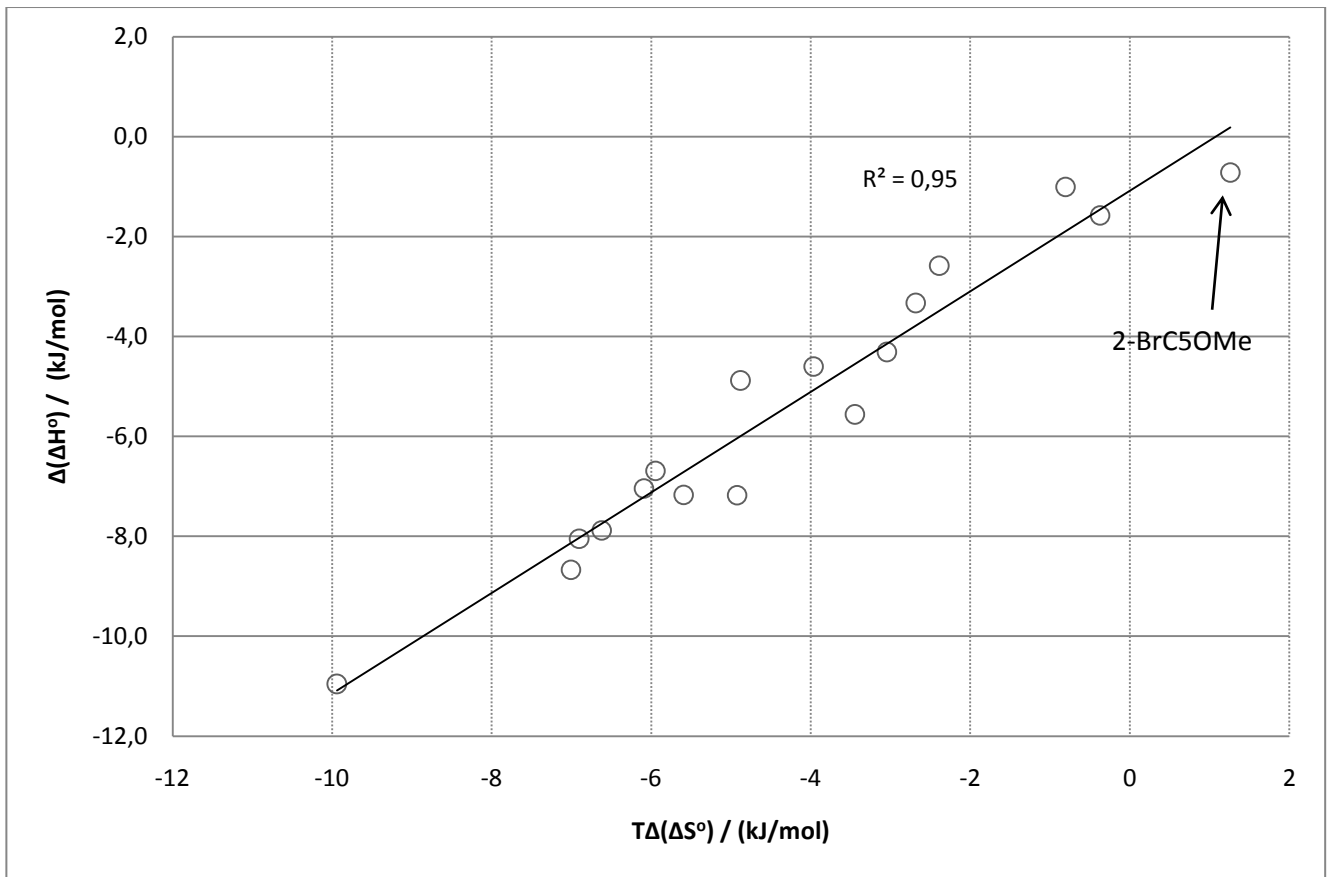


Figura 28. Gráficas de $\Delta(\Delta H^\circ)$ vs. $T\Delta(\Delta S^\circ)$ para las mezclas racémicas en selector quiral Lipodex E.

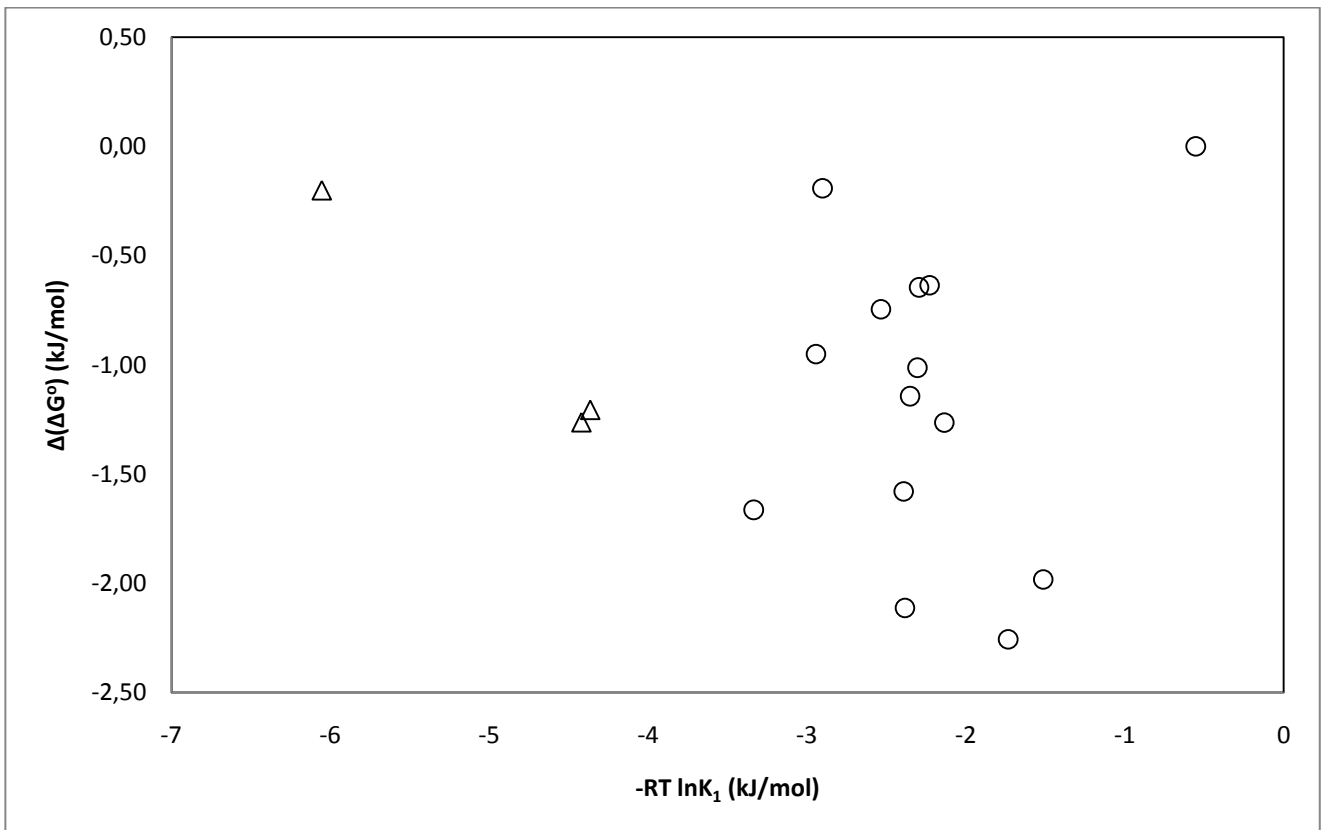


Figura 29. Gráfica de $\Delta(\Delta G^\circ)$ en función de la energía libre de Gibbs para la asociación del primer enantiómero del par (ΔG°_1) estimado a 70 °C. Triángulos blancos: 1-feniletanol, ácidos 3-hidroxi-butírico y 2-aminobutírico.

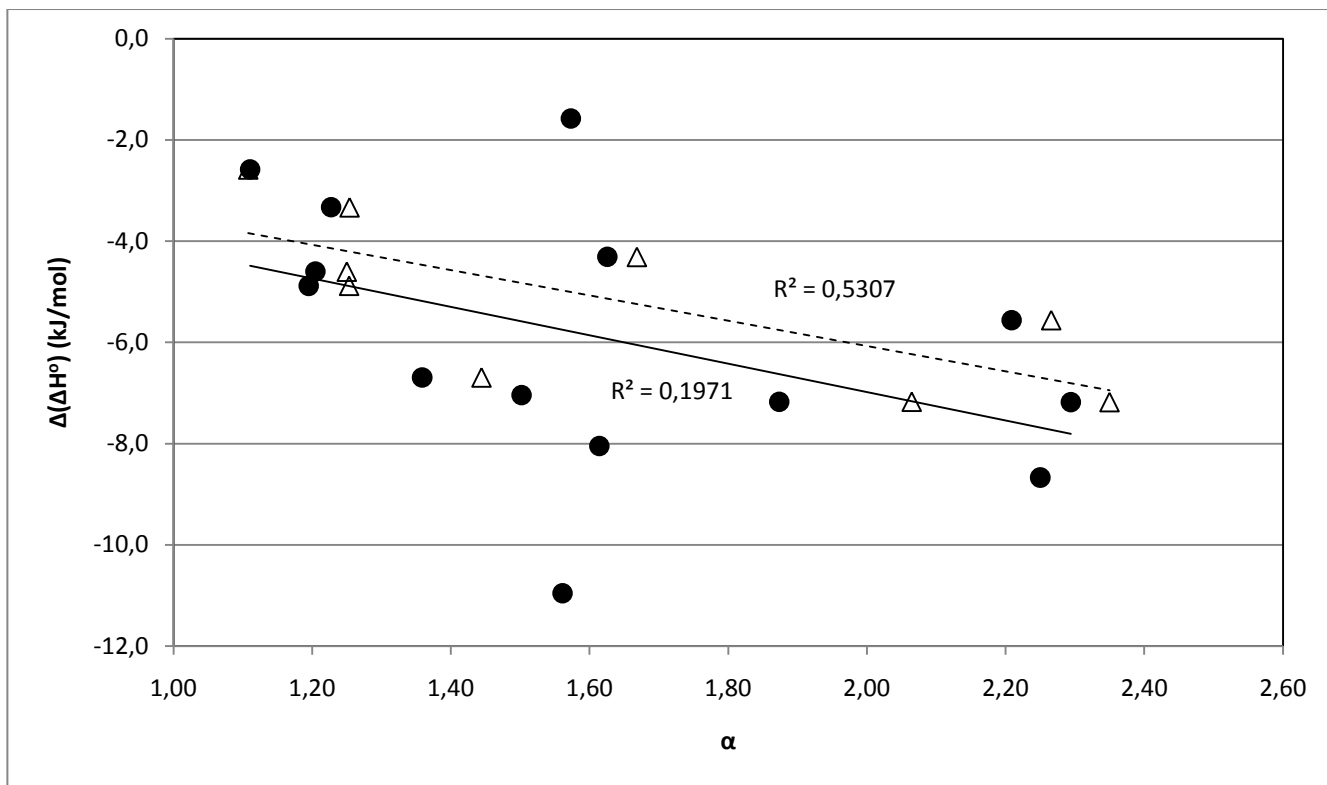


Figura 30. Gráfico de $\Delta(\Delta H^\circ)$ en función de los factores de enantioseparación a 60°C (círculos y línea continua) y a 50°C (triángulos y línea discontinua).

