



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

***Trabajo de Tesis Doctoral***

***Desarrollo de columnas capilares quirales  
para su empleo en cromatografía de gases.  
Aplicación a la separación de contaminantes  
ambientales quirales***

---

***Tesista: Fiorella Menestrina***

***Directora: Cecilia Castells***

***Co-director: Jaiver Osorio Grisales***

***Año: 2018***

El presente trabajo de Tesis fue realizado en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Cecilia Castells y la co-dirección del Dr. Jaiver Osorio Grisales, para obtener el grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas.

## Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer especialmente a la Dra. Cecilia Castells por haber dirigido este trabajo, por su apoyo constante, tiempo y dedicación. Gracias por guiarme en todo momento y enseñarme tanto a lo largo de estos años.

Quiero agradecer al Dr. Jaiver Osorio por su aporte, experiencia y enseñanza brindada para mi formación desde un principio.

A la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), por la educación pública y gratuita, posibilitando mis estudios de grado y de posgrado.

Al CONICET, por el financiamiento, facilitando la realización de esta tesis.

Al Dr. Héctor Di Loreto, por su tiempo dedicado desinteresadamente para sintetizar y amablemente brindarnos los pesticidas utilizados en el presente trabajo.

A mis compañeros y amigos que me ha dado el LIDMA: Romi, Car, Gi, Estercita, Juan Nico, Agus, Marcos, Leo, Lilian, Sonia, Mario, Brenda y Leidy. Gracias a todos y cada uno de ustedes por los hermosos momentos compartidos durante estos años.

A mis amigos, especialmente a Yani, Mari, Nati y Juli, por estar siempre a pesar de las distancias.

A mis hermanos y mis cuñadas, Juan, Nico, Mati, Anita y Pata, por apoyarme, mimarme y cuidarme en todo momento.

A mis sobrinos Pedro, Genaro y Mateo. Gracias por llenarme de alegría y de amor día a día.

A mis padres, quienes son mi ejemplo de vida y mi gran apoyo. Gracias a ustedes llegué hasta acá y soy quien soy. ¡Gracias!

A Piero, mi amor, amigo y compañero, quien está a mi lado día tras día. Gracias por darme confianza, apoyo constante y por tu paciencia sobre todo en la última etapa.

¡muchas gracias!

# Índice

Objetivo general.....	1
Objetivos específicos .....	1
<b>Capítulo 1. Introducción general</b>	
1.1 Quiralidad .....	3
1.2 La importancia de la quiralidad .....	4
1.3 Separación de enantiómeros .....	6
1.4 Clasificación de las fases estacionarias quirales.....	8
1.4.1 Derivados de aminoácidos y diamidas .....	8
1.4.2 Complejos metálicos quirales .....	10
1.4.3 Líquidos iónicos.....	11
1.4.4 Redes organometálicas .....	12
1.4.5 Materiales basados en sílica mesoporosa quiral .....	14
1.4.6 Ciclodextrinas .....	14
1.4.6.1 Ciclodextrinas nativas.....	16
1.4.6.2 Ciclodextrinas derivatizadas .....	16
1.4.6.2.1 Soluciones de derivados de ciclodextrinas .....	19
1.5 Referencias.....	21
<b>Capítulo 2. Materiales y métodos</b>	
2.1 Materiales .....	29
2.1.1 Columnas capilares quirales .....	29
2.1.2. Reactivos y solventes .....	30
2.1.3 Analitos .....	30
2.2. Métodos .....	34
2.2.1. Construcción de las columnas capilares.....	34
2.2.2. Estudio de la estabilidad en el tiempo.....	36
2.2.3. Hidrólisis de pesticidas.....	36
2.2.4 Reacciones de derivatización.....	37
2.2.4.1 Pesticidas .....	37
2.2.4.2 Aminoácidos .....	38
2.2.5 Medidas de densidad.....	39
2.2.6 Determinación de la relación de fases y espesor de la fase estacionaria depositada.....	39
2.2.7 Instrumentación.....	40
2.2.8 Determinación del tiempo muerto.....	41
2.2.9 Incubación de metalaxil en suelo .....	41

2.2.10 Procedimiento de extracción de metalaxil y metalaxil ácido en suelo.....	41
2.3 Referencias.....	43
<b>Capítulo 3. Determinación de constantes de asociación selector-enantiómero entre octakis(6-O-tert-butil-dimetilsilil-2,3-di-O-acetil)-<math>\gamma</math>-ciclodextrina y derivados de aminoácidos</b>	
3.1 Objetivo.....	45
3.2 Marco teórico.....	46
3.2.1 Constante de asociación selector-enantiómero .....	46
3.2.2 Selectividad verdadera y selectividad aparente .....	50
3.2.3 Influencia de la temperatura en la enantioselectividad .....	51
3.3 Resultados y discusión .....	53
3.3.1 Densidad de las fases estacionarias .....	53
3.3.2 Características físicas y cromatográficas de las columnas.....	56
3.3.2.1 Relación de fases $\beta$ y espesor de film .....	56
3.3.2.2 Tiempo muerto .....	56
3.3.2.3 Eficiencia de las columnas.....	59
3.3.2.4 Capacidad de enantiorreconocimiento .....	59
3.3.2.5 Estudio de la estabilidad en el tiempo.....	60
3.3.3 Relación entre enantioselectividad y concentración del selector quiral .....	62
3.3.4 Constantes de asociación enantiómero-selector quiral .....	66
3.3.5 Selectividad verdadera y selectividad aparente .....	70
3.3.6 Modelo del incremento de retención.....	73
3.3.7 Influencia de la temperatura en la enantioselectividad .....	79
3.4 Conclusiones parciales.....	87
3.5. Referencias.....	89
<b>Capítulo 4. Influencia del polímero empleado para la disolución del selector quiral en la enantioseparación de compuestos de baja volatilidad</b>	
4.1 Objetivo.....	92
4.2 Introducción.....	93
4.2.1 Determinación de los pesticidas.....	93
4.3 Resultados y discusión .....	95
4.3.1 Efecto de la temperatura.....	95
4.3.2 Mediciones cromatográficas .....	98
4.3.3. Comparación de los resultados obtenidos con enantioseparaciones de estos pesticidas reportados en literatura.....	103
4.4 Conclusiones parciales.....	107

4.5 Referencias.....	108
<b>Capítulo 5. Estudio de degradación del funguicida Metalaxil</b>	
5.1 Objetivo.....	111
5.2 Introducción.....	112
5.2.1 Diseño de experimentos.....	113
5.2.2 Diseño factorial.....	113
5.3 Resultados y discusión.....	114
5.3.1 Enantiorresolución simultánea de metalaxil y metalaxil ácido.....	114
5.3.2 Optimización de la extracción en suelos mediante un diseño $2^k$ .....	116
5.3.3 Estudio de degradación.....	120
5.4 Conclusiones parciales.....	123
5.5 Referencias.....	124
<b>Capítulo 6. Conclusiones generales.....</b>	<b>127</b>
<b>Anexos</b>	
A.I- Lista de símbolos.....	130
A.II- Datos de la calibración del picnómetro utilizando n-tetradecano y n-hexadecano.....	132
A.III- Factores de retención para el primer enantiómero eluído ( $k_L$ ), enantioselectividad aparente ( $\alpha_{ap}$ ) y factores de resolución (Rs) para todos los derivados de aminoácidos en todas las columnas a las distintas temperaturas.....	133
A.IV- Resultados de la regresión de Kap versus concentración, constantes de asociación enantioméricas estimadas $K_{SXL}$ y $K_{SXD}$ y factores de enantioselectividad absoluto $\alpha_{D/L}$ .....	138
A.V- Unidades originales de las variables en el diseño $2^k$ .....	143
A.VI- Matriz del diseño codificado para los efectos principales y las interacciones dobles y las respuestas obtenidas.....	144
A-VII- Tabla de ANAVA para el metalaxil ácido.....	145
A-VIII- Tabla de ANAVA para el metalaxil.....	146

## Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue el desarrollo de columnas capilares conteniendo fases estacionarias quirales para su uso en cromatografía de gases (CG) que puedan ser usadas en el análisis enantiomérico de múltiples familias químicas de compuestos, principalmente sustancias de interés ambiental.

## Objetivos específicos

- ✓ Desarrollo de columnas capilares conteniendo como fase estacionaria derivados  $\beta$ - y de  $\gamma$ -ciclodextrinas disueltos en un solvente polimérico aquiral y depositados sobre la pared interna del capilar en películas de espesor controlado.
- ✓ Caracterización de las propiedades cromatográficas de los capilares preparados: eficiencia, selectividad, estabilidad y reproducibilidad.
- ✓ Medición de constantes de asociación enantiómero/selector a distintas temperaturas. Determinación de la verdadera enantioselectividad sin el uso de *hipótesis ad-hoc*. Determinación de las propiedades termodinámicas que describen estas asociaciones.
- ✓ 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.
- ✓ Estudio de la influencia ejercida por la matriz polimérica aquiral sobre la enantioselectividad aparente para distintos racematos y, eventualmente, en el mecanismo de enantiorreconocimiento.
- ✓ Aplicación a la separación y análisis enantiomérico de contaminantes ambientales quirales.

# Capítulo 1

---

Introducción general

## 1.1 Quiralidad

Los estereoisómeros son isómeros (del griego isos: igual y meros: parte) que tienen fórmulas moleculares idénticas y sus átomos presentan los mismos enlaces, pero su disposición en el espacio es distinta, es decir, difieren en la orientación espacial de sus átomos. Pueden subdividirse en dos categorías generales: en diastereómeros y enantiómeros. Los enantiómeros o isómeros ópticos son moléculas que se caracterizan por ser imágenes especulares no superponibles entre sí independientemente de la operación de simetría que se les aplique, ya que no presentan un plano de simetría. A estas moléculas se las describe como quirales, término que fue impuesto por Lord Kelvin en 1904 [1], y proviene de la palabra griega *kheir* que significa mano, en alusión a las manos de una persona que son imágenes especulares una de la otra, pero que no se pueden superponer. En la Figura 1.1 se muestra un ejemplo del par enantiomérico del aminoácido alanina y su comparación con las manos de una persona.

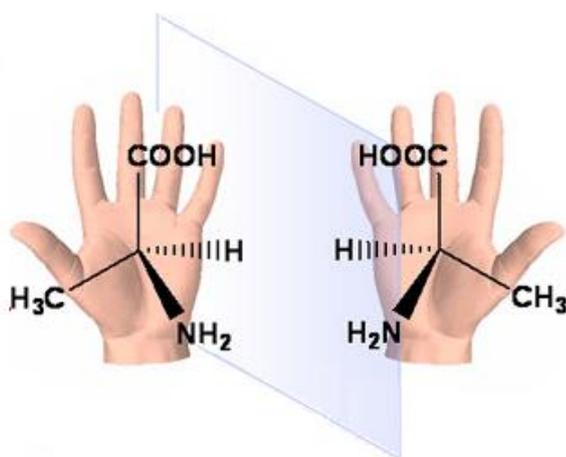


Figura 1.1. Imagen especular no superponible de las manos, comparación con los enantiómeros del aminoácido alanina.

La causa más común de quiralidad en una molécula orgánica es la presencia de un átomo de carbono unido con cuatro grupos distintos. Además, otros elementos como azufre, nitrógeno, fósforo y boro producen centros quirales estables y algunas moléculas con impedimento a la libre rotación de sus átomos también presentan quiralidad. A estos átomos se les suele denominar centros quirales.

Desde el punto de vista químico, existe una diferencia crucial entre un enantiómero y un diasterómero. Los diasterómeros tienen propiedades fisicoquímicas diferentes como punto de fusión, momento dipolar, espectro de resonancia magnética nuclear, comportamiento de cristalización, diferente reactividad química, por lo que generalmente, son fáciles de separar empleando técnicas clásicas o utilizando técnicas cromatográficas convencionales. Sin embargo, los enantiómeros presentan las mismas propiedades fisicoquímicas y sólo se comportan de manera diferente en un entorno quiral. A la mezcla de dos enantiómeros en proporciones equimoleculares, y que por lo tanto resulta ópticamente inactiva, se la denomina mezcla racémica o racemato.

## 1.2 La importancia de la quiralidad

El concepto de quiralidad es fundamental en las moléculas biológicas, debido a que la naturaleza consiste en un sistema quiral. Muchas de las moléculas que constituyen los organismos vivos son quirales y, en la mayoría de los casos, solo uno de los dos enantiómeros es el que se presenta en la naturaleza. Poseen centros quirales los monosacáridos, y los aminoácidos naturales constitutivos de proteínas y/o biomoléculas, las que conservan el sentido de la quiralidad de los monómeros que las componen. Las proteínas de los seres vivos están constituidas de forma exclusiva por *L*-aminoácidos, mientras que los hidratos de carbono están formados por unidades de azúcar exclusivamente en la forma enantiomérica *D*. Los procesos fisiológicos esenciales son, en consecuencia, homoquirales, es decir exhiben 100% de estereoselectividad y solo involucran uno de los posibles estereoisómeros de la molécula. Cuando compuestos exógenos son introducidos en un ser vivo, los procesos fisiológicos exhiben un alto grado de discriminación quiral, y los efectos producidos por diferentes estereoisómeros son frecuentemente muy diferentes como consecuencia de su interacción enantioespecífica con el receptor quiral que puede ser una proteína, una enzima, un receptor de membrana, etc.

La quiralidad es muy importante en el medio ambiente y en algunas industrias, particularmente en las industrias farmacéutica, agroquímica, alimentaria, de producción de bebidas y petroquímica.

Al ser los sistemas biológicos enantioselectivos, la incorporación de una sustancia racémica con propiedades farmacológicas podrá actuar de forma distinta según las interacciones que puedan establecerse entre el receptor y cada uno de los enantiómeros,

pudiendo uno de ellos poseer la propiedad farmacológica y terapéutica buscada y el segundo enantiómero presentar varias alternativas, como ser inactivo, que la propiedad terapéutica se presente en menor intensidad, una acción antagonista, un efecto no deseado o tóxico o, inclusive, una acción farmacológica totalmente diferente [2-4].

En la industria farmacéutica, la existencia de la quiralidad adquirió especial importancia a raíz de la tragedia de la talidomida en los años sesenta [5]. La talidomida se introdujo al mercado a finales de los años cincuenta como un sedante, en su forma racémica. Incluso cuando se lo aplicó en la forma enantiomérica pura, se demostró la racemización de la molécula *in vivo*, sin evitar las malformaciones de embriones cuando se administraba talidomida a mujeres durante el embarazo [6]. Además de crear una conciencia general sobre la quiralidad y sus implicancias en la industria farmacéutica, la tragedia de la talidomida dio lugar a controles más estrictos para los fármacos recién desarrollados. Para proteger a los pacientes de efectos no deseados, nocivos y de los efectos secundarios, tiene que ser tenida en cuenta y probada la acción farmacológica de cada enantiómero individual [7].

En el caso de la industria agroquímica se presenta una situación similar. Muchos de las sustancias químicas utilizadas como pesticidas (herbicidas, insecticidas, fungicidas, etc.) son quirales. Sin embargo, con el fin de abaratar los costos, frecuentemente son utilizados como mezclas racémicas. Como consecuencia se pueden dar las siguientes situaciones: i- la biodegradación de los enantiómeros de los pesticidas con frecuencia pueden presentar diferente cinética, ii- la actividad biológica del pesticida se presente exclusivamente en uno de los enantiómeros actuando de esta forma como pesticida, mientras que el otro no presenta la actividad deseada y puede incluso ser tóxico para diferentes organismos.