Capítulo IV - Conclusiones

Teniendo en cuenta los objetivos planteados al comienzo del estudio y los resultados obtenidos, es posible extraer las siguientes conclusiones:

- En relación con la construcción de las columnas capilares, se ha demostrado que la metodología utilizada para la construcción de columnas para cromatografía gaseosa capilar es capaz de producir sistemas altamente eficientes con un proceso de fabricación rápido y confiable. Más aún, es posible obtener columnas conteniendo una relación de fases conocida con muy buena precisión si se tienen mínimos cuidados en la preparación de las soluciones de llenado del capilar y, además, se realizan mediciones cuidadosas de densidad de las fases estacionarias a distintas temperaturas. Los experimentos realizados en este estudio confirmaron resultados previamente obtenidos en nuestro laboratorio.
- En cuanto al sistema utilizado en el presente estudio en particular, octakis-(2,6-di-O-pentil-3-O-butiril)- γ -ciclodextrina disuelta en el polisiloxano de mediana polaridad OV1701, se ha demostrado que posee una elevada eficiencia y baja tendencia a desarrollar asimetrías en los picos cromatográficos en comparación con sistemas comerciales similares. Es relevante mencionar que para una comparación más exacta hubiese sido deseable conocer la totalidad de los componentes utilizados en la fabricación de la columna comercial denominada LIPODEX-E. Desafortunadamente, esta información no fue revelada por el fabricante.
- La metodología teórica utilizada para determinar el tiempo muerto de cada columna a cada temperatura de trabajo ha sido adecuada a las columnas quirales desarrolladas en este estudio. No obstante los resultados obtenidos, es pertinente mencionar que para una adecuada aplicación de estas ecuaciones es imprescindible cumplir con los requisitos preestablecidos en cuanto a relación de fases de las columnas en estudio, número de n-alcenos utilizados y eficiencias mínimas de los picos obtenidos. Si bien las diferencias entre el tiempo muerto teórico y experimental determinado a partir del tiempo de retención del metano son pequeñas, los errores sistemáticos en el cálculo de los factores de retención pueden ser elevados para analitos poco retenidos. Estos errores son inaceptables para mediciones precisas de factores de retención.
- En relación con las metodologías de derivatización utilizadas se ha demostrado que, el reactivo derivatizante TFAA confiere a la mezcla racémica grupos funcionales $-\text{OCH}_3$ que mejoran significativamente el poder enantiorresolutivo del selector octakis-(2,6-di-O-pentil-3-O-butiril)- γ -ciclodextrina en comparación con la derivatización realizada con el reactivo ECF. Sin embargo, este estudio es la primera evidencia, de acuerdo a la literatura consultada, que demuestra que es posible utilizar esta derivatización en aminoácidos, ácidos carboxílicos e hidroxicarboxílicos para su posterior enantiorresolución en CG quiral con el sistema octakis-(2,6-di-O-pentil-3-O-butiril)- γ -ciclodextrina disuelta en el polisiloxano de mediana polaridad OV-1701.
- En cuanto a la capacidad de enantiorreconociendo y resolución de compuestos racémicos este estudio demuestra que este sistema es apropiado para su utilización con diversas familias químicas, en especial, demuestra un elevado potencial para su utilización en el desarrollo de métodos separativos de aminoácidos. Es pertinente mencionar que la resolución de estos analitos es posible aun trabajando a bajas concentraciones de selector quiral y que el potencial enantiorresolutivo máximo no se ha alcanzado con las concentraciones utilizadas lo cual abre la posibilidad para continuar estudiando este sistema.

- Se ha propuesto un método sencillo y confiable de determinación de constantes de asociación enantiomérica empleando columnas capilares, en el que las variables experimentales que deben determinarse son los tiempos de retención del enantiómero en sistemas conteniendo distinto porcentaje de selector quiral en una matriz aquiral, el tiempo muerto de cada cromatograma y la relación de fases de las columnas a cada temperatura. De acuerdo con las ecuaciones básicas de cromatografía, y sin el uso de ninguna hipótesis *ad-hoc*, pueden estimarse estas constantes de asociación con muy buena precisión. Este resultado, junto el método de construcción de columnas capilares, permite a la cromatografía gaseosa capilar no solo su ya establecida madurez como técnica analítica sino su utilización para la determinación de propiedades fisicoquímicas como los son las constantes de partición enantioméricas.
- Los resultados de enantioselectividad absoluta medidos a partir de las constantes de asociación enantiómero-selector quiral según fueron determinadas en este estudio han sido comparadas con los valores de enantioselectividad estimados a partir del modelo del incremento de la retención, propuesto por el grupo de Volker Schurig y usualmente empleado para distinguir entre contribución no-enantiomérica a la retención respecto de la contribución estrictamente enantiomérica. Se ha verificado que la elección de distintos n-alcenos como referencia arroja valores distintos de enantioselectividad, y que cualquiera de estos valores estimados de R' son de menor magnitud que los obtenidos de las constantes absolutas. El uso del modelo de incremento de retención para determinación de enantioselectividad y de las propiedades termodinámicas asociadas a un proceso de enantio-reconocimiento debería restringirse a las fases estacionarias cuyas densidades son muy difíciles de determinar con precisión y, en consecuencia, sus relaciones de fases no son conocidas. De no darse este impedimento experimental, medir con exactitud la relación de fases de una columna capilar es muy sencillo, y debería ser mandatorio para obtener constantes de equilibrio absolutas que sean confiables.
- El efecto de la temperatura sobre la capacidad de enantio-reconocimiento de estas columnas capilares hacia analitos químicamente diversos fue establecida a partir de los gráficos de logaritmo de enantioselectividad en función de la inversa de la temperatura, aceptablemente lineales en el rango estudiado. El aumento de la temperatura dentro del rango entre 50 y 100°C provoca la disminución de la retención y de la enantioselectividad de todos estos solutos en todas las columnas, lo que indica que la diferencia en las entalpías de interacción de ambos enantiómeros con la fase quiral domina el proceso de enantiorreconocimiento en todos los casos. Finalmente, si bien se halló que las diferencias $\Delta(\Delta S^\circ)$ correlacionan con las variaciones de entalpía $\Delta(\Delta H^\circ)$, no se observa relación entre la energía libre de retención y la correspondiente variación en $\Delta(\Delta G^\circ)$. Las diferencias en las constantes de equilibrio para los complejos enantiómero-SQ que hacen posible el proceso de discriminación quiral son muy sutiles y, en consecuencia, difíciles de modelar y predecir.

Anexos

Anexo A1

Tabla A1.1. Parámetros utilizados en la determinación de $K_{(CH_4)}$ utilizando las ecuaciones (1.33), (1.34) y (1.36) en la columna LP0.

T (°C)					Ec. (1.36)			Ec. (1.33)			Ec. (1.34)	
100	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$	R^2	1		R^2	1		R^2	1	
	1	0,861 ₉	0,3016	desv. est.	0,0018		desv. est.	0,0018		desv. est.	0,0021	
	2	0,863 ₅	-0,144		Coeficiente ^a	Error est. (±)		Coeficiente ^a	Error est.		Coeficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,856 ₅	1,800	t_M	0,8619	0,0024	A	0,8624	0,0029	A	0,8538	0,0051
				A	-5,9908	0,1293	B	-6,7882	0,2492	B	-5,9233	0,5495
				B	0,6987	0,0258	C	0,7255	0,0504	C	0,5035	0,1601
				C	0,0024	0,0008	D	-0,0044	0,0026	D	1,0729	0,0984
90	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$	R^2	1		R^2	1		R^2	1	
	1	0,841 ₄	1,0192	desv. est.	0,0019		desv. est.	0,0019		desv. est.	0,002	
	2	0,843 ₀	0,575		Coeficiente ^a	Error est. (±)		Coeficiente ^a	Error est. (±)		Coeficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,838 ₅	1,857	t_M	0,8414	0,0027	A	0,8415	0,0029	A	0,836	0,0042
				A	-5,811	0,1279	B	-6,5254	0,1975	B	-6,0057	0,3934
				B	0,698	0,0291	C	0,7024	0,04	C	0,5533	0,1177
				C	0,001	0,0012	D	-0,0014	0,0021	D	1,0613	0,0658
80	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$	R^2	1		R^2	1		R^2	1	
	1	0,822 ₈	1,5175	desv. est.	0,002		desv. est.	0,002		desv. est.	0,0021	
	2	0,824 ₄	1,047		Coeficiente ^a	Error est. (±)	1	Coeficiente ^a	Error est. (±)		Coeficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,820 ₁	2,299	t_M	0,8228	0,0026	A	0,8229	0,0028	A	0,8179	0,0038
				A	-5,7613	0,1059	B	-6,4977	0,1533	B	-6,0984	0,3052
				B	0,7288	0,0251	C	0,7308	0,0312	C	0,6121	0,094
				C	0,0007	0,0011	D	-0,0008	0,0016	D	1,0474	0,0474
70	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$	R^2	1		R^2	1		R^2	1	
	1	0,808 ₂	0,5391	desv. est.	0,0044		desv. est.	0,0044		desv. est.	0,0055	
	2	0,809 ₉	0,042		Coeficiente ^a	Error est. (±)		Coeficiente ^a	Error est. (±)		Coeficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,793 ₁	5,164	t_M	0,8082	0,0047	A	0,8086	0,0053	A	0,7889	0,0092
				A	-5,8447	0,1415	B	-6,678	0,2376	B	-5,4776	0,4788
				B	0,7928	0,031	C	0,8037	0,0488	C	0,4666	0,1247
				C	0,0016	0,0012	D	-0,0024	0,0025	D	1,1509	0,0848
60	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$	R^2	1		R^2	1		R^2	1	

	1	0,788 ₁	1,5169		desv. est.	0,0053		desv. est.	0,0053		desv. est.	0,0053	
	2	0,789 ₇	1,023			Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,788 ₅	1,398		t _M	0,7881	0,0053	A	0,7883	0,0057	A	0,7871	0,0066
					A	-5,7459	0,1303	B	-6,5792	0,1969	B	-6,5849	0,3989
					B	0,8211	0,0305	C	0,8245	0,0406	C	0,8415	0,1372
					C	0,0009	0,0013	D	-0,0012	0,0021	D	0,9851	0,0496
50	Ecuación	t _M	K _(CH4)		R ²	1		R ²	1		R ²	1	
	1	0,766 ₅	2,0855		desv. est.	0,0086		desv. est.	0,0086		desv. est.	0,0087	
	2	0,768 ₁	1,583			Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,771 ₄	0,514		t _M	0,7665	0,0082	A	0,7666	0,0084	A	0,7702	0,0093
					A	-5,6734	0,1632	B	-6,531	0,2177	B	-6,736	0,4473
					B	0,8567	0,0412	C	0,8569	0,045	C	0,9314	0,1576
					C	0,0003	0,002	D	-0,0003	0,0023	D	0,9725	0,0513

a: los valores de los coeficientes se informan con un número excesivo de cifras significativas.

Tabla A1.2. Parámetros utilizados en la determinación de K_(CH4) utilizando las ecuaciones (1.33), (1.34) y (1.36) en la columna LP10.