En la industria alimenticia, muchos de los productos químicos utilizados para producir sabores y fragancias son quirales. Algunos ejemplos de las diferencias organolépticas que se pueden presentar son los siguientes: 1- El enantiómero L de la asparagina tiene sabor amargo, mientras que, la D-asparagina tiene sabor dulce; 2- El (L,L)-aspartamo es un edulcorante artificial 200 veces más dulce que el azúcar y se utiliza de manera muy habitual en alimentación, sin embargo, el (D,D)-aspartamo tiene sabor amargo; y 3- El isómero D del terpeno carvona posee aroma a menta, mientras que el isómero L produce el olor característico del comino.

Es por ello que, la quiralidad es un concepto importante en diversos campos de la química, y su significado se ha reconocido desde hace mucho tiempo en relación con la actividad biológica relativa de los isómeros individuales de compuestos naturales y drogas sintéticas.

### 1.3 Separación de enantiómeros

Aunque existen diversos métodos de separación de compuestos quirales como, por ejemplo, separación por cristalización, por formación de diastereoisómeros, resolución enzimática, resonancia magnética nuclear, etc., los métodos cromatográficos y electroforéticos son los más utilizados. Estos métodos incluyen cromatografía en capa fina [8], cromatografía de fluidos supercríticos [9,10], cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [11], cromatografía capilar/nano-líquida [12], electroforesis capilar (CE) [13] y, cromatografía de gases (CG) [14-16].

La estrategia para la separación de enantiómeros utilizando métodos cromatográficos consiste en la formación de complejos diastereoméricos, lo cual se puede llevar a cabo por dos vías. Por un lado, de forma indirecta, mediante la formación de los complejos por reacción química de los enantiómeros con un reactivo quiral y su posterior separación en una columna acquiral convencional [17]. Si se selecciona el método indirecto para separar enantiómeros se deben tener en cuenta las siguientes limitaciones: i) el método requiere la presencia de un grupo funcional adecuado presente en la molécula enantiomérica para la reacción, ii) el reactivo derivatizante debe poseer una elevada pureza enantiomérica, iii) la posibilidad de racemización durante la derivatización, y iv) una potencial diferencia en la cinética de reacción de ambos enantiómeros con el agente quiral podría dar lugar a resultados erróneos [18,19].

En el método directo, los enantiómeros son separados mediante la formación de complejos transitorios reversibles con un selector quiral, el cual puede formar parte de la fase móvil, y en este caso la separación es llevada a cabo utilizando una columna acquiral, o bien formando parte de la fase estacionaria.

Para lograr una separación útil, los complejos deben diferir en su estabilidad, consecuentemente tendrán tiempos de retención diferentes y, además, la formación/disociación del complejo debe ser rápida en la escala de tiempo cromatográfico para minimizar el ensanchamiento de ambas bandas y conseguir una resolución adecuada. Excepto para analitos muy polares, la derivatización no es un requisito. Este método es el más utilizado en cromatografía gaseosa por su versatilidad.

Para explicar la formación de complejos diastereómeros entre los enantiómeros y el selector quiral, se utiliza el modelo de interacción de tres puntos, propuesto por Easson y Stedman [20]. Se trata de un modelo cualitativo que postula que deben existir, al menos, tres tipos diferentes de interacciones que permitan una localización espacial específica entre

selector y soluto. Las interacciones ocurren generalmente por enlaces de hidrógeno, transferencia de carga ( $\pi$ - $\pi$ ), interacciones dipolo-dipolo, interacciones hidrofóbicas o electrostáticas entre los sustituyentes del selector quiral y los enantiómeros.

En la Figura 1.2 puede verse como el enantiómero I forma una interacción de tres puntos con el selector quiral representada por las líneas de puntos mientras que el enantiómero II puede formar solo una interacción de dos puntos porque el sustituyente 2 está situado en una posición distante con el grupo complementario del selector quiral. Hipotéticamente formará un complejo menos estable y en consecuencia menos retenido.

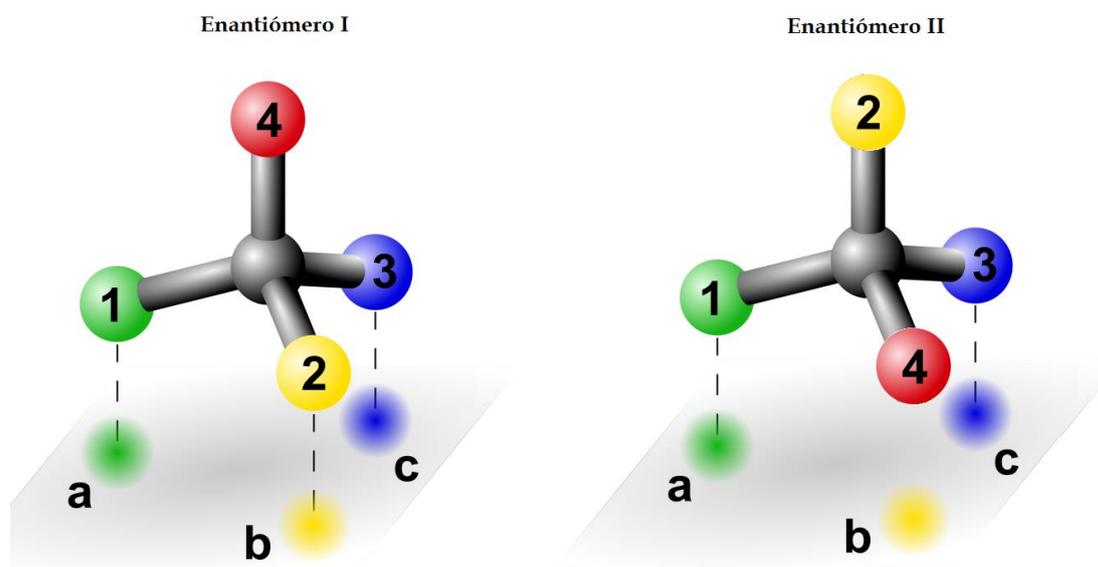


Figura 1.2. Modelo de interacción de tres puntos

La cromatografía gaseosa, presentada en 1952 por Martin y James [21], se ha convertido hoy en día en una de las técnicas analíticas más importantes y ampliamente aplicadas en la ciencia de la separación cuando se trata de analitos volátiles. Uno de los hitos cruciales en el desarrollo de la cromatografía gaseosa, introducido en el año 1966 por Gil-Av, Feibush y Sigler [22], fue la descripción de la primera separación directa de enantiómeros utilizando una fase estacionaria quiral. Desde entonces, se han hecho muchos esfuerzos para desarrollar fases estacionarias conteniendo selectores quirales de diferente naturaleza con el fin de aumentar la universalidad de una columna quiral.

Tradicionalmente las fases estacionarias de CG quiral se clasifican en tres categorías: derivados de aminoácidos y diamidas; complejos metálicos quirales; y, ciclodextrina y sus derivados. Más recientemente, algunos otros selectores quirales, como los líquidos iónicos

quirales, redes organometálicas quirales, y materiales basados en sílica mesoporosa quiral, se han utilizado para la separación enantiomérica en CG.

## 1.4 Clasificación de las fases estacionarias quirales

### 1.4.1 Derivados de aminoácidos y diamidas

La primera separación quiral directa se ha realizado sobre capilares de vidrio de 100 m de longitud y 250  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, recubiertos con N-trifluoroacetil-L-isoleucina-O-lauriléster (Figura 1.3) con la cual se llevó a cabo la separación de N-trifluoroacetil alquil ésteres de los  $\alpha$ -aminoácidos proteinogénicos alanina, valina y leucina, isotérmicamente a 90°C, con un tiempo de análisis de un poco más de 4 horas [22]. Luego los mismos autores lograron separaciones quirales utilizando columnas empacadas con cicloéster de N-trifluoroacetil-L-valil-valina, considerándose como el primer enfoque usando una columna enantioselectiva empacada para la separación semipreparativa de enantiómeros por cromatografía gaseosa [23]. En estos casos el reconocimiento quiral se basa en enlaces de hidrógeno estereoselectivos entre las funciones  $\text{NH} \cdots \text{F}$  y  $\text{NH} \cdots \text{O} = \text{C}$ .

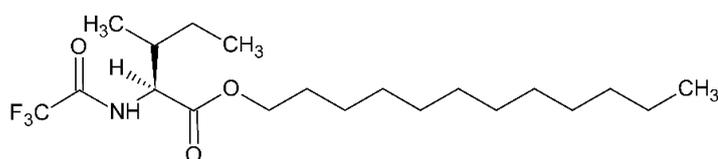


Figura 1.3. Estructura de N-trifluoroacetil-L-isoleucina-O-lauriléster [22].

A pesar de la larga cadena de alquilo, la fase carecía de estabilidad térmica y no podía utilizarse muy por encima de su punto de fusión ya que se producía sangrado excesivo en la columna. En un intento de aumentar la estabilidad térmica y mejorar el rendimiento de la enantioseparación se examinó el uso de dipéptidos como fases estacionarias. El éster de aminoácido fue reemplazado por un éster dipéptido [23]. Los materiales dipéptidos eran menos volátiles y, como resultado de tener dos centros quirales, aumentaron la especificidad quiral (la probabilidad de interacción con un centro quiral se duplicó aproximadamente). La primera separación del ácido glutámico racémico se consiguió usando el éster de dipéptido N-trifluoroacetil-L-fenilalanina-L-leucina ciclohexilo como fase estacionaria. También se

examinaron los tripéptidos, pero se encontró que sus altos puntos de fusión restringían severamente su uso efectivo como fases estacionarias de CG. Se encontró que sólo el aminoácido N-terminal contribuía a una alta selectividad quiral mientras que el aminoácido C terminal parecía proporcionar simplemente otro grupo amida necesario para la formación del enlace de hidrógeno. Se investigó por lo tanto la sustitución del segundo grupo de aminoácidos por el grupo *tert*-butil para producir el selector N-lauroil-L-valina-*tert*-butilamida [24]. Estas fases sufrían de racemización de los restos de aminoácidos durante su uso a largo plazo e inestabilidad a altas temperaturas. En consecuencia, a pesar de esta aplicación relativamente temprana y exitosa de la técnica, el uso de CG para la separación de enantiómeros todavía estaba en etapa de desarrollo.

Sin embargo, aunque la solución al problema de las separaciones quirales por CG era evidente, durante más de una década no se logró desarrollar una fase estacionaria térmicamente estable.

Un avance importante en la cromatografía gaseosa enantioselectiva se consiguió en el año 1977 cuando Frank, Nicholson y Bayer [25] desarrollaron la fase estacionaria quiral basada en la unión covalente de L-valina-*tert*-butilamida al polisiloxano 2-carboxipropil-metilsiloxano a través del enlace amida. De esta forma se combinó la selectividad quiral de la L-valina-*tert*-butilamida con la alta estabilidad térmica y baja volatilidad de los polisiloxanos [25].

En desarrollos posteriores, los tubos de vidrio se reemplazaron por capilares de sílice fundida típicamente de 25 metros y 250  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y un espesor de película de 0.25  $\mu\text{m}$ , en los cuales el selector quiral se unió directamente a la matriz de polidimetilsiloxano a través de un espaciador undecametileno [26]. Estas columnas se comercializan bajo las formas enantioméricas L- y D- con el nombre comercial Chirasil-Val (Figura 1.4).

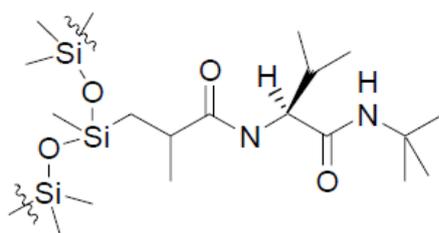


Figura 1.4. Estructura del polisiloxano L-valina-*tert*-butilamida (Chirasil-Val)

Esta columna permitió la separación de todos los aminoácidos proteínicos racémicos en un cromatograma tomando sólo 30 minutos [27]. La columna Chirasil-Val fue usada para

separar muchas otras mezclas quirales incluyendo los arilglicoles, metabolitos de fármacos, ácidos 2- y 3- hidroxicarboxílicos [28] y muchas sustancias no derivadas como los alcoholes, dicetonas e hidroxi lactonas [29].

### 1.4.2 Complejos metálicos quirales

Debido a que la resolución de moléculas quirales como hidrocarburos insaturados, éteres, cetonas, etc. era muy difícil usando las fases estacionarias previamente discutidas, se pensó que la interacción de tales compuestos con agentes organometálicos ópticamente activos podría favorecer estas enantioseparaciones. La validez de esta hipótesis se demostró en el año 1971 cuando Schurig y Gil-Av introdujeron un nuevo tipo de fase estacionaria quiral basada en metales de coordinación [30]. Utilizaron dicarbonilrodio(I)-3-trifluoroacetil-(1R)-canforato (Figura 1.5) disuelto en escualano recubriendo un tubo de acero inoxidable, para resolver la olefina racémica 3-metilciclopentano [30]. La enantioseparación se basa en la coordinación entre el analito y el selector organometálico disuelto en la fase estacionaria. Este tipo de mecanismo de enantioseparación es una alternativa a los selectores basados en interacciones por puente de hidrógeno.

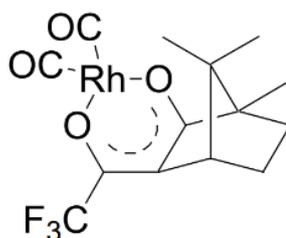


Figura 1.5. Estructura de Dicarbonilrodio(I)-3-trifluoroacetil-(1R)-canforato.

Posteriormente se extendió el uso de la cromatografía gaseosa de complejación a compuestos que contenían oxígeno, azufre y nitrógeno usando complejos análogos de magnesio (II), cobalto (II) y níquel (II) [31].

Estas fases estacionarias tenían como limitación de su uso a bajas temperaturas (25-120°C). La termoestabilidad de estas fases fue incrementada al inmovilizar los selectores a polidimetilsiloxanos para producir las fases estacionarias Chirasil-Metal [32]. La Figura 1.6 representa un esquema de estas fases.

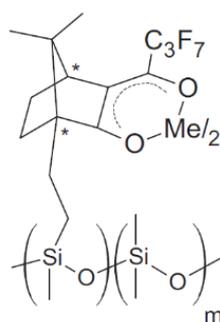


Figura 1.6. Estructura de Chirasil-Metal utilizado para CG enantioselectiva.

### 1.4.3 Líquidos iónicos

Los líquidos iónicos (LIs) son sales con puntos de fusión que generalmente se encuentran por debajo de los 100°C. Aquellos que tienen una temperatura de fusión por debajo de la temperatura ambiente, se denominan líquidos iónicos a temperatura ambiente (RTILs, de las siglas en inglés por “Room Temperature Ionic Liquids”). Se componen de un catión orgánico y un anión orgánico o inorgánico. En los últimos años, los LIs han despertado interés científico debido a sus propiedades únicas, que implican bajos puntos de fusión, muy bajas o nulas presiones de vapor, son poco o no inflamables, térmicamente estables y poseen una alta conductividad iónica. Además, presentan una buena capacidad de solvatación respecto de una gran variedad de compuestos orgánicos, así como de iones inorgánicos. Algunas propiedades dependen principalmente del anión, mientras que otras dependen de la longitud de la cadena de alquilo en el catión, de la forma o de la asimetría [33,34].

Los líquidos iónicos quirales (CILs, Chiral Ionic Liquids, por su sigla en inglés) son una subclase de LIs que tienen uno o más centros quirales. En CILs, el catión, el anión o ambos pueden ser quirales. Las primeras separaciones enantioméricas utilizando líquidos iónicos quirales fueron realizadas por Ding, Welton y Armstrong en el año 2004 [35]. Sintetizaron fases estacionarias quirales en CG basadas en el catión *N,N*-dimetilefedrino (Figura 1.7) y demostraron su capacidad enantioselectiva en la separación de 14 compuestos incluyendo alcoholes, dioles, sulfóxidos, epóxidos y aminas acetiladas. En el año 2006, Yuan y colaboradores [36] informaron el uso de (*R*)-*N,N,N*-trimetil-2-aminobutanol-bis(trifluorometanosulfonil) imida como fase estacionaria quiral para CG. En este caso se recubrió un capilar de sílice fundida con este líquido iónico obteniéndose buena eficiencia (más de 1500 platos/metro para dodecano a 120°C), logrando separar 9 compuestos con selectividad baja a moderada. Unos años más tarde, el mismo grupo informó que la adición de una capa de

nanotubos de carbono a esta fase estacionaria mejoraba las separaciones enantioméricas [37]. El uso de CILs como fases estacionarias de CG no se ha extendido hasta la fecha.

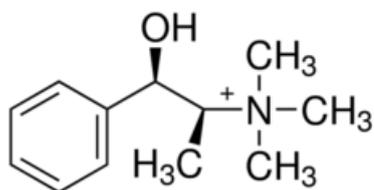


Figura 1.7. Estructura del catión *N, N*-dimetilefedrina.

#### 1.4.4 Redes organometálicas

Las redes organometálicas (MOFs, por sus siglas en inglés *Metal-Organic Frameworks*), son una clase de materiales híbridos microporosos cristalinos [38], y fueron introducidos por primera vez en 1995 por el grupo de Yaghi [39]. Consisten en cationes metálicos (o grupos catiónicos) como por ejemplo  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Al}^{+3}$ ,  $\text{Zr}^{+2}$ ,  $\text{Cr}^{+3}$  o  $\text{Zn}^{+2}$ , conectados por ligandos orgánicos. Debido a que las estructuras cristalinas de estos materiales se pueden diseñar mediante la selección precisa de sus componentes (catión metálico y ligando orgánico), en las últimas dos décadas, se han reportado y estudiado una gran cantidad de MOFs [40,41]. Las ventajas que poseen frente a las convencionales redes inorgánicas porosas son la diversidad casi ilimitada, su alta área superficial y la facilidad para ser diseñadas. Es por esto que se han convertido en candidatos exitosos para muchas aplicaciones, tales como almacenamiento de gases [42], sensores químicos [43] y vehículos de drogas [44]. La adsorción selectiva y la alta estabilidad térmica y química de los MOF también han hecho que estos materiales sean útiles para la cromatografía de gases [45–47] y la cromatografía de líquidos [48–50].

Los MOFs quirales fueron utilizados por primera vez en CG en el año 2011, cuando el grupo de Yuan [51] introdujo el MOF  $\{\text{Cu}(\text{sala})\}_n$  ( $\text{H}_2 \text{sala} = \text{N}$ -(2-hidroxibenzil)-L-alanina) como fase estacionaria, el cual fue elegido por su excelente estabilidad térmica, y por su red tridimensional con canales quirales. Lograron separar 11 compuestos quirales de distintas familias como aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, aminoácidos y alcoholes, con factores de separación desde  $\alpha=1.01$  hasta  $\alpha=1.33$ . Posteriormente, varios otros MOFs quirales se han utilizado como fases estacionarias en CG. Por ejemplo, el grupo de Yuan empleó varias MOFs basadas en D-Cam (D-Cam=ácido D-alcanfórico) como fases estacionarias [52–54]. Utilizaron

el MOFs Ni(D-cam)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> como fase estacionaria [53], con la cual obtuvieron buenas separaciones de mezcla de isómeros, alcanos lineales, y para distintos racematos como 3,7-dimetiloct-6-en-1-al (citronellal), derivados trifluoroacetil etil éster de aminoácidos como alanina, metionina, leucina y prolina, entre otros.

También informaron la fabricación de un MOF quiral nanoporoso tridimensional, [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>] [Cd (bpdc)<sub>1.5</sub>] 2 DMA, (bpdc=bifenil-4,4-dicarboxilato) para la separación de algunos racematos, la mezcla de prueba de Grob, alcanos normales e isómeros [55]. Estudiaron el mecanismo de reconocimiento quiral, aunque la influencia del entorno quiral en las propiedades quirales de los sistemas cromatográficos fue compleja. Los MOFs preparados poseían un gran poro quiral con 19.4 Å, lo cual era adecuado para el enantiorreconocimiento de moléculas quirales accesibles al canal. Además, otras interacciones entre los racematos y los MOFs nanoporosos quirales tridimensionales, tales como enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, dipolo-dipolo y dispersión han desempeñado un papel en el reconocimiento quiral. La columna capilar recubierta de MOF exhibió una buena reproducibilidad y alta eficiencia.

Varios otros MOF quirales también se han utilizado como fases estacionarias quirales en CG, que incluyen [Zn<sub>2</sub> (D-Cam)<sub>2</sub>(4,4'-bpy)]<sub>n</sub> (4,4'-bpy=4,4-bipiridina) [56], [In<sub>3</sub>O(obb)<sub>3</sub>(HCO<sub>2</sub>)(H<sub>2</sub>O)] · Solvente (In=Indio; H<sub>2</sub>obb=4,4'-bisoxy(ácido benzoico) [57], y [Mn<sub>3</sub>(HCOO)<sub>4</sub>(D-Cam)]<sub>n</sub> [58], los cuales exhibieron diferente capacidad de resolución.

El mismo grupo incorporó Co(D-cam)<sub>1/2</sub>(bdc)<sub>1/2</sub>(tmdpy) (tmdpy= 4,4'-trimetileno dipiridina; bdc= 1,4-bencenodicarboxilato) quiral a permetil β-CD para investigar si el uso de MOF quiral puede mejorar la separación por CG de enantiómeros respecto de una fase estacionaria de ciclodextrina. Los resultados mostraron una mejoría en la resolución y alta eficacia con la nueva columna. Posteriormente, también incorporaron [Cd(LTP)2]<sub>n</sub> (LTP= l(-)-tiazolidina-4-ácido carboxílico) y InH(d-C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub> en una permetil-β-CD para proporcionar columnas capilares quirales para la separación por CG de racematos [59,60]. En comparación con la columna de permetil-β-CD, encontraron que estas columnas mostraban mejor selectividad en el reconocimiento de los racematos y una mayor capacidad de resolución.

Los resultados reportados hasta la fecha acerca del uso de MOFs quirales como fases estacionarias en CG son prometedores, aunque han sido poco exploradas.

## 1.4.5 Materiales basados en sílica mesoporosa quiral

Los materiales mesoporosos son materiales que contienen poros con diámetros entre 2 y 50 nm. Debido a sus altas áreas de superficie, distribuciones pequeñas del tamaño de poro y diámetros de poro ajustables han sido utilizados como fases estacionarias para la separación en cromatografía [61,62]. Hasta ahora, los materiales de sílice mesoporosos ordenados se han utilizado como fases estacionarias cromatográficas o soportes para CG [63], Cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) [64], HPLC [65] y Electro cromatografía capilar (CEC) [66].

La introducción de la quiralidad en los materiales mesoporosos inorgánicos ha permitido la separación quiral, la catálisis asimétrica y la detección quiral [67-69]. La mayoría de los enfoques para obtener quiralidad en materiales mesoporosos inorgánicos implican el uso de elementos quirales orgánicos y la posterior modificación química de estos materiales. Por ejemplo, MacLachlan y colaboradores informaron una variedad de materiales mesoporosos (sílica, organosilica, carbono y titania, etc.) con estructuras nemáticas quirales usando celulosa nanocristalina como plantilla quiral [77-80].

El uso de la sílice mesoporosa nemática quiral (CNMS) como fase estacionaria para CG capilar fue reportada por primera vez en el año 2014 [70]. La columna se aplicó a la separación de muchos compuestos orgánicos mostrando buena selectividad para hidrocarburos alifáticos, aromáticos y aromáticos policíclicos y mostró una excelente capacidad de reconocimiento para compuestos quirales tales como alcoholes, aldehídos y derivados de aminoácidos. Otra ventaja importante del CNMS como fase estacionaria es su estabilidad, ya que puede usarse a temperaturas mayores a 350°C.

## 1.4.6 Ciclodextrinas

Para la cromatografía de gases enantioselectiva, las ciclodextrinas (CD) y sus derivados son los selectores quirales usados con mayor frecuencia. Esto se debe a la posibilidad de separar una amplia variedad química de compuestos quirales [71,72], incluyendo hidrocarburos no funcionalizados [73].

Las ciclodextrinas (CD) fueron originalmente moléculas aisladas del almidón en 1891 por Villiers y caracterizadas como oligosacáridos cíclicos por Schardinger en 1903 [74]. Son oligosacáridos naturales macrocíclicos. Los más usados contienen seis ( $\alpha$ -), siete ( $\beta$ -), u ocho

( $\gamma$ -) monómeros de D-glucosa en la conformación de silla unidos a través de enlaces  $\alpha$ -(1,4) (ver Figura 1.8). Las CDs nativas no sustituidas son sustancias cristalinas, no higroscópicas y homogéneas, en las que los anillos de glucosa están dispuestos en la forma de un cono truncado hueco con una cavidad relativamente hidrófoba y una superficie exterior polar donde están situados los grupos hidroxilos. La abertura más grande del cono está rodeada por los grupos hidroxilos secundarios (C-2 y C-3), mientras que los grupos hidroxilos primarios (C-6) están situados en el extremo más pequeño del cono y los grupos CH hacia el interior de la cavidad. Los grupos hidroxilos primarios (C-6) son libres de girar y parcialmente pueden bloquear la entrada por la cavidad más pequeña. La restringida libertad conformacional y la orientación de los grupos hidroxilo secundarios que rodean el extremo opuesto de la cavidad se cree que desempeñan un papel importante en la capacidad de enantioconocimiento de las ciclodextrinas [71,75].

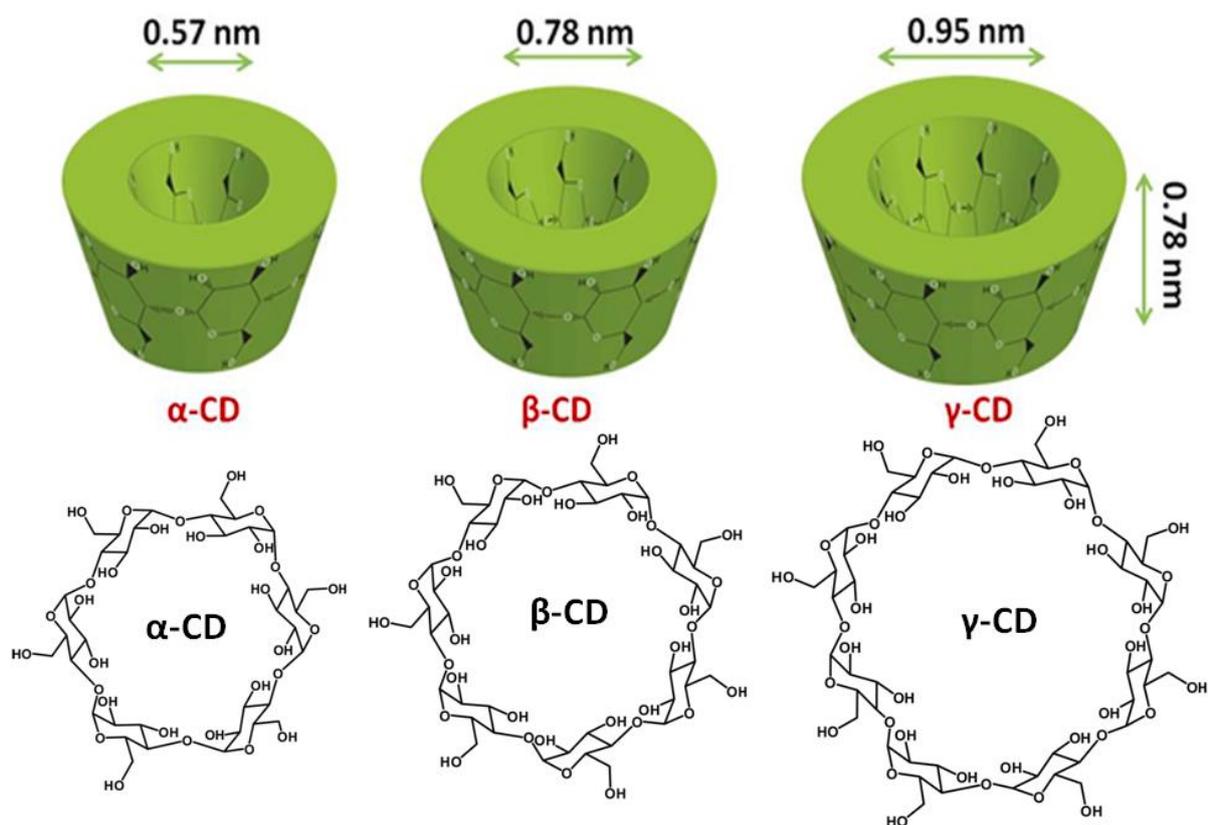


Figura 1.8. Estructura y tamaño relativo de las 3 ciclodextrinas nativas más comunes.

### 1.4.6.1 Ciclodextrinas nativas

En el año 1983 se informó por primera vez el empleo de ciclodextrinas como fases estacionarias quirales para la separación de enantiómeros por cromatografía gaseosa [76,77]. Se logró la resolución enantiomérica de  $\alpha$ - y  $\beta$ - pineno usando columnas empacadas con soluciones de  $\alpha$ - y  $\beta$ -ciclodextrinas en mezclas agua/formamida y depositadas sobre Celite®. Aunque los factores de enantioseparación ( $\alpha$ ) fueron relativamente altos ( $\alpha = 1.73$  para  $\alpha$ -pineno en  $\alpha$ -ciclodextrina), los picos obtenidos eran anchos, y en consecuencia las eficiencias eran bajas. Esto condujo a explorar derivados de ciclodextrinas térmicamente estables para su uso en columnas capilares.

### 1.4.6.2 Ciclodextrinas derivatizadas

Los intentos iniciales de usar ciclodextrinas como fases estacionarias quirales en cromatografía gas-líquido se encontraron con un éxito limitado debido a sus propiedades fisicoquímicas: i. elevados puntos de fusión de algunas de estas moléculas asociados a sus bajas temperaturas de descomposición, y ii. su insolubilidad en polisiloxanos, lo que las hace inadecuadas para el cubrimiento de columnas capilares. La derivatización de los grupos hidroxilos del borde exterior (Figura 1.9) con diversos grupos funcionales, tales como acetilos o alquilos, ofrece un mecanismo simple para modificar las propiedades de las ciclodextrinas naturales, expandir su aplicación para la separación de enantiómeros y mejorar sus propiedades físicas para su uso como fases estacionarias [78]. En el año 1961 [79] se empleó  $\beta$ -ciclodextrina acilada como fase estacionaria de columnas para cromatografía gaseosa, aunque no para la separación de enantiómeros, sino de ácidos grasos.