T (°C)						Ec. (1.36)			Ec. (1.33)			Ec. (1.34)	
100	Ecuación	t _M	K _(CH4)		R ²	1		R ²	1		R ²	1	
	1	0,954 ₇	0,8282		desv. est.	0,0011		desv. est.	0,0011		desv. est.	0,0021	
	2	0,956 ₅	0,373			Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est.		Coficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,956 ₃	0,435		t _M	0,9547	0,0017	A	0,9551	0,002	A	0,9551	0,0024
					A	-5,8272	0,0851	B	-6,5631	0,1486	B	-6,7562	0,3419
					B	0,681	0,0179	C	0,6955	0,03	C	0,8034	0,1258
					C	0,0018	0,0006	D	-0,0028	0,0015	D	0,9317	0,0465
90	Ecuación	t _M	K _(CH4)		R ²	1		R ²	1		R ²	1	
	1	0,935 ₆	0,621		desv. est.	0,0025		desv. est.	0,0025		desv. est.	0,0026	
	2	0,937 ₃	0,1698			Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,934 ₀	1,039		t _M	0,9356	0,0034	A	0,9359	0,0038	A	0,9321	0,005
					A	-5,7942	0,1444	B	-6,5413	0,2415	B	-6,269	0,4985
					B	0,7113	0,0314	C	0,721	0,049	C	0,6584	0,1628
					C	0,0015	0,0012	D	-0,0022	0,0025	D	1,0086	0,0754
80	Ecuación	t _M	K _(CH4)		R ²	1		R ²	1		R ²	1	
	1	0,916 ₂	1,547		desv. est.	0,0015		desv. est.	0,0015		desv. est.	0,0015	
	2	0,918 ₀	1,074			Coficiente ^a	Error est. (±)	1	Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,917 ₆	1,1633		t _M	0,9162	0,0018	A	0,9166	0,0021	A	0,9165	0,0024
					A	-5,7915	0,0614	B	-6,5958	0,1062	B	-6,7833	0,2377
					B	0,7549	0,0132	C	0,7682	0,0217	C	0,8718	0,0871

					C	0,0017	0,0005	D	-0,0027	0,0011	D	0,9402	0,0299
70	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$		R^2	1		R^2	1		R^2	1	
	1	0,897 ₆	1,209		desv. est.	0,0018		desv. est.	0,0018		desv. est.	0,0018	
	2	0,899 ₄	0,704			Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,899 ₇	0,63		t_M	0,8976	0,0018	A	0,8982	0,0021	A	0,8988	0,0025
					A	-5,8268	0,0491	B	-6,6976	0,0897	B	-7,0096	0,208
					B	0,8069	0,0103	C	0,8248	0,0184	C	0,9855	0,0789
					C	0,002	0,0004	D	-0,0034	0,001	D	0,9209	0,0238
60	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$		R^2	1		R^2	1		R^2	1	
	1	0,875 ₆	1,818		desv. est.	0,0036		desv. est.	0,0036		desv. est.	0,0036	
	2	0,877 ₃	1,32			Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,877 ₀	1,431		t_M	0,8756	0,0034	A	0,876	0,0038	A	0,8758	0,0043
					A	-5,7383	0,0722	B	-6,6122	0,1214	B	-6,7632	0,2606
					B	0,838	0,0159	C	0,848	0,025	C	0,932	0,0941
					C	0,0016	0,0006	D	-0,0024	0,0013	D	0,9546	0,0304
50	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$		R^2	1		R^2	1		R^2	1	
	1	0,854 ₂	2,293		desv. est.	0,0086		desv. est.	0,0086		desv. est.	0,0087	
	2	0,856 ₀	1,755			Coficiente	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,857 ₀	1,478		t_M	0,8542	0,0014	A	0,8547	0,0016	A	0,8559	0,0018
					A	-5,7124	0,0233	B	-6,6326	0,0388	B	-6,8543	0,0832
					B	0,8857	0,0052	C	0,8953	0,008	C	1,0036	0,0304
					C	0,0015	0,0002	D	-0,0023	0,0004	D	0,9501	0,0091

a: los valores de los coeficientes se informan con un número excesivo de cifras significativas.

Tabla A1.3. Parámetros utilizados en la determinación de $K_{(CH_4)}$ utilizando las ecuaciones (1.33), (1.34) y (1.36) en la columna LP16.

T (°C)						Ec. (1.36)			Ec. (1.33)			Ec. (1.34)	
100	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$		R^2	1		R^2	1		R^2	1	
	1	0,845 ₁	1,866		desv. est.	0,0077		desv. est.	0,0077		desv. est.	0,0077	
	2	0,846 ₀	1,65			Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est.		Coficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,843 ₂	2,315		t_M	0,8451	0,0139	A	0,844	0,0142	A	0,8401	0,0184
					A	-5,6371	0,7488	B	-6,2106	0,9448	B	-5,7688	1,6806
					B	0,6507	0,1887	C	0,6351	0,19	C	0,4909	0,4796
					C	1,111E-12	0,0096	D	0,0008	0,0097	D	1,0866	0,3036
90	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$		R^2	1		R^2	1		R^2	1	
	1	0,827 ₅	2,5603		desv. est.	0,0019		desv. est.	0,0019		desv. est.	0,0019	
	2	0,827 ₇	2,505			Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,825 ₉	2,958		t_M	0,8275	0,0030	A	0,8257	0,003	A	0,8232	0,0037

					A	-5,6268	0,1340	B	-6,202	0,1679	B	-5,9167	0,307
					B	0,6866	0,0341	C	0,6639	0,034	C	0,5613	0,0919
					C	2,324E-12	0,0017	D	0,0012	0,0017	D	1,0618	0,0507
80	Ecuación	t _M	K _(CH4)		R ²	1		R ²	1		R ²	1	
	1	0,809 ₃	2,7936		desv. est.	0,0053		desv. est.	0,0053		desv. est.	0,0054	
	2	0,811 ₇	2,184			Coeficiente ^a	Error est. (±)	1	Coeficiente ^a	Error est. (±)		Coeficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,806 ₃	3,562		t _M	0,8093	0,0072	A	0,81	0,0073	A	0,8036	0,0093
					A	-5,6184	0,2638	B	-6,3787	0,3403	B	-5,9148	0,6292
					B	0,7277	0,0666	C	0,7344	0,0694	C	0,5923	0,1894
					C	0,0001	0,0033	D	-0,0005	0,0036	D	1,0622	0,0991
70	Ecuación	t _M	K _(CH4)		R ²	1		R ²	1		R ²	1	
	1	0,791 ₈	3,0107		desv. est.	0,0088		desv. est.	0,0088		desv. est.	0,0103	
	2	0,795 ₉	1,947			Coeficiente ^a	Error est. (±)		Coeficiente ^a	Error est. (±)		Coeficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,767 ₈	9,533		t _M	0,7918	0,0107	A	0,7943	0,0105	A	0,7592	0,0188
					A	-5,5934	0,3128	B	-6,4631	0,3992	B	-4,7579	0,6574
					B	0,7685	0,0797	C	0,7893	0,0819	C	0,328	0,1401
					C	0,0001	0,0040	D	-0,0012	0,0042	D	1,268	0,1389
60	Ecuación	t _M	K _(CH4)		R ²	1		R ²	1		R ²	1	
	1	0,776 ₈	2,9892		desv. est.	0,0036		desv. est.	0,016		desv. est.	0,016	
	2	0,777 ₆	2,781			Coeficiente ^a	Error est. (±)		Coeficiente ^a	Error est. (±)		Coeficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,779 ₂	2,333		t _M	0,7768	0,0158	A	0,776	0,0171	A	0,7779	0,0193
					A	-5,6418	0,3286	B	-6,4559	0,5008	B	-6,6223	1,0385
					B	0,8315	0,0767	C	0,8288	0,1032	C	0,8984	0,367
					C	0,001	0,0033	D	-0,0009	0,0054	D	0,9688	0,1236
50	Ecuación	t _M	K _(CH4)		R ²	1		R ²	1		R ²	1	
	1	0,759 ₅	2,3418		desv. est.	0,0086		desv. est.	0,0117		desv. est.	0,0117	
	2	0,761 ₄	1,818			Coeficiente ^a	Error est. (±)		Coeficiente ^a	Error est. (±)		Coeficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,760 ₂	2,137		t _M	0,7595	0,0099	A	0,76	0,0109	A	0,759	0,0123
					A	-5,6582	0,1468	B	-6,5819	0,2444	B	-6,696	0,513
					B	0,8912	0,0327	C	0,9004	0,0506	C	0,9694	0,1837
					C	0,0015	0,0013	D	-0,0023	0,0026	D	0,9626	0,0573

a: los valores de los coeficientes se informan con un número excesivo de cifras significativas.

Tabla A1.4. Parámetros utilizados en la determinación de $K_{(CH_4)}$ utilizando las ecuaciones (1.33), (1.34) y (1.36) en la columna LP26.

T (°C)					Ec. (1.36)			Ec. (1.33)			Ec. (1.34)	
100	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$	R^2	1		R^2	1		R^2	1	
	1	0,8494	0,1375	desv. est.	0,0025		desv. est.	0,0025		desv. est.	0,0027	
	2	0,8510	-0,235		Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est.		Coficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,8445	1,2718	t_M	0,8494	0,0030	A	0,8503	0,0037	A	0,843	0,006
				A	-6,2813	0,1681	B	-7,2283	0,3616	B	-6,5149	0,0034
				B	0,7374	0,0315	C	0,794	0,0736	C	0,6492	0,0026
				C	0,0032	0,0008	D	-0,0074	0,0038	D	-0,001	0
90	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$	R^2	1		R^2	1		R^2	1	
	1	0,8265	1,5467	desv. est.	0,0009		desv. est.	0,0009		desv. est.	0,0009	
	2	0,8279	1,2144		Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,8268	1,4714	t_M	0,8265	0,0013	A	0,8266	0,0014	A	0,8254	0,0021
				A	-5,942	0,0711	B	-6,6547	0,1049	B	-6,5612	0,0014
				B	0,7037	0,0166	C	0,7061	0,0213	C	0,6871	0,001
				C	0,0008	0,0007	D	-0,001	0,0011	D	-0,001	0
80	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$	R^2	1		R^2	1		R^2	1	
	1	0,8102	1,6662	desv. est.	0,0034		desv. est.	0,0034		desv. est.	0,0034	
	2	0,8121	1,2084		Coficiente ^a	Error est. (±)	1	Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,8109	1,5023	t_M	0,8102	0,0045	A	0,8108	0,0046	A	0,8095	0,0076
				A	-5,907	0,2042	B	-6,6789	0,2815	B	-6,5975	0,0062
				B	0,7365	0,0497	C	0,7439	0,0575	C	0,7272	0,0045
				C	0,0005	0,0024	D	-0,0009	0,003	D	-0,001	0
70	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$	R^2	1		R^2	1		R^2	1	
	1	0,7910	1,7726	desv. est.	0,0034		desv. est.	0,0034		desv. est.	0,0034	
	2	0,7923	1,4344		Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,7923	1,436	t_M	0,7910	0,0041	A	0,791	0,0041	A	0,791	0,0076
				A	-5,8605	0,1583	B	-6,6255	0,1991	B	-6,6304	0,0075
				B	0,7699	0,0408	C	0,7689	0,0408	C	0,7699	0,0053
				C	8,5785E-14	0,0021	D	5,26E-05	0,0021	D	-1,00E-03	0
60	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$	R^2	1		R^2	1		R^2	1	
	1	0,7726	1,9355	desv. est.	0,0027		desv. est.	0,0027		desv. est.	0,0028	
	2	0,7741	1,5318		Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)		Coficiente ^a	Error est. (±)
	3	0,7729	1,857	t_M	0,7726	0,0028	A	0,7729	0,0029	A	0,7716	0,0061
				A	-5,8627	0,0814	B	-6,6994	0,1105	B	-6,6475	0,0076
				B	0,8214	0,0203	C	0,8247	0,0228	C	0,8139	0,0052
				C	0,0004	0,0010	D	-0,0006	0,0012	D	-0,001	0

50	Ecuación	t_M	$K_{(CH_4)}$		R^2	1		R^2	1		R^2	1	
	1	0,7571	1,32		desv. est.	0,0124		desv. est.	0,0123		desv. est.	0,0124	
	2	0,7538	2,2189			Coeficiente ^a	Error est. (\pm)		Coeficiente ^a	Error est. (\pm)		Coeficiente ^a	Error est. (\pm)
	3	0,7583	0,9942		t_M	0,7571	0,0117	A	0,7524	0,0119	A	0,7571	0,0275
					A	-5,8542	0,2675	B	-6,5721	0,3376	B	-6,7224	0,0432
					B	0,8683	0,0698	C	0,8371	0,0698	C	0,8683	0,0292
					C	1,445E-12	0,0036	D	0,0016	0,0036	D	-0,001	0

a: los valores de los coeficientes se informan con un número excesivo de cifras significativas.

Anexo A2

Tabla A2.1. Datos cromatográficos del analito 4-metil-2-pentanol.

		Temperatura (°C)					
		100	90	80	70	60	50
% CD	Parámetro						
0	k'	0,459	0,646	0,921	1,353	2,041	3,218
10	k'1	0,489	0,668	0,976	1,44	2,214	3,579
	k'2						3,662
	α						1,023
	Rs						<0,8
16	k'1	0,63	0,889	1,285	1,934	2,975	4,853
	k'2					3,019	4,97
	α					1,015	1,024
	Rs					<0,8	0,9
26	k'1	0,642	0,924	1,377	2,116	3,413	5,732
	k'2				2,151	3,51	5,957
	α				1,017	1,028	1,039
	Rs				<0,8	<0,8	1,2

Tabla A2.2. Datos cromatográficos del analito 2-bromopentano.

		Temperatura (°C)					
		100	90	80	70	60	50
% CD	Parámetro						
0	k'	0,444	0,59	0,805	1,123	1,594	2,341
10	k'1	0,445	0,588	0,817	1,146	1,661	2,479
	k'2					1,68	2,544
	α					1,012	1,026
	Rs					<0,8	0,9
16	k'1	0,542	0,726	1,005	1,419	2,034	3,052
	k'2					2,072	3,142
	α					1,019	1,029
	Rs					<0,8	1,0
26	k'1	0,471	0,641	0,893	1,246	1,834	2,781
	k'2				1,278	1,899	2,93
	α				1,025	1,035	1,053
	Rs				<0,8	1,0	1,6

Tabla A2.3. Datos cromatográficos del analito 2,5-dimetoxi tetrahidrofurano.

		Temperatura (°C)					
		100	90	80	70	60	50
% CD	Parámetro						
0	k'	0,856	1,198	1,736	2,59	3,962	6,325
10	k'1	0,826	1,147	1,664	2,47	3,722	5,969
	k'2					3,773	6,103
	α					1,01	1,02
	Rs					<0,8	<0,8
16	k'1	1,026	1,432	2,068	3,075	4,654	7,392
	k'2					4,737	7,581
	α					1,02	1,03
	Rs					<0,8	1,0
26	k'1	0,937	1,333	1,92	2,824	4,359	6,982

	k'2				2,89	4,497	7,287
	α				1,02	1,03	1,04
	Rs				<0,8	1,1	1,4

Tabla A2.4. Datos cromatográficos del analito 3,3,5-trimetil ciclohexanona.

% CD	Parámetro	Temperatura (°C)				
		100	90	80	70	60
0	k'	3,502	5,166	7,831	12,267	19,948
10	k'1	3,591	5,402	8,404	13,721	23,475
	k'2	3,708	5,727	9,075	15,42	27,74
	α	1,033	1,06	1,08	1,124	1,182
	Rs	1,3	2,5	3,0	4,2	4,2
16	k'1	4,51	6,789	10,683	17,509	25,99
	k'2	4,727	7,272	11,809	20,09	30,348
	α	1,048	1,071	1,105	1,147	1,168
	Rs	1,9	3,0	4,5	5,7	8,6
26	k'1	4,41	6,796	11,045	18,69	34,193
	k'2	4,855	7,7	13,153	23,615	46,864
	α	1,101	1,133	1,191	1,263	1,371
	Rs	3,8	4,2	5,5	5,4	8,4

Tabla A2. 5. Datos cromatográficos del analito 1-fenil-1-etanol.

% CD	Parámetro	Temperatura (°C)			
		100	90	80	70
0	k'	4,947	7,711	12,199	20,326
10	k'1	5,67	9,023	14,808	26,096
	k'2			15,075	26,941
	α			1,018	1,032
	Rs			<0,8	1,2
16	k'1	7,837	12,479	20,87	36,868
	k'2		12,63	21,305	37,973
	α		1,012	1,021	1,03
	Rs		<0,8	1,0	1,4
26	k'1	9,143	15,141	26,287	48,364
	k'2	9,266	15,429	27,075	50,417
	α	1,013	1,019	1,03	1,042
	Rs	<0,8	<0,8	1,2	1,8

Tabla A2.6. Datos cromatográficos del analito ácido 2-cloropropanoico-ECF.

% CD	Parámetro	Temperatura (°C)					
		100	90	80	70	60	50
0	k'	0,911	1,282	1,856	2,755	4,232	6,728
10	k'1	0,928	1,322	1,967	3,018	4,857	8,217
	k'2	0,952	1,383	2,113	3,376	5,773	10,672
	α	1,0259	1,0459	1,0742	1,1185	1,1885	1,2987
	Rs	<0,8	1,2	1,9	3,9	6,1	
16	k'1	1,145	1,643	2,451	3,727	5,953	9,987
	k'2	1,18	1,717	2,616	4,116	6,922	12,562
	α	1,0306	1,0449	1,0673	1,1043	1,1629	1,2578
	Rs	<0,8	1,3	2,3	3,5	4,7	5,5

26	k'1	1,068	1,574	2,366	3,759	6,253	11,048
	k'2	1,132	1,693	2,685	4,521	8,16	15,999
	α	1,0598	1,0752	1,1348	1,2027	1,3049	1,4481
	Rs	1,0	2,8	4,4	6,8	10,2	13,7

Tabla A2.7. Datos cromatográficos del analito ácido 2-bromopropanoico-ECF.

		Temperatura (°C)					
		100	90	80	70	60	50
% CD	Parámetro						
0	k'	1,476	2,12	3,131	4,757	7,473	12,183
10	k'1	1,522	2,195	3,325	5,208	8,567	14,841
	k'2		2,229	3,425	5,458	9,241	16,71
	α		1,016	1,03	1,048	1,079	1,126
	Rs		<0,8	1,0	1,9	3,1	
16	k'1	1,9	2,748	4,18	6,482	10,572	18,159
	k'2	1,906	2,794	4,293	6,764	11,281	20,078
	α		1,017	1,027	1,044	1,067	1,106
	Rs		<0,8	1,1	1,8	2,7	3,8
26	k'1	1,757	2,617	4,042	6,481	11,045	19,791
	k'2	1,799	2,714	4,263	7,023	12,416	23,416
	α	1,024	1,037	1,055	1,084	1,124	1,183
	Rs	<0,8	1,2	2,1	3,3	4,6	7,2

Tabla A2.8. Datos cromatográficos del analito ácido 2-bromobutanoico-ECF.

		Temperatura (°C)					
		100	90	80	70	60	
% CD	Parámetro						
0	k'	2,565	3,765	5,71	8,969	14,539	
10	k'1	2,655	3,933	6,183	10,143	17,702	
	k'2		4,035	6,463	10,952	20,096	
	α		1,026	1,045	1,08	1,135	
	Rs		1,0	1,7	3,3	5,1	
16	k'1	3,291	4,919	7,741	12,516	21,506	
	k'2	3,329	5,044	8,053	13,342	23,99	
	α	1,012	1,025	1,04	1,066	1,116	
	Rs	<0,8	1,0	1,7	2,5	3,6	
26	k'1	3,03	4,632	7,476	12,74	23,238	
	k'2	3,129	4,876	8,102	14,448	28,162	
	α	1,033	1,053	1,084	1,134	1,212	
	Rs	1,3	2,1	3,4	5,3	8,0	

Tabla A2.9. Datos cromatográficos del analito ácido 2-bromovalérico-ECF.

		Temperatura (°C)					
		100	90	80	70	60	
% CD	Parámetro						
0	k'	4,43	6,752	10,617	17,319	29,228	
10	k'1	4,542	6,938	8,524	18,758	33,397	
	k'2		7,08	9,281	20,115	37,753	
	α		1,02	1,089	1,072	1,13	
	Rs		<0,8	3,5	4,6	5,1	
16	k'1	5,725	8,708	14,064	23,342	41,008	
	k'2		8,873	14,513	24,692	45,179	
	α		1,019	1,032	1,058	1,102	

	Rs		<0,8	1,4	2,4	3,5
26	k'1	5,102	7,986	13,165	22,883	42,385
	k'2	5,205	8,285	13,996	25,4	50,374
	α	1,02	1,037	1,063	1,11	1,188
	Rs	<0,9	1,6	2,8	4,6	7,7

Tabla A2.10. Datos cromatográficos del analito ácido 2-cloropropiónico-OMe.

		Temperatura (°C)					
		100	90	80	70	60	50
% CD	Parámetro						
0	k'	0,598	0,805	1,139	1,659	2,458	3,765
10	k'1	0,607	0,848	1,229	1,853	2,899	4,754
	k'2	0,639	0,912	1,374	2,184	3,695	6,735
	α	1,052	1,076	1,118	1,178	1,275	1,417
	Rs						
16	k'1	0,852	1,079	1,567	2,341	3,645	5,979
	k'2		1,162	1,748	2,742	4,622	8,281
	α		1,077	1,115	1,171	1,268	1,385
	Rs		1,1	2,4	3,9	8,9	10,6
26	k'1	0,791	1,063	1,616	2,433	3,929	6,62
	k'2	0,84	1,197	1,903	3,076	5,429	10,201
	α	1,062	1,126	1,177	1,264	1,382	1,541
	Rs	<0,8	2,2	3,8	4,4	9,4	12,6

Tabla A2.11. Datos cromatográficos del analito ácido 2-bromopropiónico-Ome.

		Temperatura (°C)					
		100	90	80	70	60	50
% CD	Parámetro						
0	k'	0,967	1,357	1,959	2,906	4,426	6,981
10	k'1	1,028	1,446	2,127	3,257	5,24	8,75
	k'2	1,028	1,494	2,231	3,52	5,883	10,33
	α		1,033	1,049	1,081	1,123	1,181
	Rs		1,4	2,2	3,7	6,1	9,7
16	k'1	1,309	1,844	2,728	4,187	6,697	11,276
	k'2		1,912	2,88	4,539	7,547	13,31
	α		1,037	1,056	1,084	1,127	1,180
	Rs		0,8	1,8	3,2	5,0	6,4
26	k'1	1,308	1,864	2,784	4,357	7,173	12,547
	k'2	1,362	1,981	3,039	4,928	8,497	15,811
	α	1,041	1,063	1,091	1,131	1,185	1,260
	Rs	<0,8	1,4	2,0	3,9	5,6	8,3

Tabla A2.12. Datos cromatográficos del analito ácido 2-bromobutírico-OMe.