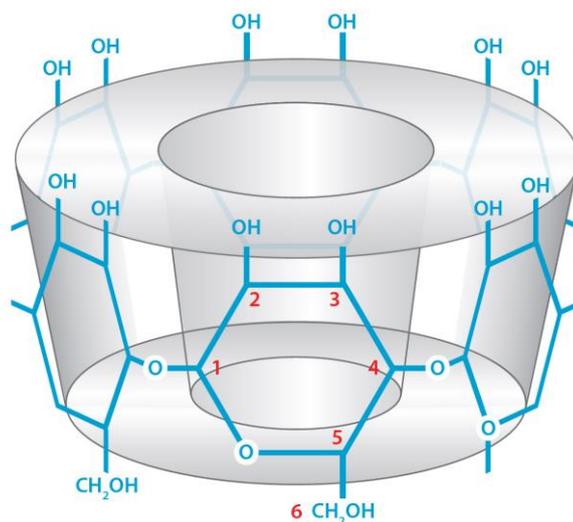


Figura 1.9. Posición de los grupos hidroxilo primario (unido al carbono 6) y secundarios (unidos al carbono 2 y 3) de cada unidad de glucosa

En el año 1987, Juvancz y colaboradores lograron la primera separación de enantiómeros realizada por cromatografía gaseosa en capilares de alta resolución mediante el uso de  $\beta$ -ciclodextrina permetilada pura (heptakis(2,3,6-tri-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina), donde fue posible separar isómeros estructurales de compuestos aromáticos [80] y compuestos quirales [81].

Con el objetivo de mejorar la relativamente baja eficiencia y el estrecho rango de temperaturas de operación de las columnas, se propusieron dos enfoques diferentes. Por un lado, Schurig y Nowotny [82] emplearon una solución de heptakis(2,3,6-tri-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina en un polisiloxano de polaridad intermedia como OV-1701 (poli(dimetilsiloxano-co-cianopropilfenilsiloxano) 86% PDMS) como fase estacionaria enantioselectiva. Esta mezcla dio como resultado una fase estacionaria que combina al mismo tiempo la alta enantioselectividad del derivado de ciclodextrina y la estabilidad térmica del polisiloxano. Este enfoque basado en el empleo de soluciones de selector quiral en una matriz polimérica aquiral es ahora casi el único utilizado rutinariamente, habiendo hecho posible obtener columnas quirales con propiedades cromatográficas, eficiencia y rango de temperaturas de operación (0-240°C) comparables con las de columnas convencionales no quirales [83,84].

El segundo enfoque, propuesto por König y colaboradores, consistió en introducir como fase estacionaria líquida no diluida, a los derivados de ciclodextrina 2,3,6-n-pentiladas, tales como 2,3,6-per-n-pentil- $\alpha$ - y  $\beta$ -ciclodextrina, también conocidas comercialmente como Lipodex® A y Lipodex® C, respectivamente. Columnas construidas con estos derivados pueden emplearse en la separación de compuestos altamente volátiles a temperatura más baja [85-87].

Los tres grupos hidroxilo en las unidades de glucosa de la ciclodextrina difieren en reactividad debido a la diferencia de acidez de los protones y debido al impedimento estérico. El grupo 2-hidroxi es el más ácido, seguido del grupo 6-OH y 3-OH en orden respectivo. Sin embargo, debido al impedimento estérico, el grupo 2-OH no es necesariamente la posición más reactiva en la molécula. Esto forma la base para un amplio espectro de alquilaciones y acilaciones regioselectivas que se han aplicado para modificar las propiedades de las ciclodextrinas con el objetivo de ser usadas como fases estacionarias quirales [88].

Los sustituyentes de las unidades de glucosa en las posiciones C-2 y C-3 y en la posición C-6 parecen desempeñar diferentes funciones: los sustituyentes en la posición quiral C-2 y C-3, principalmente grupos acilo o alquilo, están generalmente relacionados a la enantioselectividad, mientras que los sustituyentes en la posición C-6 afectan la polaridad de la molécula resultante, su punto de fusión o su solubilidad en polisiloxanos [16]. Los distintos derivados que existen se los puede dividir en dos tipos, los derivados alquilados como metilo, etilo, butilo o pentilo; y los derivados del tipo polar: acetilo, propionilo o trifluoroacetilo. La derivatización con grupos más polares en la posición 3 del hidroxilo de la unidad de glucosa parece afectar la posibilidad de inclusión [16].

Un ejemplo de estas ciclodextrinas modificadas es la síntesis de 2,6-n-pentil-ciclodextrina como intermedio y la acilación posterior de la posición 3-OH restante que da como resultado 2,6-di-O-n-pentil-3-O-butiril- $\gamma$ -CD (nombre comercial: Lipodex® E) [47]. Otros ejemplos son las fases 2,6-dialquil-3-acetil-ciclodextrina tales como 2,6-di-O-pentil-3-O-acetil- $\alpha$ -ciclodextrina (Lipodex® B), 2,6-di-O-pentil-3-O-acetil- $\beta$ -ciclodextrina (Lipodex® D) y 2,6-di-O-pentil-3-O-metil- $\gamma$ -ciclodextrina (Lipodex® G), todas ellas disponibles comercialmente [49,50]. La estrategia de acilación se extendió hacia la introducción de cadenas laterales de acilo fluoradas, por ejemplo, 2,6-di-O-pentil-3-O-trifluoroacetil- $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -ciclodextrina pertenecientes a la llamada serie comercial ChiralDEX TA [89-91].

La sustitución de cadenas de pentilo por metilos (2,6-di-O-metil-3-O-heptafluorobutanoil- $\beta$ -ciclodextrina) mostró buenas propiedades de enantioseparación de compuestos que pertenecen a diferentes familias, como 3,3,5-trimetilciclohexanona, 5-metil-2-(1-metiletiliden) ciclohexanona, (E)-5-metilhept-2-en-4-ona y E-2,3-dimetil-1,4-dioxaspiro[4.4]1-nonano [92]. Aunque estas CD presentan características de separación únicas, su uso se ve limitado por el hecho de que las cadenas laterales fueron vulnerables a descomposición a alta temperatura [93]. Se ha encontrado que las acilaciones en la posición 3-OH tienen impactos positivos sobre el rendimiento de la enantioseparación, mientras que tales

modificaciones en la posición 6-OH tienen un fuerte efecto negativo sobre las enantioseparaciones [94].

Una mejora importante en el poder de separación obtuvieron Blum y Aichholz [95], y luego el grupo de Mosandl [96], cuando introdujeron sustituyentes voluminosos como, por ejemplo, los grupos *tert*-butildimetilsililo (TBDMS) o *tert*-hexildimetilsililo (THDMS) [95,97] en los grupos primarios 6-OH. Hasta ese entonces se suponía que la introducción de un grupo de protección muy voluminoso como el TBDMS en la posición 6-OH de la ciclodextrina tendría un impacto negativo en la interacción del analito con la cavidad de ciclodextrina. Sin embargo, las fases conteniendo TBDMS resultaron ser una de las fases estacionarias quirales de ciclodextrina más eficaces y hoy en día muchas variaciones de estos derivados se encuentran comercialmente disponibles. Por citar algún ejemplo, las fases estacionarias quirales 2,3-di-O-metoxi-6-O-TBDMS- $\beta$ -CD y 2,3-di-O-acetil-6-O-TBDMS-  $\beta$  y  $\gamma$ -CD son ampliamente empleadas, especialmente para el análisis enantioselectivo de compuestos relacionados con sabores y fragancias [98].

#### 1.4.6.2.1 Soluciones de derivados de ciclodextrinas

La capacidad de las fases estacionarias para mantener sus estados líquidos es crucial para obtener una eficiencia de separación suficiente. La dilución del derivado de ciclodextrina en polisiloxano se introdujo por primera vez en 1988 [82], ampliando significativamente el espectro de derivados de ciclodextrina adecuados para su uso en cromatografía gas líquido. Esto es así debido a que los polisiloxanos tienen excelentes propiedades para lograr un recubrimiento homogéneo, con lo cual, se pueden producir columnas capilares de alta resolución, eficiencia y termoestabilidad. Hoy en día, la dilución de derivados de ciclodextrina en siliconas aquirales es práctica habitual [99]. La selección del polímero utilizado para diluir la ciclodextrina tiene un fuerte impacto en el rendimiento de separación. Por ejemplo, el uso de PS264 (10% de fenilo, 90% de poldimetilsiloxano) como solvente de 2,3-di-O-n-propionil-6-O-TBDMS- $\gamma$ -CD, en lugar de OV-1701-vi (1% vinilo) arrojó como resultado una mejora de los factores de separación. Un 33% (p/p) del selector en PS264 permitió alcanzar la misma enantioselectividad que la columna con 50% (p/p) en OV-1701-vi [100]. En estos sistemas, se ha encontrado que el factor de selectividad  $\alpha$ , depende de la concentración del selector quiral en el solvente [101,102]. Se ha demostrado que  $\alpha$  no aumenta de forma lineal con la concentración del selector, sino que alcanza una concentración óptima más allá de la cual la enantioselectividad es prácticamente constante [103]. Los datos experimentales han mostrado

que la concentración óptima corresponde a una concentración intermedia. Se ha demostrado que no se obtiene una mejora adicional de la enantioselectividad por encima de un porcentaje aproximadamente de 30% peso en peso para permetil  $\beta$ -ciclodextrina o 50% para derivados con masas moleculares más altas, como, por ejemplo,  $\gamma$ -ciclodextrinas que contienen grupos n-pentilo. Por otra parte, estas concentraciones son dependientes de la naturaleza química del compuesto enantiomérico. Por lo tanto, el uso de ciclodextrinas modificadas puras es cada vez menos utilizado. Además, se ha sugerido que la dilución en polisiloxanos proporciona un entorno protector para la ciclodextrina, encontrándose que la degradación es más lenta que cuando se emplean en forma pura [104].

## 1.5 Referencias

- [1] Lord Kelvin, *Baltimore Lectures on Molecular Dynamics and the Wave Theory of Light*, C.J. Clay and Sons; Publication Agency of the Johns Hopkins University, 1904.
- [2] L. Gillespie, J.A. Oates, J.R. Crout, A. Sjoerdsma, *Clinical and Chemical Studies with  $\alpha$ -Methyl-Dopa in Patients with Hypertension*, *Circulation* 25 (1962) 281-291.
- [3] P.M. Franz, S.L. Anliker, J.T. Callaghan, K.A. DeSante, P.H. Dhahir, R.L. Nelson, A. Rubin, *Disposition in Humans of Racemic Picenadol, an Opioid Analgesic*, *Drug Metab. Dispos.* 18 (1990) 968-973.
- [4] D.J. Triggle, *On the Other Hand: The Stereoselectivity of Drug Action at Ion Channels*, *Chirality* 6 (1994) 58-62.
- [5] R. Wigglesworth, *Thalidomide - Damaged Infants*, *Lancet*. 280 (1962) 297-298.
- [6] W.D. Hooper, M.S. Qing, *The Influence of Age and Gender on the Stereoselective Metabolism and Pharmacokinetics of Mephobarbital in Humans*, *Clin. Pharmacol. Ther.* 48 (1990) 633-640.
- [7] B. Testa, P.A. Carrupt, J. Gal, *The So-Called "Interconversion" of Stereoisomeric Drugs: An Attempt at Clarification*, *Chirality* 5 (1993) 105-111.
- [8] M. Del Bubba, L. Checchini, L. Lepri, *Thin-Layer Chromatography Enantioseparations on Chiral Stationary Phases: A Review*, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 533-554.
- [9] D. Albals, Y. Vander heyden, M.G. Schmid, B. Chankvetadze, D. Mangelings, *Chiral Separations of Cathinone and Amphetamine-Derivatives: Comparative Study Between Capillary Electrochromatography, Supercritical Fluid Chromatography and Three Liquid Chromatographic Modes*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 121 (2016) 232-243.
- [10] C.M. Galea, Y. Vander Heyden, D. Mangelings, *Separation of Stereoisomers*, in: *Supercrit. Fluid Chromatogr. Handbooks Sep. Sci.*, Elsevier Inc., Belgium, 2017: pp. 345-379.
- [11] S. Thurmann, C. Lotter, J.J. Heiland, B. Chankvetadze, D. Belder, *Chip-Based High-Performance Liquid Chromatography for High-Speed Enantioseparations*, *Anal. Chem.* 87 (2015) 5568-5576.
- [12] S. Fanali, *Nano-Liquid Chromatography Applied to Enantiomers Separation*, *J. Chromatogr. A* 1486 (2017) 20-34.
- [13] G.K.E. Scriba, H. Harnisch, Q. Zhu, *Enantiomer Separations by Capillary Electrophoresis*, in: Philippe Schmitt-Kopplin (ed.) (Ed.), *Capill. Electrophor. Methods Protoc. Methods Mol. Biol.*, Springer Science+Business Media, New York, 2016: pp. 277-299.
- [14] C. Cagliero, B. Sgorbini, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, C. Bicchi, *Enantioselective Gas Chromatography with Derivatized Cyclodextrins in the Flavour and Fragrance Field*, *Isr. J. Chem.* 56 (2016) 925-939.
- [15] V. Schurig, *Separation of Enantiomers by Gas Chromatography on Chiral Stationary Phases*, in: S. Ahuja (Ed.), *Chiral Sep. Methods Pharm. Biotechnol. Prod.*, 2010: pp. 251-297.
- [16] T. Beesley, *The State of the Art in Chiral Capillary Gas Chromatography*, *LCGC North Am.* 29 (2011) 642-651.

- [17] E. Gil-Av, D. Nurok, The Separation of Diastereoisomers by Gas-Liquid Chromatography, *Proc. Chem. Soc.* (1962) 146–147.
- [18] V. Schurig, Enantiomer Separation by Gas Chromatography Stationary Phases, *J. Chromatogr. A* 666 (1994) 111–129.
- [19] V. Schurig, Chiral Separations Using Gas Chromatography, *TrAC Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 647–661.
- [20] L.H. Easson, E. Stedman, Studies on the Relationship Between Chemical Constitution and Physiological Action: Molecular Dissymmetry and Physiological Activity, *Biochem. J.* 27 (1933) 1257–1266.
- [21] A.T. James, A.J.P. Martin, Gas-Liquid Partition Chromatography: the Separation and Micro-Estimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to Dodecanoic Acid, *Biochem. J.* 50 (1952) 679–690.
- [22] E. Gil-Av, B. Feibush, R. Charles-Sigler, Separation of Enantiomers by Gas Liquid Chromatography with an Optically Active Stationary Phase, *Tetrahedron Lett.* 7 (1966) 1009–1015.
- [23] E. Gil-Av, B. Feibush, Resolution of Enantiomers by Gas Liquid Chromatography with Optically Active Stationary Phases. Separation on Packed Columns, *Tetrahedron Lett.* 8 (1967) 3345–3347.
- [24] B. Feibush, Interaction between Asymmetric Solutes and Solvents. N-Lauroyl-L-valyl-t-butylamide as Stationary Phase in Gas Liquid Partition Chromatography, *J. Chem. Soc. D Chem. Commun.* (1971) 544–545.
- [25] H. Frank, G.J. Nicholson, E. Bayer, Rapid Gas Chromatographic Separation of Amino Acid Enantiomers with a Novel Chiral Stationary Phase, *J. Chromatogr. Sci.* 15 (1977) 174–178.
- [26] P.A. Levkin, A. Levkina, V. Schurig, Combining the Enantioselectivities of L-Valine Diamide and Permethylated  $\beta$ -Cyclodextrin in One Gas Chromatographic Chiral Stationary Phase, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5143–5148.
- [27] H. Frank, G.J. Nicholson, E. Bayer, Enantiomer Labelling, a Method for the Quantitative Analysis of Amino Acids, *J. Chromatogr. A* 167 (1978) 187–196.
- [28] B. Koppenhoefer, H. Allmendinger, G.J. Nicholson, E. Bayer, Direct Resolution of Enantiomers of 2- and 3- Hydroxy Acid Alkyl Esters By Fused-Silica Gas Chromatography, *J. Chromatogr.* 260 (1983) 63–73.
- [29] B. Koppenhoefer, H. Allmendinger, G. Nicholson, Direct Enantiomer Resolution of Hydroxy and Carbonyl Compounds by Gas Chromatography on Chirasil-Val, *Angew. Chemie Int. Ed. English* 24 (1985) 48–49.
- [30] V. Schurig, E. Gil-Av, Complexation of Olefins with Planar Rhodium (I) Coordination Compounds, *J. Chem. Soc. D Chem. Commun.* (1971) 650–651.
- [31] V. Schurig, W. Bürkle, Extending the Scope of Enantiomer Resolution by Complexation Gas Chromatography, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 7573–7580.
- [32] V. Schurig, F. Betschinger, Metal-Mediated Enantioselective Access to Unfunctionalized Aliphatic Oxiranes: Prochiral and Chiral Recognition, *Chem. Rev.* 92 (1992) 873–888.
- [33] D. Han, K.H. Row, Recent Applications of Ionic Liquids in Separation Technology, *Molecules* 15 (2010) 2405–2426.
- [34] T.D. Ho, C. Zhang, L.W. Hantao, J.L. Anderson, Ionic Liquids in Analytical Chemistry:

- Fundamentals, Advances, and Perspectives, *Anal. Chem.* 86 (2013) 262–285.
- [35] J. Ding, T. Welton, D.W. Armstrong, Chiral Ionic Liquids as Stationary Phases in Gas Chromatography, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6819–6822.
- [36] L.M. Yuan, Y. Han, Y. Zhou, X. Meng, Z.Y. Li, (R)-N,N,N-Trimethyl-2-Aminobutanol-Bis (Trifluoromethane-Sulfon) Imidate Chiral Ionic Liquid Used as Chiral Selector in HPCE, HPLC, and CGC, *Anal. Lett.* 39 (2006) 1439–1449.
- [37] L. Zhao, P. Ai, A. Duan, L. Yuan, Single-Walled Carbon Nanotubes for Improved Enantioseparations on a Chiral Ionic Liquid Stationary Phase in GC, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 143–147.
- [38] J.R. Li, J. Sculley, H.C. Zhou, Metal-Organic Frameworks for Separations, *Chem. Rev.* 112 (2012) 869–932.
- [39] O.M. Yaghi, H. Li, Hydrothermal Synthesis of a Metal-Organic Framework Containing Large Rectangular Channels, *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 10401–10402.
- [40] H. Furukawa, K.E. Cordova, M. O’Keeffe, O.M. Yaghi, The Chemistry and Applications of Metal-Organic Frameworks, *Science* 341 (2013) 1–9.
- [41] Y. Cui, B. Li, H. He, W. Zhou, B. Chen, G. Qian, Metal-Organic Frameworks as Platforms for Functional Materials, *Acc. Chem. Res.* 49 (2016) 483–493.
- [42] L. Liu, S.G. Telfer, Systematic Ligand Modulation Enhances the Moisture Stability and Gas Sorption Characteristics of Quaternary Metal-Organic Frameworks, *J. Am. Chem. Soc.* 137 (2015) 3901–3909.
- [43] X. Lin, F. Luo, L. Zheng, G. Gao, Y. Chi, Fast, Sensitive, and Selective Ion-Triggered Disassembly and Release Based on Tris(bipyridine)ruthenium(II)-Functionalized Metal-Organic Frameworks, *Anal. Chem.* 87 (2015) 4864–4870.
- [44] J. Yu, Y. Cui, H. Xu, Y. Yang, Z. Wang, B. Chen, G. Qian, Confinement of Pyridinium Hemicyanine Dye within an Anionic Metal-Organic Framework for Two-Photon-Pumped Lasing, *Nat. Commun.* 4 (2013) 1–7.
- [45] B. Chen, C. Liang, J. Yang, D.S. Contreras, Y.L. Clancy, E.B. Lobkovsky, O.M. Yaghi, S. Dai, A Microporous Metal-Organic Framework for Gas-Chromatographic Separation of Alkanes, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 45 (2006) 1390–1393.
- [46] J.W. Yoon, S.H. Jhung, Y.K. Hwang, S.M. Humphrey, P.T. Wood, J.S. Chang, Gas-Sorption Selectivity of CUK-1: A Porous Coordination Solid Made of Cobalt(II) and Pyridine-2,4-Dicarboxylic Acid, *Adv. Mater.* 19 (2007) 1830–1834.
- [47] V. Finsy, H. Verelst, L. Alaerts, D. De Vos, P.A. Jacobs, G. V. Baron, J.F.M. Denayer, Pore-Filling-Dependent Selectivity Effects in the Vapor-Phase Separation of Xylene Isomers on the Metal-Organic Framework MIL-47, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 7110–7118.
- [48] L. Alaerts, C.E.A. Kirschhock, M. Maes, M.A. Van Der Veen, V. Finsy, A. Depla, J.A. Martens, G. V. Baron, P.A. Jacobs, J.F.M. Denayer, D.E. De Vos, Selective Adsorption and Separation of Xylene Isomers and Ethylbenzene with the Microporous Vanadium(IV) Terephthalate MIL-47, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 46 (2007) 4293–4297.
- [49] A.L. Nuzhdin, D.N. Dybtsev, K.P. Bryliakov, Enantioselective Chromatographic Resolution and One-Pot Synthesis of Enantiomerically Pure Sulfoxides over a Homochiral Zn-Organic Framework, *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 12958–12959.
- [50] L. Alaerts, M. Maes, L. Giebeler, P.A. Jacobs, J.A. Martens, J.F.M. Denayer, C.E.A. Kirschhock, D.E. De Vos, Selective Adsorption and Separation of ortho-Substituted

- Alkylaromatics with the Microporous Aluminum Terephthalate MIL-53, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 14170–14178.
- [51] S.M. Xie, Z.J. Zhang, Z.Y. Wang, L.M. Yuan, Chiral Metal-Organic Frameworks for High-Resolution Gas Chromatographic Separations, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 11892–11895.
- [52] S.M. Xie, X.H. Zhang, Z.J. Zhang, M. Zhang, J. Jia, L.M. Yuan, A 3-D Open-Framework Material with Intrinsic Chiral Topology Used as a Stationary Phase in Gas Chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 3407–3412.
- [53] S. Xie, B. Wang, X.H. Zhang, J. hui Zhang, M. Zhang, L. Yuan, Chiral 3D Open-Framework Material Ni(D-Cam))(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> Used as GC Stationary Phase, *Chirality* 26 (2014) 27–32.
- [54] M. Zhang, J.H. Zhang, Y. Zhang, B.J. Wang, S.M. Xie, L.M. Yuan, Chromatographic Study on the High Performance Separation Ability of a Homochiral [Cu<sub>2</sub>(d-Cam)<sub>2</sub>(4,4'-bpy)]<sub>n</sub> Based-Column by Using Racemates and Positional Isomers as Test Probes, *J. Chromatogr. A* 1325 (2014) 163–170.
- [55] S. Xie, X. Zhang, B. Wang, M. Zhang, J. Zhang, L. Yuan, 3D Chiral Nanoporous Metal-Organic Framework for Chromatographic Separation in GC, *Chromatographia* 77 (2014) 1359–1365.
- [56] X.D. Xue, M. Zhang, S.M. Xie, L.M. Yuan, Homochiral Metal-Organic Framework [Zn<sub>2</sub>(D-Cam)<sub>2</sub>(4,4'-bpy)]<sub>n</sub> for High-Resolution Gas Chromatographic Separations, *Acta Chromatogr.* 27 (2015) 15–26.
- [57] S.M. Xie, M. Zhang, Z.X. Fei, L.M. Yuan, Experimental Comparison of Chiral Metal-Organic Framework used as Stationary Phase in Chromatography, *J. Chromatogr. A* 1363 (2014) 137–143.
- [58] S.M. Xie, Z.J. Zhang, L.M. Yuan, Chiral Metal-Organic Frameworks [Mn<sub>3</sub>(HCOO)<sub>4</sub>(D-Cam)]<sub>n</sub> Used for Gas Chromatographic Separation, *Chem. J. Chinese Univ.* 35 (2014) 1652–1657.
- [59] J.R. Yang, S.M. Xie, J.H. Zhang, L. Chen, R.Y. Nong, L.M. Yuan, Metal-Organic Framework [Cd(LTP)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> for Improved Enantioseparations on a Chiral Cyclodextrin Stationary Phase in GC, *J. Chromatogr. Sci.* 54 (2016) 1–8.
- [60] J. Yang, S.-M. Xie, H. Liu, J.-H. Zhang, L.-M. Yuan, Metal-Organic Framework InH(d-C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>)<sub>2</sub> for Improved Enantioseparations on a Chiral Cyclodextrin Stationary Phase in GC, *Chromatographia* 78 (2015) 557–564.
- [61] T. Martin, A. Galarneau, F. Di Renzo, D. Brunel, F. Fajula, S. Heinisch, G. Crétier, J.L. Rocca, Great Improvement of Chromatographic Performance Using MCM-41 Spheres as Stationary Phase in HPLC, *Chem. Mater.* 16 (2004) 1725–1731.
- [62] J. Zhou, H.Y. Zhong, L. Yin, X.D. Yu, H.Y. Chen, Separation of Vitamin E Isomers Using Mesoporous SBA-15 as Stationary Phase by High Performance Liquid Chromatography, *Chinese J. Anal. Chem.* 39 (2011) 777–780.
- [63] M. Raimondo, G. Perez, M. Sinibaldi, A. De Stefanis, A.A.G. Tomlinson, Mesoporous M41S Materials in Capillary Gas Chromatography, *Chem. Commun.* (1997) 1343–1344.
- [64] T. Nassivera, A.G. Eklund, C.C. Landry, Size-Exclusion Chromatography of Low-Molecular-Mass Polymers Using Mesoporous Silica, *J. Chromatogr. A* 973 (2002) 97–101.
- [65] T. Yasmin, K. Müller, Synthesis and Surface Modification of Mesoporous mcm-41 Silica Materials, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3362–3374.

- [66] X. Dong, R. Wu, J. Dong, M. Wu, Y. Zhu, H. Zou, A Mesoporous Silica Nanoparticles Immobilized Open-Tubular Capillary Column With a Coating of Cellulose Tris(3,5-Dimethylphenyl-carbamate) for Enantioseparation in CEC, *Electrophoresis* 29 (2008) 3933–3940.
- [67] B.F.G. Johnson, S.A. Raynor, D.S. Shephard, T. Mashmeyer, T. Mashmeyer, J.M. Thomas, G. Sankar, S. Bromley, R. Oldroyd, L. Gladden, M.D. Mantle, Superior Performance of a Chiral Catalyst Confined Within Mesoporous Silica, *Chem. Commun.* (1999) 1167–1168.
- [68] A. Gabashvili, D.D. Medina, A. Gedanken, Y. Mastai, Templating Mesoporous Silica with Chiral Block Copolymers and its Application for Enantioselective Separation, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 11105–11110.
- [69] S. Fireman-shoresh, I. Popov, D. Avnir, S. Marx, Enantioselective, Chirally Templated Sol-Gel Thin Films, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 2650–2655.
- [70] J.H. Zhang, S.M. Xie, M. Zhang, M. Zi, P.G. He, L.M. Yuan, Novel Inorganic Mesoporous Material with Chiral Nematic Structure Derived From Nanocrystalline Cellulose for High-Resolution Gas Chromatographic Separations, *Anal. Chem.* 86 (2014) 9595–9602.
- [71] B.V. Schurig, H. Nowotny, Gas Chromatographic Separation of Enantiomers, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (1990) 939–957.
- [72] E. Smolková-Keulemansová, W.A. König, Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins, *J. Chromatogr.* 623 (1992) 408.
- [73] V. Schurig, D. Kreidler, Gas-Chromatographic Enantioseparation of Unfunctionalized Chiral Hydrocarbons: An Overview, in: G.K.E. Scriba (Ed.), *Chiral Sep. Methods Protoc.*, Humana Press, Totowa, NJ, 2013: pp. 45–67.
- [74] J. Szejtli, Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1743–1753.
- [75] Z. Juvancz, J. Szejtli, The Role of Cyclodextrins in Chiral Selective Chromatography, *TrAC Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 379–388.
- [76] T. Koscielski, D. Sybilska, J. Jujrczak, Separation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Pinene into Enantiomers in Gas-Liquid Chromatography Systems Via  $\alpha$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes, *J. Chromatogr.* 280 (1983) 131–134.
- [77] T. Koscielski, D. Sybilska, S. Belniak, J. Jurczak, Gas-Liquid-Chromatography System with  $\alpha$ -Cyclodextrin as an Analytical Tool for the Studies of Stereoselective Hydrogenation of  $\alpha$ -Pinene, *Chromatographia* 19 (1984) 292–296.
- [78] D.J. Snopek, E. Smolková-Keulemansová, T. Cserhádi, K.H. Gahm, A.M. Stalcup, *Cyclodextrins in Analytical Separation Methods*, Pergamon, 1996.
- [79] D.M. Sand, H. Schlenk, Acylated Cyclodextrins as Polar Stationary Phases for Gas-Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 33 (1961) 1624–1625.
- [80] Z. Juvancz, G. Alexander, J. Szejtli, Permethylated  $\beta$ -Cyclodextrin as Stationary Phase in Capillary Gas Chromatography, *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* 10 (1987) 105–107.
- [81] G. Alexander, Z. Juvancz, J. Szejtli, Cyclodextrins and Their Derivatives as Stationary Phases in GC Capillary Columns, *J. High Resolut. Chromatogr.* 11 (1988) 110–113.
- [82] V. Schurig, H.-P. Nowotny, Separation of Enantiomers on Diluted Permethylated  $\beta$ -Cyclodextrin by High-Resolution Gas Chromatography, *J. Chromatogr.* 441 (1988)

155-163.