		Temperatura (°C)					
		100	90	80	70	60	50
% CD	Parámetro						
0	k'	1,686	2,429	3,603	5,511	8,691	14,24
10	k'1	1,756	2,599	3,982	6,346	10,655	19,185
	k'2	1,826	2,765	4,391	7,397	13,432	27,631
	α	1,040	1,064	1,103	1,166	1,261	1,440
	Rs	1,6	3,1	5,8	9,0	14,3	21,7
16	k'1	2,253	3,314	5,079	8,141	13,623	24,41
	k'2	2,349	3,535	5,634	9,57	17,316	35,109

	α	1,043	1,067	1,109	1,176	1,271	1,438
	Rs	1,1	2,0	4,0	6,8	8,2	10,7
26	k'1	2,21	3,23	5,086	8,468	14,978	27,954
	k'2	2,362	3,619	6,019	10,841	21,266	45,146
	α	1,069	1,120	1,183	1,280	1,420	1,615
	Rs	1,3	3,9	5,5	8,9	13,8	

Tabla A2.13. Datos cromatográficos del analito ácido 2-bromovalérico-OMe.

		Temperatura (°C)					
		100	90	80	70	60	50
% CD	Parámetro						
0	k'	2,963	4,418	6,805	10,797	17,743	30,403
10	k'1	3,05	4,599	7,274	11,915	20,632	37,85
	k'2	3,131	4,8	7,807	13,394	24,931	51,046
	α	1,027	1,044	1,073	1,124	1,208	1,349
	Rs	<0,8	1,6	2,9	5,0	8,2	9,9
16	k'1	3,909	5,942	9,366	15,416	26,668	49,03
	k'2	4,023	6,223	10,106	17,441	32,437	66,236
	α	1,029	1,047	1,079	1,131	1,216	1,351
	Rs	1,2	1,9	3,4	5,5	8,4	10,6
26	k'1	3,701	5,619	9,042	15,485	28,111	54,071
	k'2	3,889	6,076	10,17	18,585	36,962	80,13
	α	1,051	1,081	1,125	1,200	1,315	1,482
	Rs	1,4	3,0	4,2	7,3	11,5	

Tabla A2.14. Datos cromatográficos del analito ácido 2-bromohexanoico-OMe.

		Temperatura (°C)				
		100	90	80	70	60
% CD	Parámetro					
0	k'	5,491	8,466	13,521	22,311	38,319
10	k'1	5,554	8,601	13,968	23,456	41,453
	k'2	5,627	8,807	14,503	24,903	45,605
	α	1,013	1,024	1,038	1,062	1,100
	Rs	<0,8	1,0	1,6	2,6	4,1
16	k'1	7,101	11,061	17,89	30,161	53,234
	k'2	7,226	11,371	18,674	32,188	58,712
	α	1,018	1,028	1,044	1,067	1,103
	Rs	<0,8	1,2	1,9	2,9	4,3
26	k'1	6,497	10,16	16,623	28,872	52,785
	k'2	6,723	10,706	17,939	32,355	62,38
	α	1,035	1,054	1,079	1,121	1,182
	Rs	1,2	2,2	3,1	4,6	

Tabla A2.15. Datos cromatográficos del analito ácido 3-hidroxibutanoico-OMe-TFAA.

		Temperatura (°C)					
		100	90	80	70	60	50
% CD	Parámetro						
0	k'	1,24	1,786	2,661	3,983	6,248	10,185
10	k'1	1,408	2,072	3,197	5,305	9,274	17,508
	k'2	1,408	2,147	3,377	5,77	10,498	20,894
	α		1,036	1,056	1,088	1,132	1,193
	Rs		0,9	1,6	2,6	3,5	5,0
16	k'1	1,603	2,399	3,768	6,186	10,723	19,872

	k'2	1,649	2,518	4,085	7,072	13,317	27,585
	α	1,029	1,050	1,084	1,143	1,242	1,388
	Rs	<0,8	1,6	3,0	5,2	8,4	9,9
26	k'1	1,508	2,285	3,655	6,195	11,139	22,599
	k'2	1,592	2,496	4,191	7,547	15,002	35,556
	α	1,056	1,092	1,147	1,218	1,347	1,573
	Rs	1,2	1,9	3,8	5,5	7,3	13,7

Tabla A2.16. Datos cromatográficos del analito ácido 2-aminobutírico-OMe-TFAA.

		Temperatura (°C)				
		100	90	80	70	60
% CD	Parámetro					
0	k'	4,573	7,274	12,076	20,859	37,74
10	k'1	4,74	7,763	13,439	24,391	47,195
	k'2	4,896	8,13	14,374	26,918	54,595
	α	1,033	1,047	1,070	1,104	1,157
	Rs	1,2	1,9	2,7	3,5	3,6
16	k'1	6,225	10,28	17,845	32,439	63,713
	k'2	6,471	10,885	19,144	36,032	74,542
	α	1,040	1,059	1,073	1,111	1,170
	Rs	1,6	2,5	2,6	3,0	3,6
26	k'1	6,35	10,952	20,132	38,697	81,428
	k'2	6,862	12,182	23,19	46,48	103,677
	α	1,081	1,112	1,152	1,201	1,273
	Rs	2,9	4,1	5,3	4,8	6,0

Tabla A2.17. Datos cromatográficos del analito leucina-OMe-TFAA.

		Temperatura (°C)		
		100	90	80
% CD	Parámetro			
0	k'		11,105	18,81
10	k'1		11,242	18,911
	k'2		11,242	19,296
	α			1,02
	Rs			<0,8
16	k'1		14,273	24,714
	k'2		14,498	25,309
	α		1,016	1,024
	Rs		<0,8	1,0
26	k'1		13,353	23,955
	k'2		13,83	25,102
	α		1,036	1,048
	Rs		1,4	1,9

Tabla A2.18. Datos cromatográficos del analito norleucina-OMe-TFAA.

		Temperatura (°C)		
		100	90	80
% CD	Parámetro			
0	k'		13,616	23,176
10	k'1		13,772	23,369
	k'2		13,772	23,81
	α			1,019
	Rs			<0,8

16	k'1	17,578	30,476	55,766
	k'2	17,818	31,142	57,551
	α	1,014	1,022	1,032
	Rs	<0,8	0,9	1,4
26	k'1	16,448	29,485	56,156
	k'2	16,949	30,72	59,479
	α	1,030	1,042	1,059
	Rs	1,2	1,7	2,3

Bibliografía

1. Caner, H., E. Groner, L. Levy, y I. Agranat, *Trends in the development of chiral drugs*. Drug Discovery Today, 2004. **9**(3): p. 105-110.
2. Blaser, H.U., F. Spindler, y M. Studer, *Enantioselective catalysis in fine chemicals production*. Applied Catalysis A: General, 2001. **221**: p. 119-143.
3. Gübitz, G. y M.G. Schmid, *Chiral separation by chromatographic and electromigration techniques. A review*. Biopharm Drug Dispos, 2001. **22**(7-8): p. 291-336.
4. Nuñez, C., M.E. Garcia-Rubino, A. Conejo-Garcia, O. Cruz-Lopez, M. Kimatrai, M.A. Gallo, A. Espinosa, y J.M. Campos, *Homochiral drugs: a demanding tendency of the pharmaceutical industry*. Curr Med Chem, 2009. **16**(16): p. 2064-74.
5. *FDA's policy statement for the development of new stereoisomeric drugs, in Chirality*. 1992. p. 338-40.
6. *Working parties on quality, safety and efficacy of medical products. Note for guidance: investigation of chiral active substances*, C.f.P.M. Products, Editor. 1993.
7. Agranat, I. y S.R. Wainschtein, *The strategy of enantiomer patents of drugs*. Drug Discovery Today, 2010. **15**(5-6): p. 163-170.
8. Agranat, I.I. y H. Caner, *Intellectual property and chirality of drugs*. Drug Discov Today, 1999. **4**(7): p. 313-321.
9. Xie, Y., Y.-M. Koo, y N.-H.L. Wang, *Preparative chromatographic separation: simulated moving and modified chromatography methods*. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2001. **6**: p. 363-375.
10. Rajendran, A., G. Paredes, y M. Mazzotti, *Simulated moving bed chromatography for the separation of enantiomers*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(4): p. 709-738.
11. Miller, L., C. Orihuela, R. Fronek, D. Honda, y O. Dapremont, *Chromatographic resolution of the enantiomers of a pharmaceutical intermediate from the milligram to the kilogram scale*. J Chromatogr A, 1999. **849**(2): p. 309-17.
12. Williams, K.L. y L.C. Sander, *Enantiomer separations on chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1997. **785**(1-2): p. 149-158.
13. Liu, Y., A.W. Lantz, y D.W. Armstrong, *High Efficiency Liquid and Super-/Subcritical Fluid-Based Enantiomeric Separations: An Overview*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2005. **27**(7): p. 1121 - 1178.
14. Zhang, A. y J. Nie, *Enantioselective synthesis of the female sex pheromone of the pink hibiscus Mealybug, *Maconellicoccus hirsutus**. J Agric Food Chem, 2005. **53**(7): p. 2451-5.
15. Maftouh, M., C. Granier-Loyaux, E. Chavana, J. Marini, A. Pradines, Y.V. Heyden, y C. Picard, *Screening approach for chiral separation of pharmaceuticals: Part III. Supercritical fluid chromatography for analysis and purification in drug discovery*. Journal of Chromatography A, 2005. **1088**(1-2): p. 67-81.

16. Amanullah, M. y M. Mazzotti, *Optimization of a hybrid chromatography-crystallization process for the separation of Tröger's base enantiomers*. Journal of Chromatography A, 2006. **1107**(1-2): p. 36-45.
17. Collins, A.N., G.N. Sheldrake, y J. Crosby, *Chirality in industry : the commercial manufacture and applications of optically active compounds*. 1992: Wiley. xiii, 409p.
18. Liese, A., K. Seelbach, y C. Wandrey, *Industrial biotransformations*. 2 ed. 2006, Weinheim, Chichester: Wiley-VCH. xiv, 556 p.
19. Patel, R.N., *Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries*. 2007, Boca Raton, FL: CRC Press. 893 p.
20. Schurig, V., *Separation of enantiomers by gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 2001. **906**(1-2): p. 275-299.
21. Dong, M.W., *Pharmaceutical Analysis*, in *Modern HPLC for practicing scientists*. 2006, Wiley-Interscience: Hoboken, N.J. p. 135-156.
22. Gil-Av, E., B. Feibush, y R. Charles-Sigler, *Separation of enantiomers by gas liquid chromatography with an optically active stationary phase*. Tetrahedron Letters, 1966. **7**(10): p. 1009-1015.
23. Gil-Av, E. y B. Feibush, *Resolution of enantiomers by gas liquid chromatography with optically active stationary phases. Separation on packed columns*. Tetrahedron Letters, 1967. **8**(35): p. 3345-3347.
24. Frank, H., G.J. Nicholson, y E. Bayer, *Rapid gas chromatographic separation of amino acid enantiomers with a novel chiral stationary phase*. Journal of Chromatographic Science, 1977. **15**(5): p. 174-178.
25. Frank, H., G.J. Nicholson, y E. Bayer, *Chiral Polysiloxanes for Resolution of Optical Antipodes*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1978. **17**(5): p. 363-365.
26. Bayer, E., *Chirale Erkennung von Naturstoffen an optisch aktiven Polysiloxanen = Caractérisation chirale de produits naturels sur des polysiloxanes optiquement actifs* Chiral recognition of natural products on optically active polysiloxane. Zeitschrift für Naturforschung. Teil b, Anorganische Chemie, Organische Chemie, 1983. **38**(10): p. 1281-1291.
27. Schurig, V., *Resolution of a chiral olefin by complexation chromatography on an optically active rhodium (I) complex*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1977. **16**(2): p. 110.
28. Schurig, V., W. Bürkle, K. Hintzer, y R. Weber, *Evaluation of nickel(II) bis[[alpha]-(heptafluorobutanoyl)-terpeneketonates] as chiral stationary phases for the enantiomer separation of alkyl-substituted cyclic ethers by complexation gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 1989. **475**(1): p. 23-44.
29. Schurig, V., D. Schmalzing, y M. Schleimer, *Enantiomer Separation on Immobilized Chirasil-Metal and Chirasil-Dex by Gas Chromatography and Supercritical Fluid Chromatography*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1991. **30**(8): p. 987-989.
30. Fischer, P., R. Aichholz, U. Bölz, M. Juza, y S. Krimmer, *Permethy-beta-cyclodextrin, Chemically Bonded to Polysiloxane: a Chiral Stationary Phase with*