- [83] C. Bicchi, G. Aruffo, A.D. Amato, V. Manzin, A. Galli, M. Galli, Cyclodextrin Derivatives in the Gas Chromatographic 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, *J. High Resolut. Chromatogr.* 16 (1993) 209-214.
- [84] C. Bicchi, A. D'Amato, V. Manzin, A. Galli, M. Galli, Cyclodextrin Derivatives in GC Separation of Racemic Mixtures of Volatiles. Part IX. The Influence of the Different Polysiloxanes as Diluting Phase for 2,3-di-O-Acetyl-6-O-t-Butyldimethylsilyl- $\beta$ -Cyclodextrin on the Separation of Some Racemates, *J. Microcolumn Sep.* 7 (1995) 327-336.
- [85] W.A. König, S. Lutz, P. Mischnick-Lubbecke, B. Brassat, G. Wenz, Cyclodextrins as Chiral Stationary Phases in Capillary Gas Chromatography. I. Pentylated  $\alpha$ -Cyclodextrin, *J. Chromatogr.* 447 (1988) 193-197.
- [86] W.A. König, R. Krebber, Enantioselective Capillary Gas Chromatography on the Basis of Host-Guest Interactions with Modified Cyclodextrins, *J. High Resolut. Chromatogr.* 12 (1989) 641-644.
- [87] W.A. König, R. Krebber, P. Mischnick, Cyclodextrins as Chiral Stationary Phases in Capillary Gas Chromatography. Part V: Octakis(3-O-butyryl-2,6-di-O-pentyl)- $\gamma$ -cyclodextrin, *J. High Resolut. Chromatogr.* 12 (1989) 732-738.
- [88] A.R. Khan, P. Forgo, K.J. Stine, V.T. D'Souza, Methods for Selective Modifications of Cyclodextrins, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1977-1996.
- [89] A. Berthod, W.Y. Li, D.W. Armstrong, Chiral Recognition of Racemic Sugars by Polar and Nonpolar Cyclodextrin-Derivative Gas Chromatography, *Carbohydr. Res.* 201 (1990) 175-184.
- [90] W. Li, H.L. Jin, D.W. Armstrong, 2,6-Di-O-Pentyl-3-O-Trifluoroacetyl Cyclodextrin Liquid Stationary Phases for Capillary Gas Chromatographic Separation of Enantiomers, *J. Chromatogr.* 509 (1990) 303-324.
- [91] N.K. De Vries, B. Coussens, R.J. Meier, The Separation of Enantiomers on Modified Cyclodextrin Columns: Measurements and Molecular Modeling, *J. High Resolut. Chromatogr.* 15 (1992) 499-504.
- [92] V. Schurig, M. Jung, Enantiomer Separation on Dissolved Cyclodextrin Derivatives by High-Resolution Gas Chromatography: Thermodynamic Data of Chiral Recognition, in: *Recent Adv. Chiral Sep.*, 1990: pp. 117-133.
- [93] T.J. Betts, Use of a Trio of Modified Cyclodextrin Gas Chromatographic Phases to Provide Structural Information on Some Constituents of Volatile Oils, *J. Chromatogr. A.* 707 (1995) 390-395.
- [94] H.-G. Schmarr, B. Maas, A. Mosandl, S. Bihler, H.-P. Neukom, K. Grob, Unusual Peak Defocusing in Capillary GC on Hexakis(2,6-Di-O-pentyl-3-O-acetyl)- $\alpha$ -Cyclodextrin Stationary Phase, *J. High Resolut. Chromatogr.* 14 (1991) 317-321.
- [95] W. Blum, R. Aichholz, Gas Chromatographic Enantiomeric Separation on tert-Butyldimethylsilylated  $\beta$ -Cyclodextrin Diluted in PS-086. A Simple Method to Prepare Enantioselective Glass Capillary Columns, *J. High Resolut. Chromatogr.* 13 (1990) 515-518.
- [96] A. Dietrich, B. Maas, V. Karl, P. Kreis, D. Lehmann, B. Weber, A. Mosandl, Stereoisomeric Flavor Compounds, *J. High Resolut. Chromatogr.* 4 (1992) 176-179.

- [97] F. Kobor, K. Angermund, G. Schomburg, Molecular Modelling Experiments on Chiral Recognition in GC with Specially Derivatized Cyclodextrins as Selectors, *J. High Resolut. Chromatogr.* 16 (1993) 299–311.
- [98] C. Bicchi, A. D'Amato, P. Rubiolo, Cyclodextrin Derivatives as Chiral Selectors for Direct Gas Chromatographic Separation of Enantiomers in the Essential Oil, Aroma and Flavour Fields, *J. Chromatogr. A* 843 (1999) 99–121.
- [99] V. Schurig, Separation of Enantiomers by Gas Chromatography, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 275–99.
- [100] T. Beck, J.-M. Liepe, J. Nandzik, S. Rohn, A. Mosandl, Comparison of Different Di-tert-butyl-dimethyl-Silylated Cyclodextrins as Chiral Stationary Phases in Capillary Gas Chromatography, *J. High Resolut. Chromatogr.* 23 (2000) 569–575.
- [101] V. Schurig, 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, *J. Chromatogr. A* 757 (1997) 119–135.
- [102] I. Spánik, J. Krupcik, V. Schurig, Comparison of Two Methods for the Gas Chromatographic Determination of Thermodynamic Parameters of Enantioselectivity, *J. Chromatogr. A* 843 (1999) 123–128.
- [103] M. Jung, D. Schmalzing, V. Schurig, Theoretical Approach to the Gas Chromatographic Separation of Enantiomers on Dissolved Cyclodextrin Derivatives, *J. Chromatogr. A* 552 (1991) 43–57.
- [104] E. Miranda, F. Sanchez, J. Sanz, M.I. Jimenez, I. Martinez-Castro, 2,3-Di-O-Pentyl-6-O-tert-Butyldimethylsilyl- $\beta$ -Cyclodextrin as a Chiral Stationary Phase in Capillary Gas Chromatography, *J. High Resolut. Chromatogr.* 21 (1998) 225–233.

# Capítulo 2

---

Materiales y Métodos

## 2.1 Materiales

### 2.1.1 Columnas capilares quirales

Para la preparación de las columnas capilares quirales, en el presente trabajo de tesis se utilizaron como selectores quirales tres derivados de ciclodextrina: octakis(6-O-tert-butildimetilsilil-2,3-di-O-acetil)- $\gamma$ -ciclodextrina, heptakis(6-O-tert-butildimetilsilil-2,3-di-O-acetil)- $\beta$ -ciclodextrina y heptakis(2,3,6-tri-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina, los cuales fueron adquiridos a Cyclolab (Budapest, Hungría).

En todos los casos se utilizó capilar de sílice fundido de 250  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 365  $\mu\text{m}$  de diámetro externo obtenido de Microquartz Electronics (Munich, Alemania). Como matriz aquiral se utilizaron poli(dimetilsiloxano-co-fenilsiloxano) 95% PDMS conteniendo 1%vinilo (SE-54-vi) y poli(dimetilsiloxano-co-cianopropilfenilsiloxano) 86% PDMS conteniendo 1%vinilo (OV-1701-vi), suministrados por Supelco (Bellefonte, PA, USA) y poli(óxido de etileno) Carbowax 20M obtenido de Alltech (Deerfield, IL, USA). Las estructuras y polaridades se muestran en la Figura 2.1. El peróxido de benzoilo fue obtenido de Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Para comparación se utilizó una columna comercial de 25 metros de longitud y 250  $\mu\text{m}$  de diámetro interno (Hydrodex- $\beta$ -PM; Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Germany) conteniendo permetil  $\beta$ -CD disuelta en un polisiloxano.

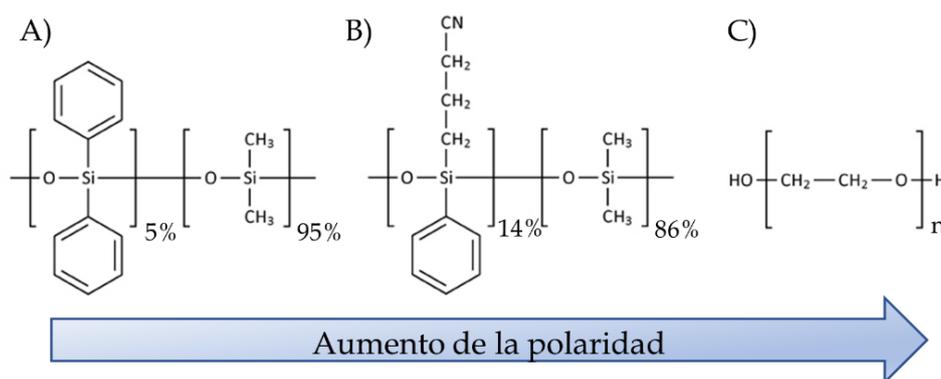


Figura 2.1. Estructura de los polímeros utilizados A) SE-54 B) OV-1701 C) Carbowax 20M.

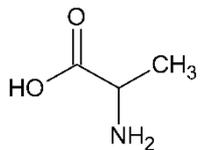
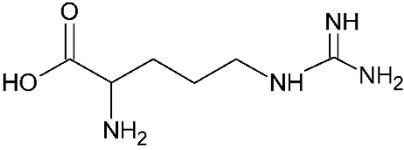
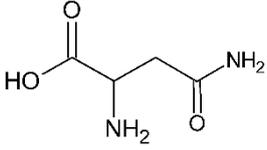
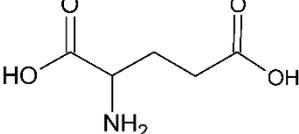
## 2.1.2 Reactivos y solventes

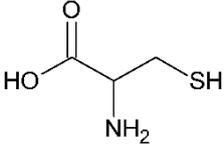
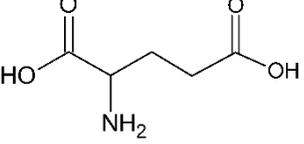
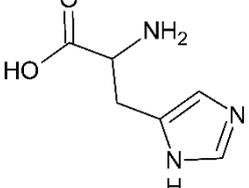
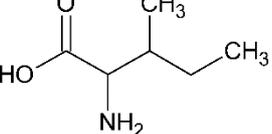
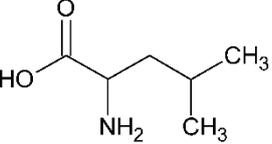
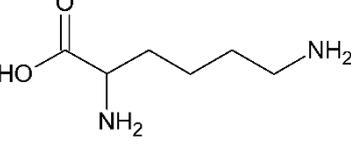
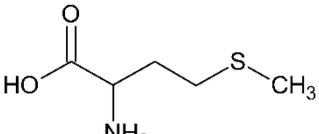
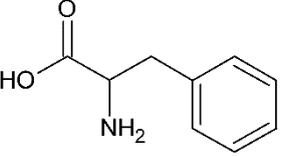
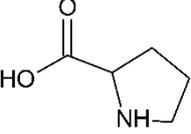
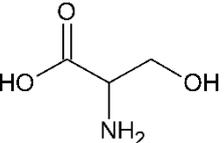
Los solventes orgánicos y reactivos usados fueron anhídrido trifluoroacético (TFAA), adquirido de Fluka (Ronkonkoma, NJ, USA), cloroformiato de etilo y metilo, metanol (MeOH), etanol (EtOH), 2,2,2-trifluoroethanol (TFE), piridina, diclorometano, n-hexadecano y n-tetradecano fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), cloroformo fue obtenido de Merck (Buenos Aires, Argentina). El agua fue purificada por medio de un sistema Milli-Q Pure (Simplicity, Millipore, MA, EE.UU.).

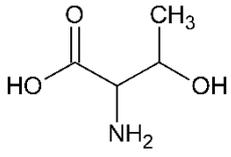
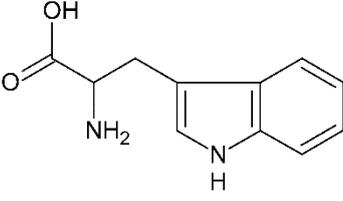
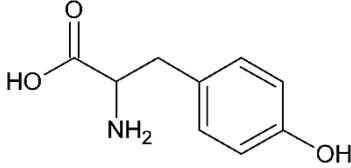
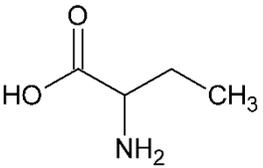
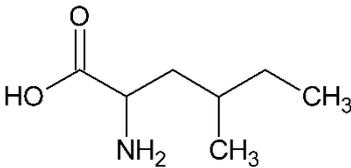
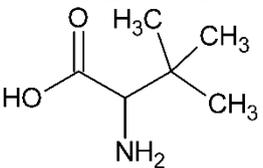
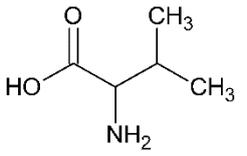
## 2.1.3 Analitos

En la Tabla 2.1 se detalla la estructura y abreviatura de los aminoácidos utilizados, los cuales fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, EE.UU) y de The British Drug Houses (Poole, Inglaterra).

Tabla 2.1. Estructura y abreviatura de los aminoácidos usados

Aminoácido	Estructura	Abreviatura
DL-Alanina		Ala
DL-Arginina		Arg
DL-Asparagina		Asn
DL-Aspártico		Asp

Aminoácido	Estructura	Abreviatura
DL-Cisteína		Cys
Ácido DL-Glutámico		Glu
DL-Histidina		His
DL-Isoleucina		Ile
DL-Leucina		Leu
DL-Lisina		Lys
DL-Metionina		Met
DL-Fenilalanina		Phe
DL-Prolina		Pro
DL-Serina		Ser

Aminoácido	Estructura	Abreviatura
DL-Treonina		Thr
DL-Triptofano		Trp
DL-Tirosina		Tyr
Ácido DL-2-Aminobutírico		Abu
DL-nor-Leucina		Nor
DL-tert-Leucina		t-Leu
DL-Valina		Val

Los herbicidas 2-(4-cloro-2-metilfenoxi)propiónico (mecoprop), 2-(2,4-dicloro-fenoxi)propiónico (diclorprop) y 2-(2,4,5-triclorofenoxi)propiónico (fenoprop) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), ácido 2-(4-hidroxifenoxi)propiónico (hydroprop ácido), N-(2,6-dimetilfenil)-N-(metoxiacetil)-DL-Alanina metil éster (metalaxil), N-(2,6-dimetilfenil)-N-(metoxiacetil)-D-Alanina metil éster (R-metalaxil), 2-{4-[3-cloro-5-(trifluorometil)-2-piridiloxi]fenoxi}propiónico metil éster (haloxifop metil), y 2-{4-[(6-clorobenzoxazol-2-il)oxi]fenoxi}propiónico etil éster (fenoxaprop-etil) fueron amablemente proporcionados por Agrofina (Bs. As., Argentina). En la Tabla 2.2 se resume la estructura, presión de vapor y el uso agrícola de cada uno de estos pesticidas.

Tabla 2.2. Estructuras, usos agrícolas y presión de vapor, de los pesticidas.

Solutos	Estructura	Usos	Presión de vapor <sup>a</sup> (mm Hg)
Mecoprop		Herbicida. Control de malezas de hoja ancha	$2.2 \times 10^{-5}$
Diclorprop		Herbicida. Control de malezas de hoja ancha	$7.5 \times 10^{-8}$
Fenoprop		Herbicida. Regulador del crecimiento de las plantas	$9.9 \times 10^{-6, b}$
Hidroprop		Precursor	$1.2 \times 10^{-7}$
Metalaxil		Funguicida	$5.6 \times 10^{-6}$
Haloxifop metil		Herbicida post-emergente	$1.2 \times 10^{-7}$
Fenoxaprop-etil		Herbicida post-emergente	$3 \times 10^{-8}$

a: A 25°C. Tomado de la base de datos EPA (<https://comptox.epa.gov/dashboard>).

b: A 25°C. Tomado de ChemIDplus, base de datos de Toxnet. Toxicology Data Network. National Institutes of Health (NIH). U.S. National Library of Medicine. (<https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/93-72-1>)

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Construcción de las columnas capilares

La construcción de las columnas capilares se puede realizar por dos métodos, el dinámico y el estático. El método dinámico consiste en introducir un volumen discreto de solución de fase estacionaria en un solvente volátil, que es empujado a lo largo de la columna con un gas inerte cubriendo las paredes con una capa de solución, finalmente el solvente es evaporado utilizando una corriente de gas para dejar la película de fase líquida depositada. Este método tiene la ventaja de ser sumamente rápido, pero no permite conocer con exactitud el espesor de la fase estacionaria depositada ni la relación de fases de la columna resultante.

El método estático consiste en preparar una solución de concentración perfectamente conocida de la fase estacionaria a depositar en un solvente volátil. Posteriormente se llena el capilar sumergiendo un extremo del mismo en un vial sellado, aplicando presión positiva sobre el espacio de cabeza del vial con  $N_2$ , luego se sella uno de los extremos del capilar y se evapora.

Una forma de evaporarlo es aplicando vacío en el extremo abierto del capilar. Esta técnica tiene la desventaja de ser lenta. Otra forma de evaporar consiste en aplicar temperatura. Para ello, se hace entrar el capilar desde el extremo abierto a velocidad controlada a un horno a una temperatura mayor a la temperatura de ebullición del solvente utilizado para disolver la fase estacionaria. 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.

Las columnas fueron preparadas utilizando el método estático evaporando con temperatura. Se usaron capilares de sílice fundido de 10 metros de longitud sin pretratamiento. Para las mediciones de constantes de asociación, se prepararon 5 mezclas conteniendo 0%, 9.55%, 18.04%, 26.80% y 47.40% del selector quiral octakis(6-*O*-*tert*-butildimetilsilil-2,3-di-*O*-acetil)- $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ -CD) en el polímero OV-1701-vi, disueltos en diclorometano, y una columna con 47% del selector quiral heptakis(6-*O*-*tert*-butildimetilsilil-2,3-di-*O*-acetil)- $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) en el polímero OV-1701-vi y espesor de película de 0.14  $\mu\text{m}$ . Con el fin de aumentar la estabilidad térmica, se utilizaron fases estacionarias que no estén simplemente depositadas sobre la pared del capilar, sino que se realizó un tratamiento posterior de entrecruzamiento, esto es, una polimerización de la fase

estacionaria una vez depositada, agregando 10 $\mu$ l de una solución de 0.02 mg/ml de peróxido de benzoilo como iniciador de radicales, el cual reacciona con el 1% de vinilo del polidimetilsiloxano. La polimerización se logra al aumentar la temperatura. Las columnas fueron finalmente acondicionadas toda una noche a 120°C con un flujo de nitrógeno.

Utilizando el mismo método se prepararon, además, columnas capilares quirales con el selector heptakis(2,3,6-tri-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina (PM- $\beta$ -CD) disuelto en las distintas matrices aquirales (OV-1701-vi, SE-54-vi y Carbowax 20M) para estudiar el efecto de la matriz aquiral sobre el proceso de enantiorreconocimiento.

En la Figura 2.2 se muestran tres fotografías del equipo utilizado para la construcción de las columnas, el cual consistió en un horno de un cromatógrafo gaseoso en desuso, modificado con un rotor conectado a una polea en el interior del mismo. El control del menisco se hace visualmente a través de una ventana en la puerta del horno y el avance del capilar se regula mediante el motor de paso de velocidad variable.

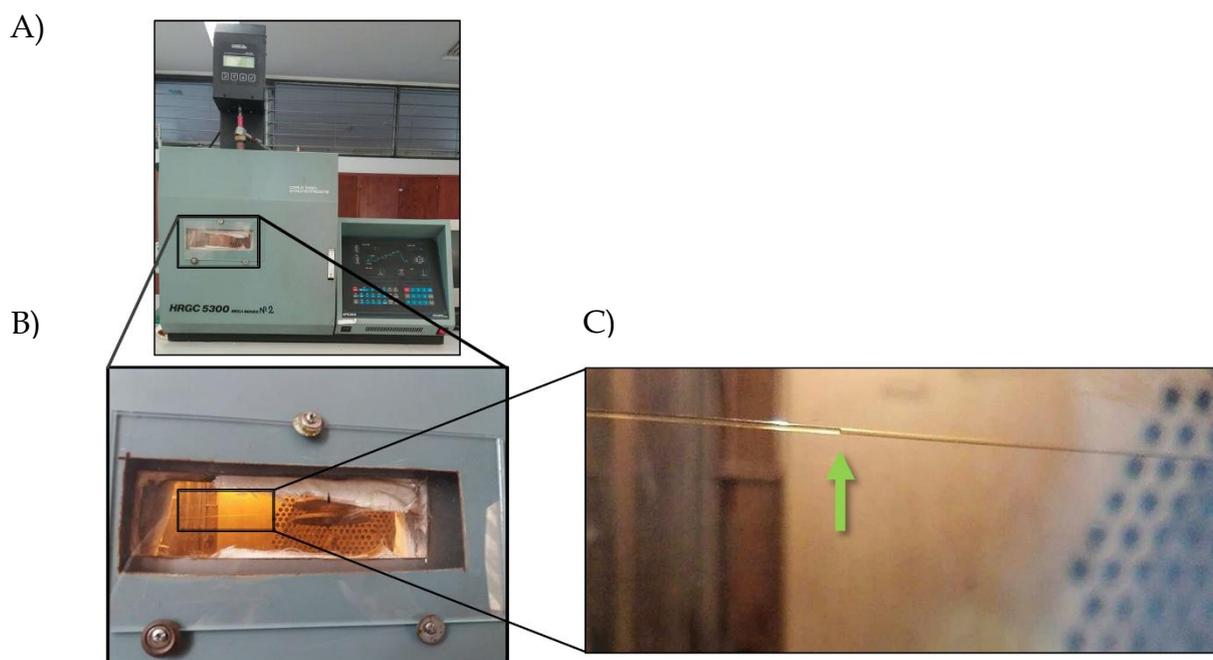


Figura 2.2. Fotografías del equipo utilizado para la construcción de las columnas A) Horno cromatográfico modificado conectado al motor de paso de velocidad variable B) Ampliación de la ventana en la puerta del horno C) Visualización a través de la ventana del capilar dentro del horno.

## 2.2.2 Estudio de la estabilidad en el tiempo

Para evaluar la estabilidad de las columnas en el tiempo, se fabricaron 2 columnas de 10 m de longitud y 0.2  $\mu\text{m}$  de espesor de película, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito. Una de las columnas fue entrecruzada con peróxido de benzoilo, mientras en la otra simplemente se depositó la fase estacionaria sobre la pared interna del capilar.

Se preparó 10 ml de una mezcla conteniendo 42.06% p/p del selector quiral octakis(6-*O*-*tert*-butildimetilsilil-2,3-di-*O*-acetil)- $\gamma$ -ciclodextrina en el polímero OV-1701-vi disuelto en diclorometano, se separó la solución en dos partes. A una de ellas se le agregó peróxido de benzoilo y se construyó la columna CDEST 1. La otra columna sin peróxido de benzoilo se denominó CDEST 2. Ambas columnas fueron acondicionadas a 120°C con flujo de nitrógeno durante toda la noche.

La evaluación de estas columnas se llevó a cabo inyectando *n*-dodecano y el derivado *N*-trifluoroacetil metil éster de alanina a temperatura isotérmica de 80°C junto con metano como marcador de tiempo muerto. Luego de cada inyección se realizó un calentamiento, que consistió en 80°C durante 2 minutos, calentamiento de 10°C/minuto hasta 160°C, y 30 minutos isotérmico. Se enfrió la columna a 80°C y se procedió a inyectar nuevamente los analitos testigos. Este procedimiento se repitió una vez por semana a lo largo de 47 semanas.

## 2.2.3 Hidrólisis de pesticidas

Como los pesticidas metalaxil y haloxifop-metil no están disponibles como ácidos libres, se prepararon por hidrólisis alcalina. Cada éster se disolvió en una solución de hidróxido potásico acuoso (10% p/v) y se calentó durante 10 h. Después de enfriar, la solución se acidificó con ácido clorhídrico. El pesticida se extrajo luego con dos porciones de diclorometano. Los extractos se combinaron y el disolvente se eliminó en una corriente de nitrógeno. El residuo se trató después como se describe a continuación.

## 2.2.4 Reacciones de derivatización

### 2.2.4.1 Pesticidas

Se utilizaron dos protocolos para la derivatización de los restos carboxílicos de fenoxiácidos y ariloxifenoxiácidos. Por un lado, se utilizaron alquil cloroformiatos (método A) y por otro anhídrido trifluoroacético (TFAA) (método B).

**Método A:** Los metil y etil ésteres fueron preparados por esterificación con alquilcloroformiatos [1] (Figura 2.3). En un tubo Eppendorf de 1.5 ml se pesa 1 mg de cada compuesto, y se adicionan 100  $\mu$ l de alcohol/agua/piridina (60:32:8), y 6  $\mu$ l de cloroformiato de alquilo (metil o etil cloroformiato). La mezcla es sonicada por 5 segundos y finalmente los analitos derivatizados son extraídos con 100  $\mu$ l de cloroformo conteniendo 1% del correspondiente alquilcloroformiato. Luego de la separación de fases, una alícuota de la fase orgánica es inyectada en la columna capilar.

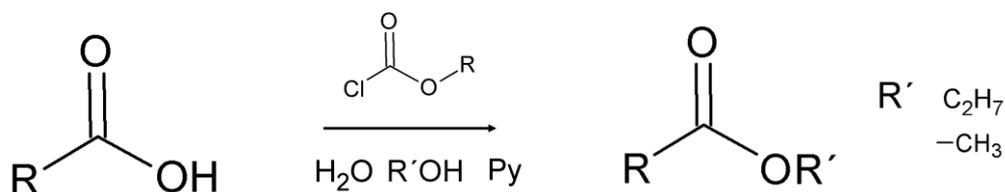


Figura 2.3. Reacción de esterificación con alquilcloroformiatos

**Método B:** Para la esterificación con anhídrido trifluoroacético y trifluoroetanol, la mezcla de reacción conteniendo aproximadamente 1 mg de cada compuesto y 100  $\mu$ l de TFAA más 50  $\mu$ l de TFE, fue calentada a 110°C en un vial cerrado durante 20 min. Luego de enfriar, se abrió el vial y el solvente fue removido en atmósfera de nitrógeno. El residuo se disolvió en 200  $\mu$ l de diclorometano (Figura 2.4).

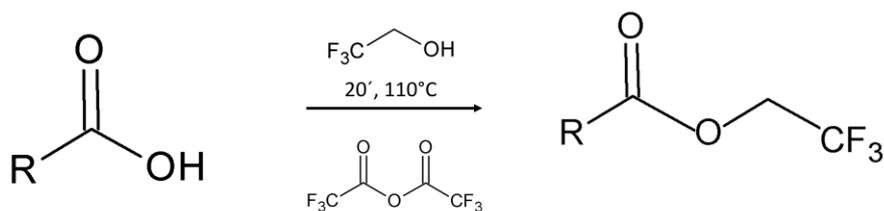


Figura 2.4. Reacción de esterificación con TFAA/TFE

### 2.2.4.2 Aminoácidos

Para la síntesis de los derivados N-trifluoroacetyl metil éster de aminoácidos se realizó el siguiente procedimiento. Se pesó 1 mg de aminoácidos y se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de solución de metanol en ácido clorhídrico al 15%, luego el vial fue calentado a  $120^\circ\text{C}$  por 20 min. Después del enfriamiento, el solvente es removido en corriente de nitrógeno. Se agregan 110  $\mu\text{l}$  de diclorometano y 100  $\mu\text{l}$  de anhídrido trifluoroacético al residuo. Luego de agitar la mezcla de reacción se calienta a  $120^\circ\text{C}$  por 10 minutos, seguido por enfriamiento y evaporación de los solventes a temperatura ambiente en una corriente de nitrógeno. El residuo fue disuelto en diclorometano [2]. En la Figura 2.5 se muestra el esquema de la reacción.

La solución de ácido clorhídrico metanólico se preparó agregando 0.2 ml de cloruro de acetilo a 1 ml de metanol frío. Dicha reacción es exotérmica, y debe realizarse cuidadosamente bajo campana.

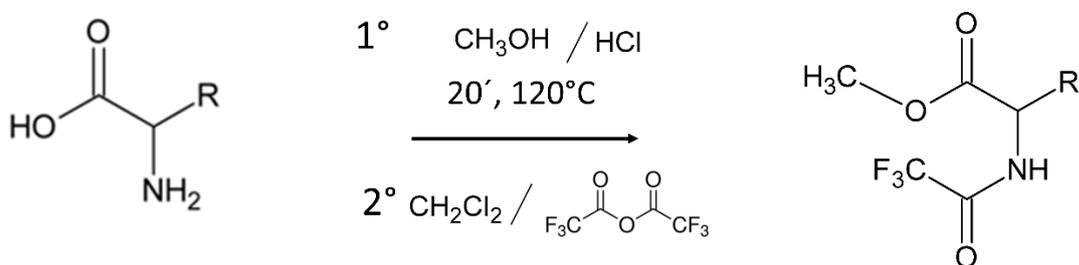


Figura 2.5. Reacción de síntesis de los derivados N-trifluoroacetyl metil éster de aminoácidos

## 2.2.5 Medidas de densidad

Debido a que los volúmenes y las temperaturas de trabajo impidieron emplear un densímetro digital, se construyó un picnómetro tipo Gay-Lussac de pequeño volumen el cual fue calibrado con n-tetradecano y n-hexadecano de alta pureza, en el rango de temperaturas entre 50°C y 140°C.

La densidad del n-tetradecano fue calculada mediante la siguiente ecuación, la cual fue obtenida de la bibliografía [3]:

$$\rho_{C14}\left(\frac{Kg}{m^3}\right) = 942.486 - 0.5355T - 2.6334 \times 10^{-4}T^2 \quad (T: K) \quad (2.1)$$

mientras que la densidad del n-hexadecano fue calculada mediante la ecuación obtenida de la referencia [4]:

$$\rho_{C16}\left(\frac{Kg}{m^3}\right) = \frac{31.9201}{0.181893^{1+\left(1-\frac{T}{342.438}\right)^{0.324527}}} \quad (T: K) \quad (2.2)$$

La densidad del polímero OV-1701-vi y de dos soluciones conteniendo 10.05% (p/p) y 19.45 % (p/p) del selector quirral en el polisiloxano fueron medidas entre 50°C y 140°C.

## 2.2.6 Determinación de la relación de fases y espesor de la fase estacionaria depositada

Conociendo la concentración y la densidad de la fase estacionaria a cada temperatura, y asumiendo una expansión térmica constante de la pared de sílice, es posible obtener la relación de fases ( $\beta$ ) del capilar a cada temperatura según [5]:

$$\beta = \frac{\rho_L(T)}{C_0(T_0)} \exp[\alpha_{Si}(T - T_0)] - 1 \quad (2.3)$$

Donde  $\rho_l(T)$  representa la densidad de la fase estacionaria a la temperatura  $T$ , y  $C_0$  es la concentración de la solución de fase estacionaria en diclorometano, empleada en la construcción de la columna, a temperatura ambiente  $T_0$  (expresado en mg/ml). El coeficiente de expansión de la sílice reportado por el fabricante es  $\alpha_{Si} = 1.96 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ . El espesor de la película de fase estacionaria depositada ( $d_f$ ) puede ser estimado como:

$$d_f = \frac{d_c}{4(\beta+1)} \quad (2.4)$$

donde  $d_c$  es el diámetro interno del capilar expresado en  $\mu\text{m}$ .

## 2.2.7 Instrumentación

Para las medidas cromatográficas de la presente tesis, se utilizaron dos instrumentos. Un cromatógrafo de gases HP 6890 equipado con un detector de ionización de llama (FID) y puerto de inyección manual. Los datos fueron adquiridos mediante el software Clarity® (DataApex, República Checa). El gas portador fue nitrógeno de grado cromatográfico. Las inyecciones fueron realizadas en el modo división de flujo, con una relación 1/25, a presión constante de 8 psi. La temperatura del inyector y detector fueron de 200°C y 250°C, respectivamente. El otro instrumento empleado es un cromatógrafo de gases Shimadzu CG-MS QP2010 acoplado a un detector de masas. En este caso se utilizó hidrógeno de grado cromatográfico como gas portador, modo de inyección sin división de flujo con un tiempo de espera de 2 min, y caudal constante de 4 ml/min. La temperatura del inyector fue de 260°C y la temperatura de la interfaz de 200°C.

La extracción del metalaxil y metalaxil ácido desde la matriz suelo, fue llevada a cabo utilizando un horno de microondas (MARS-5, CEM Corporation, Matthews, NC, EE. UU.) equipado con 24 vasos de politetrafluoroetileno (teflón).