- Wider Application Range for Enantiomer Separation by Capillary Gas Chromatography*. Angewandte Chemie International Edition in English, 1990. **29**(4): p. 427-429.
31. Vaton-Chanvrier, L., V. Peulon, Y. Combret, y J. Combret, *Synthesis, characterization and enantioselectivity of cholic acid-bonded phases for high performance liquid chromatography*. *Chromatographia*, 1997. **46**(11): p. 613-622.
 32. Bucaille, N., L. Vaton-Chanvrier, Y. Combret, y J.-C. Combret, *Cyclocholates as Chiral Selectors for Capillary Gas Chromatography - Effect of Temperature Conditioning on the Chromatographic Behavior of the Stationary Phase*. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1999. **22**(12): p. 671-678.
 33. Pfeiffer, J. y V. Schurig, *Enantiomer separation of amino acid derivatives on a new polymeric chiral resorc[4]arene stationary phase by capillary gas chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 1999. **840**(1): p. 145-150.
 34. Berthod, A., M.J. Ruiz-Ángel, y S. Carda-Broch, *Ionic liquids in separation techniques*. *Journal of Chromatography A*, 2008. **1184**(1-2): p. 6-18.
 35. Berthod, A., L. He, y D. Armstrong, *Ionic liquids as stationary phase solvents for methylated cyclodextrins in gas chromatography*. *Chromatographia*, 2001. **53**(1): p. 63-68.
 36. Ding, J., T. Welton, y D.W. Armstrong, *Chiral Ionic Liquids as Stationary Phases in Gas Chromatography*. *Analytical Chemistry*, 2004. **76**(22): p. 6819-6822.
 37. Yashima, E., *Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation*. *Journal of Chromatography A*, 2001. **906**(1-2): p. 105-125.
 38. Ikai, T., C. Yamamoto, M. Kamigaito, y Y. Okamoto, *Immobilized-type chiral packing materials for HPLC based on polysaccharide derivatives*. *Journal of Chromatography B*, 2008. **875**(1): p. 2-11.
 39. Yamamoto, C. y Y. Okamoto, *Practical Resolution of Enantiomers by High-Performance Liquid Chromatography*, in *Enantiomer Separation: Fundamentals and Practical Methods*, F. Toda, Editor. 2004, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands. p. 301-322.
 40. Chankvetadze, B., *Enantioseparations by using capillary electrophoretic techniques: The story of 20 and a few more years*. *Journal of Chromatography A*, 2007. **1168**(1-2): p. 45-70.
 41. Gübitz, G. y M.G. Schmid, *Chiral separation by capillary electromigration techniques*. *Journal of Chromatography A*, 2008. **1204**(2): p. 140-156.
 42. Witsuba, D. y V. Schurig, *The Separation of Enantiomers on Modified Cyclodextrins by Capillary Electrochromatography (CEC)*. *LC-GC Europe*, 2009. **22**(2): p. 60-69.
 43. Schurig, V. y H.-P. Nowotny, *Gas Chromatographic Separation of Enantiomers on Cyclodextrin Derivatives*. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1990. **29**(9): p. 939-957.
 44. König, W.A., *Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins*. 1992, Heidelberg: Hüthig.

45. König, W.A., *Enantioselective gas chromatography*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1993. **12**(4): p. 130-137.
46. Schlenk, H., J.L. Gellerman, y D.M. Sand, *Acylated Cyclodextrins as Stationary Phases for Comparative Gas Liquid Chromatography*. Analytical Chemistry, 1962. **34**(12): p. 1529-1532.
47. Tanaka, M., S. Kawano, y T. Shono, *Applicability of modified β -cyclodextrin stationary phases for gas chromatography*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1983. **316**(1): p. 54-55.
48. Casu, B., M. Reggiani, y G.R. Sanderson, *Methylated cycloamyloses (cyclodextrins) and their inclusion properties*. Carbohydrate Research, 1979. **76**(1): p. 59-66.
49. Smolková, E., H. Králová, S. Krýsl, y L. Feltl, *Study of the properties of cyclodextrins as stationary phases in gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 1982. **241**(1): p. 3-8.
50. Koscielski, T., D. Sybilska, y J. Jurczak, *Separation of [alpha]- and [beta]-pinene into enantiomers in gas-liquid chromatography systems via [alpha]-cyclodextrin inclusion complexes*. Journal of Chromatography A, 1983. **280**: p. 131-134.
51. Kościelski, T., D. Sybilska, S. Belniak, y J. Jurczak, *Gas-liquid chromatography system with α -cyclodextrin as an analytical tool for the studies of stereoselective hydrogenation of α -pinene*. Chromatographia, 1984. **19**(1): p. 292-296.
52. Koscielski, T., D. Sybilska, y J. Jurczak, *New chromatographic method for the determination of the enantiomeric purity of terpenoid hydrocarbons*. Journal of Chromatography A, 1986. **364**: p. 299-303.
53. Lindström, M., T. Norin, y J. Roeraade, *Gas chromatographic separations of monoterpene hydrocarbon enantiomers on [alpha]-cyclodextrin*. Journal of Chromatography A, 1990. **513**: p. 315-320.
54. Snopek, J., E. Smolková, T. Cserháti, K. Gahm, y A. Stalcup, *Cyclodextrins in analytical separation methods*. Pergamon, 1996. **3**: p. 516-571.
55. Schurig, V. y H.P. Nowotny, *Separation of enantiomers on diluted permethylated [beta]-cyclodextrin by high-resolution gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 1988. **441**(1): p. 155-163.
56. Nowotny, H.-P., D. Schmalzing, D. Wistuba, y V. Schurig, *Extending the scope of enantiomer separation on diluted methylated beta-cyclodextrin derivatives by high-resolution gas chromatography*. Journal of High Resolution Chromatography, 1989. **12**(6): p. 383-393.
57. König, W.A., S. Lutz, P. Mischnick-Lübbecke, B. Brassat, y G. Wenz, *Cyclodextrins as chiral stationary phases in capillary gas chromatography I. Pentylated [alpha]-cyclodextrin*. Journal of Chromatography, 1988. **447**: p. 193-197.
58. Armstrong, D.W., W. Li, C.D. Chang, y J. Pitha, *Polar-liquid, derivatized cyclodextrin stationary phases for the capillary gas chromatography separation of enantiomers*. Analytical Chemistry, 1990. **62**(9): p. 914-923.
59. Li, W.Y., H.L. Jin, y D.W. Armstrong, *2,6-Di-O-pentyl-3-O-trifluoroacetyl cyclodextrin liquid stationary phases for capillary gas chromatographic*

- separation of enantiomers*. Journal of Chromatography A, 1990. **509**(2): p. 303-324.
60. Schreier, P., A. Bernreuther, y M. Huffer, *Analysis of chiral organic molecules: methodology and applications*. illustrated ed, ed. M. Huffer. 1995, Berlin, Germany: Walter de Gruyter. 331.
 61. Schurig, V., *Chiral separations using gas chromatography*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2002. **21**(9-10): p. 647-661.
 62. Mayer, S., D. Schmalzing, M. Jung, y M. Schleimer, *A chiral test mixture for permethylated beta-cyclodextrin-polysiloxane gas-liquid chromatography phases : the schurig test mixture*. Vol. 10. 1992, Riverton, NJ, United States: Aster. 3.
 63. Keim, W., A. Köhnes, W. Meltzow, y H. Römer, *Enantiomer separation by gas chromatography on cyclodextrin chiral stationary phases*. Journal of High Resolution Chromatography, 1991. **14**(8): p. 507-529.
 64. Bicchi, C., G. Artuffo, A. D'Amato, G.M. Nano, A. Galli, y M. Galli, *Permethylated cyclodextrins in the GC separation of racemic mixtures of volatiles: Part 1*. Journal of High Resolution Chromatography, 1991. **14**(5): p. 301-305.
 65. König, W.A., *Collection of enantiomer separation factors obtained by capillary gas chromatography on chiral stationary phases*. Journal of High Resolution Chromatography, 1993. **16**(5): p. 312-323.
 66. König, W.A., *Collection of enantiomer separation factors obtained by capillary gas chromatography on chiral stationary phases*. Journal of High Resolution Chromatography, 1993. **16**(6): p. 338-352.
 67. König, W.A., *Collection of enantiomeric separation factors obtained by capillary gas chromatography on chiral stationary phases*. Journal of High Resolution Chromatography, 1993. **16**(10): p. 569-586.
 68. König, W.A., R. Krebber, y P. Mischnick, *Cyclodextrins as chiral stationary phases in capillary gas chromatography. Part V: Octakis(3-O-butryl-2,6-di-O-pentyl)-gamma-cyclodextrin*. Journal of High Resolution Chromatography, 1989. **12**(11): p. 732-738.
 69. Blum, W. y R. Aichholz, *Gas chromatographic enantiomer separation on tert-butyl dimethylsilylated beta-cyclodextrin diluted in PS-086. A simple method to prepare enantioselective glass capillary columns*. Journal of High Resolution Chromatography, 1990. **13**(7): p. 515-518.
 70. Dietrich, A., B. Maas, V. Karl, P. Kreis, D. Lehmann, B. Weber, y A. Mosandl, *Stereoisomeric flavor compounds part. LV: Stereodifferentiation of some chiral volatiles on heptakis(2,3-di-O-acetyl-6-O-tert-butyl dimethylsilyl)-beta-cyclodextrin*. Journal of High Resolution Chromatography, 1992. **15**(3): p. 176-179.
 71. Schurig, V. y M. Juza, *Approach to the thermodynamics of enantiomer separation by gas chromatography Enantioselectivity between the chiral inhalation anesthetics enflurane, isoflurane and desflurane and a diluted [gamma]-cyclodextrin derivative*. Journal of Chromatography A, 1997. **757**(1-2): p. 119-135.

72. Spánik, I., J. Krupcik, y V. Schurig, *Comparison of two methods for the gas chromatographic determination of thermodynamic parameters of enantioselectivity*. Journal of Chromatography A, 1999. **843**(1-2): p. 123-128.
73. Jung, M., D. Schmalzing, y V. Schurig, *Theoretical approach to the gas chromatographic separation of enantiomers on dissolved cyclodextrin derivatives*. Journal of Chromatography A, 1991. **552**: p. 43-57.
74. Schurig, V., D. Schmalzing, U. Mühleck, M. Jung, M. Schleimer, P. Mussche, C. Duvekot, y J.C. Buyten, *Gas chromatographic enantiomer separation on polysiloxane-anchored permethyl-beta-cyclodextrin (Chirasil-Dex)*. Journal of High Resolution Chromatography, 1990. **13**(10): p. 713-717.
75. Schurig, V., M. Jung, S. Mayer, M. Fluck, S. Negura, y H. Jakubetz, *Unified enantioselective capillary chromatography on a Chirasil-DEX stationary phase Advantages of column miniaturization*. Journal of Chromatography A, 1995. **694**(1): p. 119-128.
76. Vezzani, S., D. Pierani, P. Moretti, y G. Castello, *Automatic prediction of retention times in programmed-pressure isothermal gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 1999. **848**(1-2): p. 229-238.
77. Vezzani, S., P. Moretti, y G. Castello, *Fast and accurate method for the automatic prediction of programmed-temperature retention times*. Journal of Chromatography A, 1994. **677**(2): p. 331-343.
78. Clarke, E.C.W. y D.N. Glew, *Evaluation of thermodynamic functions from equilibrium constants*. Transactions of the Faraday Society, 1966. **62**: p. 539-547.
79. Castells, R.C., E.L. Arancibia, y A. Miguel Nardillo, *Regression against temperature of gas chromatographic retention data*. Journal of Chromatography A, 1990. **504**: p. 45-53.
80. Meyer, E.F., *On thermodynamics of solution by gas-liquid chromatography*. Journal of Chemical Education, 1973. **50**(3): p. 191.
81. Meyer, E.F. y F.A. Baiocchi, *Precision in thermodynamic properties of solution determined by gas-liquid chromatography*. Analytical Chemistry, 1977. **49**(7): p. 1029-1031.
82. Défayes, G., D.n.F. Fritz, T. Görner, G. Huber, C. De Reyff, y E.s. Kováts, *Organic solutes in paraffin solvents: Influence of the size of the solvent molecule on solution data. Dedicated to (Dr.) Günther Ohloff on the occasion of his 65th birthday*. Journal of Chromatography A, 1990. **500**: p. 139-184.
83. Riedo, F., D. Fritz, G. Tarján, y E.s. Kováts, *A tailor-made C87 hydrocarbon as a possible non-polar standard stationary phase for gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 1976. **126**: p. 63-83.
84. Reddy, K.S., J.C. Dutoit, y E.s. Kováts, *Pair-wise interactions by gas chromatography: I. Interaction free enthalpies of solutes with non-associated primary alcohol groups*. Journal of Chromatography A, 1992. **609**(1-2): p. 229-259.
85. González, F.R. y A.M. Nardillo, *Aspects of the elution order inversion by pressure changes in programmed-temperature gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 1997. **779**(1-2): p. 263-274.

86. Levkin, P.A., A. Levkina, H. Czesla, y V. Schurig, *Temperature-Induced Inversion of the Elution Order of Enantiomers in Gas Chromatography: N-Ethoxycarbonyl Propylamides and N-Trifluoroacetyl Ethyl Esters of α -Amino Acids on Chirasil-Val-C11 and Chirasil-Dex Stationary Phases*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(12): p. 4401-4409.
87. Levkin, P.A. y V. Schurig, *Apparent and true enantioselectivity of single- and binary-selector chiral stationary phases in gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 2008. **1184**(1-2): p. 309-322.
88. Schurig, V., *Resolution of enantiomers and isotopic compositions by selective complexation gas chromatography on metal complexes*. Chromatographia, 1980. **13**(5): p. 263-270.
89. Schurig, V. y R. Weber, *Manganese(II)-bis(3-heptafluorobutyryl-1R-camphorate): A versatile agent for the resolution of racemic cyclic ethers by complexation gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 1981. **217**: p. 51-70.
90. Schurig, V., R.C. Chang, A. Zlatkis, y B. Feibush, *Thermodynamics of molecular association by gas-liquid chromatography: [σ]-donor molecules and dimeric 3-trifluoroacetylcamphorates of Mn(II), Co(II) AND Ni(II)*. Journal of Chromatography A, 1974. **99**: p. 147-171.
91. Muhs, M.A. y F.T. Weiss, *Determination of Equilibrium Constants of Silver-Olefin Complexes Using Gas Chromatography*. Journal of the American Chemical Society, 1962. **84**(24): p. 4697-4705.
92. Purnell, J.H., *Gas chromatography*, A.B. Littlewood, Editor. 1967, Institute of Petroleum: London. p. 3.
93. Cvetanović, R.J., F.J. Duncan, W.E. Falconer, y R.S. Irwin, *Secondary Deuterium Isotope Effects on the Stability of the Silver Ion-Olefin Complexes1*. Journal of the American Chemical Society, 1965. **87**(9): p. 1827-1832.
94. De Ligny, C.L., T. Van 'T Verlaat, y F. Karthaus, *Determination of complex association constants from gas chromatographic data : II. Complexes of silver ions with substituted alkenes in ethylene glycol at 40°C*. Journal of Chromatography A, 1973. **76**(1): p. 115-124.
95. Schurig, V., *Practice and theory of enantioselective complexation gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 2002. **965**(1-2): p. 315-356.
96. Schurig, V. y R. Schmidt, *Extraordinary chiral discrimination in inclusion gas chromatography. Thermodynamics of enantioselectivity between a racemic perfluorodiether and a modified [γ]-cyclodextrin*. Journal of Chromatography A, 2003. **1000**(1-2): p. 311-324.
97. Pirkle, W.H., D.W. House, y J.M. Finn, *Broad spectrum resolution of optical isomers using chiral high-performance liquid chromatographic bonded phases*. Journal of Chromatography A, 1980. **192**(1): p. 143-158.
98. González, F.R., *Application of capillary gas chromatography to studies on solvation thermodynamics*. Journal of Chromatography A, 2004. **1037**(1-2): p. 233-253.

99. Zhang, Y., A.J. Dallas, y P.W. Carr, *Critical comparison of gas-hexadecane partition coefficients as measured with packed and open tubular capillary columns*. Journal of Chromatography A, 1993. **638**(1): p. 43-56.
100. Weckwerth, J.D., P.W. Carr, M.F. Vitha, y A. Nasehzadeh, *A Comparison of Gas-Hexadecane and Gas-Apolane Partition Coefficients*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(17): p. 3712-3716.
101. Poole, S.K., T.O. Kollie, y C.F. Poole, *Influence of temperature on the mechanism by which compounds are retained in gas-liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1994. **664**(2): p. 229-251.
102. Castells, C.B. y M.R. Reta, *Study of gas-liquid partitioning of alkane solutes in several organic solvents by using principal component analysis and linear solvation energy relationships*. Analytica Chimica Acta, 2003. **488**(1): p. 107-122.
103. Castells, C.B., D.I. Eikens, y P.W. Carr, *Headspace Gas Chromatographic Measurements of Limiting Activity Coefficients of Eleven Alkanes in Organic Solvents at 25 °C. 2. Accuracy and Precision*. Journal of Chemical & Engineering Data, 2000. **45**(2): p. 376-381.
104. Drozd, J. y J. Novák, *Quantitative head-space gas analysis by the standard additions method : Determination of hydrophilic solutes in equilibrated gas-aqueous liquid systems*. Journal of Chromatography A, 1977. **136**(1): p. 23-36.
105. Ettre, L., C. Welter, y B. Kolb, *Determination of gas-liquid partition coefficients by automatic equilibrium headspace-gas chromatography utilizing the phase ratio variation method*. Chromatographia, 1993. **35**(1): p. 73-84.
106. Chai, X.S. y J.Y. Zhu, *Simultaneous measurements of solute concentration and Henry's constant using multiple headspace extraction gas chromatography*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(16): p. 3481-3487.
107. Xu, B. y N.P.E. Vermeulen, *Preparation of wall-coated open-tubular capillary columns for gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 1988. **445**: p. 1-28.
108. González, F.R., J. Pérez-Parajón, y J.A. García-Domínguez, *Effects of solvent density on retention in gas-liquid chromatography: I. Alkanes solutes in polyethylene glycol stationary phases*. Journal of Chromatography A, 2002. **953**(1-2): p. 151-163.
109. González, F.R. y J. Pérez-Parajón, *Effects of solvent density on retention in gas-liquid chromatography: II. Polar solutes in poly(ethylene glycol) stationary phases*. Journal of Chromatography A, 2003. **989**(2): p. 265-276.
110. Kersten, B.R., S.K. Poole, y C.F. Poole, *Thermodynamic approach to the practical characterization of solvent strength and selectivity of commonly used stationary phases in gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 1989. **468**: p. 235-260.
111. Furton, K.G. y C.F. Poole, *Thermodynamic characteristics of solute-solvent interactions in liquid organic salt solvents, studied by gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 1987. **399**: p. 47-67.
112. Castells, R.C., L.M. Romero, y A.M. Nardillo, *Thermodynamic consideration of the retention mechanism in a poly(perfluoroalkyl ether) gas chromatographic*

- stationary phase used in packed columns.* Journal of Chromatography A, 1995. **715**(2): p. 299-308.
113. Castells, R.C., L.M. Romero, y A.M. Nardillo, *Thermodynamics of solutions of hydrocarbons in low molecular weight poly(isobutylene): a gas chromatographic study.* Macromolecules, 1996. **29**(12): p. 4278-4282.
 114. Abraham, M.H., I. Hamerton, J.B. Rose, y J.W. Grate, *Hydrogen bonding. Part 18. Gas-liquid chromatographic measurements for the design and selection of some hydrogen bond acidic phases suitable for use as coatings on piezoelectric sorption detectors.* Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 1991(9): p. 1417-1423.
 115. Inglese, A., F. Mavelli, R. De Lisi, y S. Milioto, *Group contributions to the infinite dilution partial molar volumes of alkanes, alcohols, and glycols in polar organic solvents.* Journal of Solution Chemistry, 1997. **26**(3): p. 319-336.
 116. Kratky, O., H. Leopold, y H. Stabinger, *Dichtemessungen an Flüssigkeiten und Gasen auf 10⁻⁶ g/cm³ bei 0.6 cm³ Präparatvolumen.* Z. angew. Phys, 1969. **27**: p. 273-277.
 117. Mainar, A.M., J. Pardo, J.I. Garcia, F.M. Royo, y J.S. Urieta, *Solubility of gases in fluoroorganic alcohols Part I. Solubilities of several non-polar gases in 1,1,1,3,3,3-hexafluoropropan-2-ol at 298.15 K and 101.33 kPa.* Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 1998. **94**(24): p. 3595-3599.
 118. Poole, C.F. y S.K. Poole, *Foundations of retention in partition chromatography.* Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(10): p. 1530-1550.
 119. Domínguez, J.A.G. y J.C. Díez-Masa, *Part A. Hold-up volume concept in column chromatography.* Pure and Applied Chemistry, 2001. **73**(6): p. 969-992.
 120. Smith, R.J., J.K. Haken, y M.S. Wainwright, *Estimation of dead time and calculation of Kovats indices.* Journal of Chromatography A, 1985. **334**: p. 95-127.
 121. Vezzani, S., G. Castello, y D. Pierani, *Measurement and prediction of dead times and column diameter in capillary gas chromatography by using air, methane and some solvents.* Journal of Chromatography A, 1998. **811**(1-2): p. 85-96.
 122. González, F.R. y L.G. Gagliardi, *Distribution coefficients of n-alkanes measured on wall-coated capillary columns.* Journal of Chromatography A, 2000. **879**(2): p. 157-168.
 123. Cahill, J.E. y D.H. Tracy, *Effects of Permeation of Helium through the Walls of Fused Silica Capillary GC Columns.* Journal of High Resolution Chromatography, 1998. **21**(10): p. 531-539.
 124. Bruno, T.J., *Simple and efficient methane-marker devices for chromatographic samples.* Journal of Chromatography A, 1996. **721**(1): p. 157-164.
 125. González, F.R., *Consistency of gas hold-up determinations.* Journal of Chromatography A, 1999. **832**(1-2): p. 165-172.
 126. Castello, G., S. Vezzani, y P. Moretti, *Theoretical calculation of gas hold-up time in capillary gas chromatography Influence of column, instrument parameters and analysis conditions and comp.* Journal of Chromatography A, 1994. **677**(1): p. 95-106.

127. Le Vent, S., *Homologous series methods for determining hold-up parameters in isothermal gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 1996. **752**(1-2): p. 173-181.
128. Castells, R.C., *Determination of gas-liquid partition coefficients by gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 2004. **1037**(1-2): p. 223-231.
129. Quintanilla-López, J.E., R. Lebrón-Aguilar, y J.A. García-Domínguez, *Hold-up time in gas chromatography: V. Dependence of the retention of n-alkanes on the chromatographic variables in isothermal gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 2000. **878**(1): p. 125-135.
130. Antonio García-Domínguez, J., J. Eduardo Quintanilla-López, y R. Lebrón-Aguilar, *The hold-up time in gas chromatography: III. Linearity of the plot of $\ln t_R'$ of the n-alkanes vs. carbon number questioned*. Journal of Chromatography A, 1998. **803**(1-2): p. 197-202.
131. Dreisbach, R.R., ed. *Physical properties of chemical compounds*. Advances in chemistry series, ed. R.F. Gould. Vol. 15, 22, 29. 1955, American Chemical Society: Washington, D.C.
132. Khasanshin, T.S. y A.P. Shchemelev, *The Thermodynamic Properties of n-Tetradecane in Liquid State*. High Temperature, 2002. **40**(2): p. 207-211.
133. Osorio Grisales, J., P.J. Lebed, S. Keunchkarian, F.R. González, y C.B. Castells, *Permethyated [beta]-cyclodextrin in liquid poly(oxyethylene) as a stationary phase for capillary gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 2009. **1216**(40): p. 6844-6851.
134. Osorio Grisales, J., *Desarrollo de capilares conteniendo derivados de β -ciclodextrina como fases estacionarias quirales para cromatografía gaseosa capilar in Facultad de Ciencias Exactas*. 2010, Universidad Nacional de La Plata: La Plata. p. 129.
135. Tascón, M., *Determinación de coeficientes de partición gas-líquido en columnas capilares. Sistemas alcanoles-escualano*, in Facultad de Ciencias Exactas. 2010, Universidad Nacional de La Plata: La Plata. p. 38.
136. Harada, A. y M. Kamachi, *Complex formation between poly(ethylene glycol) and α -cyclodextrin*. Macromolecules, 1990. **23**(10): p. 2821-2823.
137. Harada, A. y M. Kamachi, *Complex formation between cyclodextrin and poly(propylene glycol)*. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1990(19): p. 1322-1323.
138. Okumura, H., M. Okada, Y. Kawaguchi, y A. Harada, *Complex Formation between Poly(dimethylsiloxane) and Cyclodextrins: New Pseudo-Polyrotaxanes Containing Inorganic Polymers*. Macromolecules, 2000. **33**(12): p. 4297-4298.
139. Okumura, H., Y. Kawaguchi, y A. Harada, *Preparation and Characterization of Inclusion Complexes of Poly(dimethylsiloxane)s with Cyclodextrins*. Macromolecules, 2001. **34**(18): p. 6338-6343.
140. Porbeni, F.E., E.M. Edeki, I. Dan Shin, y A.E. Tonelli, *Formation and characterization of the inclusion complexes between poly(dimethylsiloxane) and polyacrylonitrile with [gamma]-cyclodextrin*. Polymer, 2001. **42**(16): p. 6907-6912.

141. Sicoli, G., Z. Jiang, L. Jicsinsky, y V. Schurig, *Modified Linear Dextrins (acyclodextrins) as New Chiral Selectors for the Gas-Chromatographic Separation of Enantiomers*13. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005. **44**(26): p. 4092-4095.
142. Sicoli, G., F. Pertici, Z. Jiang, L. Jicsinszky, y V. Schurig, *Gas-chromatographic approach to probe the absence of molecular inclusion in enantioseparations by carbohydrates. Investigation of linear dextrins (acyclodextrins) as novel chiral stationary phases*. *Chirality*, 2007. **19**(5): p. 391-400.
143. Uccello-Barretta, G., F. Balzano, F. Pertici, L. Jicsinszky, G. Sicoli, y V. Schurig, *External vs. Internal Interactions in the Enantiodiscrimination of Fluorinated alpha-Amino Acid Derivatives by Heptakis[2,3-di-O-acetyl-6-O-(tert-butylidimethylsilyl)]-beta-cyclodextrin, a Powerful Chiral Solvating Agent for NMR Spectroscopy*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2008. **2008**(11): p. 1855-1863.
144. Gotmar, G., T. Fornstedt, y G. Guiochon, *Peak tailing and mass transfer kinetics in linear chromatography: Dependence on the column length and the linear velocity of the mobile phase*. *Journal of Chromatography A*, 1999. **831**(1): p. 17-35.
145. Conder, J.R., *Peak distortion in chromatography. Part 1: Concentration-dependent behavior*. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1982. **5**(7): p. 341-348.
146. Conder, J.R., *Peak distortion in chromatography. Part 2: Kinetically controlled factors*. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1982. **5**(8): p. 397-403.
147. Conder, J.R. y C.L. Young, *Physicochemical measurement by gas chromatography*. 1979, Chichester ; New York: Wiley. xix, 632 p.
148. Husek, P., *Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids*. *Journal of Chromatography A*, 1991. **552**: p. 289-299.
149. Fornstedt, T., G. Götmar, M. Andersson, y G. Guiochon, *Dependence on the Mobile-Phase pH of the Adsorption Behavior of Propranolol Enantiomers on a Cellulase Protein Used as the Chiral Selector*. *Journal of the American Chemical Society*, 1999. **121**(6): p. 1164-1174.
150. Fornstedt, T., P. Sajonz, y G. Guiochon, *Thermodynamic Study of an Unusual Chiral Separation. Propranolol Enantiomers on an Immobilized Cellulase*. *Journal of the American Chemical Society*, 1997. **119**(6): p. 1254-1264.
151. Venema, A., H. Henderiks, y R.v. Geest, *The enantioselectivity of modified cyclodextrins: Studies on interaction mechanisms*. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1991. **14**(10): p. 676-680.
152. Venema, A. y P.J.A. Tolsma, *Enantiomer separation with capillary gas chromatography columns coated with cyclodextrins. Part I: Separation of enantiomeric 2-substituted propionic acid esters and some lower alcohols with permethylated beta-cyclodextrin*. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1989. **12**(1): p. 32-34.
153. Dietrich, A., B. Maas, G. Brand, V. Karl, A. Kaunzinger, y A. Mosandl, *Stereoisomeric flavor compounds, part LX: Diluted modified cyclodextrins as*

- chiral stationary phases - the influence of the polysiloxane solvent.* Journal of High Resolution Chromatography, 1992. **15**(11): p. 769-772.
154. Bicchi, C., G. Artuffo, A. D'Amato, V. Manzin, A. Galli, y M. Galli, *Cyclodextrin derivatives for the GC separation of racemic mixtures of volatile compounds. Part VI: The influence of the diluting phase on the enantioselectivity of 2,6-di-O-methyl-3-O-pentyl-beta-cyclodextrin.* Journal of High Resolution Chromatography, 1993. **16**(4): p. 209-214.
 155. Dietrich, A., B. Maas, y A. Mosandl, *Diluted modified cyclodextrins as chiral capillary gas chromatographic stationary phases: Influence of the polysiloxane solvents on enantioselectivity and column efficiency.* Journal of Microcolumn Separations, 1994. **6**(1): p. 33-42.
 156. Kobor, F. y G. Schomburg, *6-tert-Butyldimethylsilyl-2,3-dimethyl-alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrins, dissolved in polysiloxanes, as chiral selectors for gas chromatography. Influence of selector concentration and polysiloxane matrix polarity on enantioselectivity.* Journal of High Resolution Chromatography, 1993. **16**(12): p. 693-699.
 157. Hardt, I. y W.A. König, *Diluted versus undiluted cyclodextrin derivatives in capillary gas chromatography and effect of linear carrier gas velocity, column temperature and length on enantiomer separation.* Journal of Microcolumn Separations, 1993. **5**: p. 35-40.
 158. Koppenhoefer, B. y E. Bayer, *Chiral recognition in the resolution of enantiomers by GLC.* Chromatographia, 1984. **19**(1): p. 123-130.
 159. Koppenhoefer, B. y B. Lin, *Thermodynamic properties of enantiomers of underivatized diols versus the cyclic carbonates in gas chromatography on chirasil-val.* Journal of Chromatography A, 1989. **481**: p. 17-26.
 160. Schurig, V., J. Ossig, y R. Link, *Evidence for a temperature dependent reversal of the enantioselectivity in complexation gas chromatography on chiral phases.* Angewandte Chemie International Edition in English, 1989. **28**(2): p. 194-196.
 161. Watabe, K., R. Charles, y E. Gil-Av, *Temperature dependent inversion of elution sequence in the resolution of alpha-amino acid enantiomers on chiral diamide selectors.* Angewandte Chemie International Edition in English, 1989. **28**(2): p. 192-194.
 162. Schurig, V. y F. Betschinger, *Metal-mediated enantioselective access to unfunctionalized aliphatic oxiranes: prochiral and chiral recognition.* Chemical Reviews, 1992. **92**(5): p. 873-888.
 163. Stringham, R.W. y J.A. Blackwell, *"Entropically Driven" Chiral Separations in Supercritical Fluid Chromatography. Confirmation of Isoelution Temperature and Reversal of Elution Order.* Analytical Chemistry, 1996. **68**(13): p. 2179-2185.
 164. Cabrera, K. y D. Lubda, *Influence of temperature on chiral high-performance liquid chromatographic separations of oxazepam and prominal on chemically bonded [beta]-cyclodextrin as stationary phase.* Journal of Chromatography A, 1994. **666**(1-2): p. 433-438.
 165. Castells, C. y P. Carr, *A study of the thermodynamics and influence of temperature on chiral high-performance liquid chromatographic separations*

- using cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) coated zirconia stationary phases. Chromatographia, 2000. 52(9): p. 535-542.*
166. Jönsson, S., A. Schön, R. Isaksson, C. Pettersson, y G. Pettersson, *An unexpected temperature effect obtained on enantiomer separation using CBH i-silica as a chiral stationary phase: Increase in retention and enantioselectivity at elevated column temperature: A chromatographic and microcalorimetric study. Chirality, 1992. 4(8): p. 505-508.*
167. Balmér, K., P.-O. Lagerström, B.-A. Persson, y G. Schill, *Reversed retention order and other stereoselective effects in the separation of amino alcohols on Chiralcel OD. Journal of Chromatography A, 1992. 592(1-2): p. 331-337.*
168. Davankov, V.A., *Resolution of racemates by ligand-exchange chromatography, in Advances in Chromatography, J.C. Giddings, Editor. 1980, CRC Press: New York. p. 139-195.*
169. Vries, N.K.d., B. Coussens, R.J. Meier, y G. Heemels, *The separation of enantiomers on modified cyclodextrin columns: Measurements and molecular modeling. Journal of High Resolution Chromatography, 1992. 15(8): p. 499-504.*