## 2.2.8 Determinación del tiempo muerto

Los valores del tiempo muerto ( $t_M$ ) fueron calculados por ajuste de los tiempos de retención de una serie de n-alcenos (desde n-heptano hasta n-tetradecano) junto con metano, a la ecuación polinómica [6]:

$$tR(n) = tM + \exp(A+B(n-1)+ \ln(1- Cn^2)) \quad (2.5)$$

Las mediciones se realizaron entre 50°C y 140°C. En la ecuación (2.5),  $tR(n)$  es el tiempo de retención de un n-alceno con  $n$  átomos de carbono,  $A$ ,  $B$ ,  $C$  y  $t_M$  son los parámetros de ajuste no lineal de la ecuación. El  $t_M$  fue calculado usando el software SigmaPlot (Systat Software, Inc.). Los datos calculados son el resultado de triplicados de los tiempos de retención de los n-alcenos.

## 2.2.9 Incubación de metalaxil en suelo

El suelo colectado en la región gran La Plata, fue secado y tamizado, con el objetivo de obtener un porcentaje de humedad del 18%. En experimentos separados se realizó la incubación de metalaxil racémico y R-metalaxil. En frascos individuales se colocaron 4g de suelo y se le adicionó 80  $\mu$ l de una solución 100 ppm de metalaxil racémico (50 ppm en el caso de R-metalaxil). Para asegurar condiciones aeróbicas, los frascos fueron abiertos cada 3 días y mantenidos a temperatura ambiente.

## 2.2.10 Procedimiento de extracción de metalaxil y metalaxil ácido del suelo

El método optimizado para la extracción de metalaxil y metalaxil ácido consistió en los siguientes pasos: se tomaron 2g de suelo y se lo traspasó al tubo PTFE, se le agregó 2 ml de MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30), pH=2 y se lo agitó con un vortex durante 2 minutos. Luego le aplicó radiación de microondas durante 60 minutos a una potencia de 720W. Transcurrido el tiempo

se lo pasó a un tubo cónico de centrifuga, y se lo centrifugó durante 15 minutos a 4200 rpm. Se guardó el sólido remanente, para realizar una segunda extracción repitiendo el procedimiento, mientras que al sobrenadante se le agregó 60 mg de NaCl, y luego los analitos fueron re-extraídos de la mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O con 3 porciones de 1 ml de diclorometano. Finalmente, los dos extractos fueron combinados y se llevaron a sequedad.

Debido a la naturaleza química del metalaxil ácido, no puede ser analizado directamente por cromatografía gaseosa, con lo cual, el extracto fue derivatizado según el método B indicado en el apartado 2.2.4.1.

## 2.3 Referencias

- [1] P. Hušek, Derivatization and Gas Chromatographic Determination of Hydroxycarboxylic Acids Treated With Chloroformates, *J. Chromatogr.* 547 (1991) 307-314.
- [2] P.A. Levkin, A. Ruderisch, V. Schurig, Combining the Enantioselectivity of a Cyclodextrin and a Diamide Selector in a Mixed Binary Gas-Chromatographic Chiral Stationary Phase, *Chirality* 18 (2006) 49-63.
- [3] T.S. Khasanshin, A.P. Shchemelev, The Thermodynamic Properties of n -Tetradecane in Liquid State, *High Temp.* 40 (2002) 207-211.
- [4] The Dortmund Data Bank (DDBST GmbH), (n.d.).  
<http://ddbonline.ddbst.de/DIPPR105DensityCalculation/DIPPR105CalculationCGI.exe?component=Hexadecane>.
- [5] F.R. González, J. Pérez-Parajón, J.A. García-Domínguez, Effects of Solvent Density on Retention in Gas-Liquid Chromatography I. Alkanes Solutes in Polyethylene Glycol Stationary Phases, *J. Chromatogr. A* 953 (2002) 151-163.
- [6] F.R. Gonzalez, Consistency of Gas Hold-up Determinations, *J. Chromatogr. A* 832 (1999) 165-172.

# Capítulo 3

---

Determinación de constantes de asociación selector-enantiómero entre octakis(6-*O*-*tert*-butildimetilsilil-2,3-di-*O*-acetil)- $\gamma$ -ciclodextrina y derivados de aminoácidos

### 3.1 Objetivo

El objetivo del estudio informado en el presente capítulo fue demostrar que es posible el empleo de columnas capilares para realizar mediciones de constantes de asociación soluto-selector, sin la necesidad de emplear ninguna hipótesis *ad-hoc* para obtener esta información termodinámica. Tradicionalmente, se utilizan columnas rellenas con el fin de obtener valores experimentales de constantes de asociación. La principal desventaja de dicho método son las bajas eficiencias que se alcanzan con columnas rellenas las cuales impiden la resolución de picos en los que las enantioselectividades son bajas, es decir, cuando existen pequeñas diferencias entre las respectivas constantes selector-enantiómero, haciéndose muy dificultosa la resolución de las bandas a la línea de base.

El empleo de columnas capilares preparadas por el método estático, que permite conocer con exactitud la relación de fases, es una alternativa significativamente ventajosa para obtener información de constantes de asociación debido a tres razones:

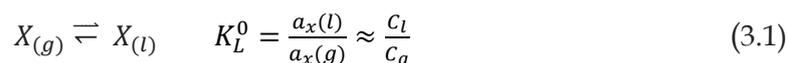
- i) Se evita el empleo de rellenos sólidos (soportes) que introducen una variable más al sistema; esto es, una superficie donde pueden ocurrir procesos adsorptivos adicionales.
- ii) Las columnas capilares son mucho más eficientes, lográndose picos verdaderamente separados a la línea de base, aun cuando las enantioselectividades sean bajas.
- iii) El formalismo matemático es mucho más simple, no requiriéndose otra información que los tiempos de retención de las sustancias, el tiempo muerto del sistema en cada condición de medida, y la relación de fases a cada temperatura.

## 3.2 Marco teórico

### 3.2.1 Contantes de asociación selector-enantiómero

Cuando un analito volátil, capaz de asociarse rápidamente y reversiblemente con un selector quiral S diluido en un solvente aquiral, migra a través de una columna de CG, pueden tener lugar dos equilibrios diferentes, 1) la distribución no-selectiva del soluto entre la fase vapor y el solvente y 2) la asociación selectiva del selector y el enantiómero para formar la asociación transitoria reversible en el solvente.

La partición de un soluto X entre una fase líquida aquiral y una fase vapor estará dada por el siguiente equilibrio:



donde  $a_{x(l)}$  y  $a_{x(g)}$  representan la actividad del soluto X en la fase líquida y la fase vapor, respectivamente,  $C_i$  las concentraciones en las respectivas fases, y  $K_L^0$  denota la constante del equilibrio de partición del soluto X entre la fase líquida y vapor.

Suponiendo que el soluto en fase vapor se comporta idealmente:

$$\frac{n_{x,g}}{V_g} = \frac{P}{RT} \quad (3.2)$$

siendo  $n_{x,g}$  y  $V_g$  los moles de soluto en la fase vapor y el volumen de gas, respectivamente, R la constante general de los gases y T la temperatura absoluta. P es la presión parcial del soluto en el equilibrio, que, dentro de la zona de cumplimiento de la ley de Henry, está determinada por:

$$P = \gamma_x^\infty x_x P_x^0 \quad (3.3)$$

donde  $\gamma_x^\infty$  y  $P_x^0$  representan, respectivamente, el coeficiente de actividad del soluto infinitamente diluido en el solvente sin selector quiral y la presión de vapor del soluto puro a la temperatura de la columna y  $x_x$  es la fracción molar del soluto en la fase líquida.

Reemplazando la expresión (3.3) en (3.2):

$$\frac{n_{x,g}}{V_g} = \frac{\gamma_x^\infty x_x P_x^0}{RT} \quad (3.4)$$

La fracción molar del soluto a dilución infinita puede escribirse como:

$$x_x = \frac{n_{x,l}}{n_{x,l} + N_l} \approx \frac{n_{x,l}}{N_l} \quad (3.5)$$

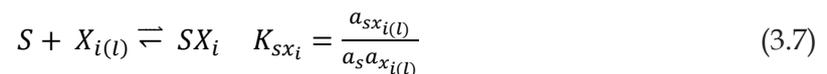
donde  $n_{x,l}$  son los moles de soluto en fase líquida y  $N_l$  son los moles de fase estacionaria.

Reemplazando la ecuación (3.5) en la (3.4) y considerando que  $K_L^0 = C_l/C_g$  se obtiene la relación fundamental de reparto de un analito entre la fase vapor (móvil) y la fase líquida (estacionaria) [1,2]:

$$K_L^0 = \frac{RT}{P_x^0 \gamma_x^\infty v_L} \quad (3.6)$$

donde  $v_L$  es el volumen molar de la fase líquida.

El equilibrio de asociación de un enantiómero específico  $X_i$  y el selector quiral  $S$  disuelto en un solvente líquido (polimérico) puede expresarse como:



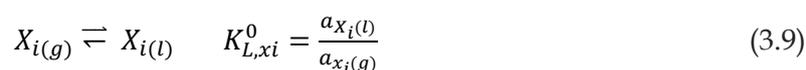
donde  $a_{X_i(l)}$  expresa la actividad del enantiómero  $i$  en la fase líquida formada por el selector quiral disuelto en el solvente aquiral,  $a_S$  es la actividad del selector en la fase estacionaria y  $a_{SX_i(l)}$

representa la actividad del complejo (1:1) formado entre el enantiómero  $X_i$  y el selector quiral  $S$ ,  $K_{sx_i}$  representa la constante de asociación del complejo formado en el solvente aquiral.

Como la actividad de  $X_i$  presente en la fase líquida es la suma de  $a_{sx_i(l)}$  y  $a_{x_i(l)}$ , se define una constante de equilibrio aparente como:

$$K_{ap,x_i} = \frac{a_{sx_i(l)} + a_{x_i(l)}}{a_{x_i(g)}} \quad (3.8)$$

La constante de distribución ( $K_{L,x_i}^0$ ) del enantiómero  $X_i$  entre la fase vapor y la fase líquida, formada por la solución selector quiral/solvente, estará dada por el siguiente equilibrio:



donde por analogía con la ecuación (3.6),  $K_{L,x_i}^0$  puede ser escrita como:

$$K_{L,x_i}^0 = \frac{RT}{P_x^0 \gamma_{X_i+S}^\infty v_{L+S}} \quad (3.10)$$

siendo  $\gamma_{X_i+S}^\infty$  el coeficiente de actividad a dilución infinita para el enantiómero  $X_i$  en la mezcla líquida conteniendo el selector quiral y  $v_{L+S}$  representaría el "volumen molar" de esta fase líquida constituida por selector/solvente aquiral.

Combinando la ecuación (3.9) y la (3.7), la ecuación (3.8) puede ser reescrita como:

$$K_{ap,x_i} = K_{L,x_i}^0 + K_{L,x_i}^0 K_{sx_i} a_s = K_{L,x_i}^0 (1 + K_{sx_i} a_s) \quad (3.11)$$

y, según la ecuación (3.10):

$$K_{ap,x_i} = \frac{RT}{P_x^0 \gamma_{X_i+S}^\infty v_{L+S}} (1 + K_{sx_i} a_s) \quad (3.12)$$

Combinando la ecuación (3.12) con la ecuación (3.6), la constante de partición aparente puede ser escrita como función del coeficiente de partición gas-líquido del soluto como:

$$K_{ap,x_i} = \frac{\gamma_1^\infty v_L}{\gamma_{x_i+s}^\infty v_{L+S}} K_L^0 (1 + K_{sx_i} a_s) = K_L^{*,0} (1 + K_{sx_i} \gamma_s m_s) \quad (3.13)$$

donde  $K_L^{*,0}$  ha sido definida como la combinación entre  $K_L^0$  con la relación de los coeficientes de actividad del soluto en el solvente puro respecto del mismo en la solución selector quiral/solvente y la relación de los volúmenes molares. La actividad del selector quiral  $a_s$  puede ser escrita como el producto de su concentración molal  $m_s$  y su coeficiente de actividad  $\gamma_s$ . En efecto, el producto  $K_{sx_i} \gamma_s$  corresponde a la constante de asociación estequiométrica.

En la ecuación (3.13) se puede hipotetizar que  $K_L^{*,0}$  será una buena estimación de  $K_L^0$  solo si la relación  $\gamma_1^\infty v_L / \gamma_{x_i+s}^\infty v_{L+S}$  tiende a la unidad. Esto es, si el "volumen molar de la solución" es similar al volumen molar del líquido puro y, el coeficiente de actividad a dilución infinita en la mezcla no difiere significativamente de su valor en el solvente puro. Estas condiciones serán satisfechas *a priori* para las soluciones diluidas, aunque esta suposición debe ser probada.

De acuerdo con la ecuación (3.13), un gráfico de  $K_{ap,x_i}$  como función de  $m_s$  será una línea recta solamente si la presencia de concentraciones crecientes de selector quiral no afecta  $\gamma_s$  de manera significativa. En ese caso se puede estimar  $K_{sx_i}$  a partir de las pendientes de regresión lineal por cuadrados mínimos entre  $K_{ap,x_i}$  y  $m_s$ .

Para una columna capilar conteniendo solvente puro (sin selector quiral) a una dada temperatura, la relación entre la retención de soluto y su coeficiente de partición gas-líquido es:

$$K_L^0 = k^0 \beta^0 \quad (3.14)$$

$k^0$  y  $\beta^0$  representan respectivamente el factor de retención del soluto y la relación de fases de la columna. Por otro lado, para una columna conteniendo una dada mezcla de selector quiral en el solvente, la relación entre el factor de retención del enantiómero ( $k$ ) y la constante de partición aparente está dada por:

$$K_{ap,x_i} = k\beta \quad (3.15)$$

donde  $\beta$  es ahora la relación de fases de esta columna conteniendo el selector quiral S a la concentración  $m_s$ . Ambas mediciones dependen de las determinaciones de: retención del enantiómero, tiempo muerto, y de las correspondientes relaciones de fase en cada columna y a cada temperatura.

### 3.2.2 Selectividad verdadera y selectividad aparente

La relación entre las constantes de asociación para cada enantiómero con el selector quiral,  $K_{sx_D}/K_{sx_L}$ , determina el factor de enantioselectividad verdadero  $\alpha_{D/L}$ , donde arbitrariamente se postula que el enantiómero D tiene mayor retención que el enantiómero L. Este factor de enantioselectividad verdadero cuantifica la verdadera capacidad de enantiorreconocimiento impartida por el selector quiral S sobre los enantiómeros D y L. Por otro lado, la relación entre los factores de retención cromatográficos de los dos enantiómeros,  $k_D$  y  $k_L$ , determina el factor de enantioseparación aparente  $\alpha_{ap}$ . Este factor de enantioseparación aparente tiene en cuenta tanto la contribución enantioselectiva dada por el selector quiral S con los enantiómeros, como la contribución no enantiomérica debido a la interacción con el solvente no quiral. Igualando las ecuaciones (3.13) y (3.15)  $K_{ap,xi}$  será:

$$K_{ap,xi} = K_L^{*,0} (1 + K_{sx_i} \gamma_s m_s) = k_i \beta \quad (3.16)$$

y  $\alpha_{ap}$  puede ser expresada como:

$$\alpha_{ap} = \frac{k_D}{k_L} = \frac{K_{ap,D}}{K_{ap,L}} = \frac{(1 + K_{sx_D} m_s)}{(1 + K_{sx_L} m_s)} \quad (3.17)$$

Esta enantioselectividad es aparente porque dependerá de la molalidad del selector. Se hará independiente de la concentración tendiendo al valor de la verdadera enantioselectividad a medida que aumenta esta concentración y la contribución de la retención no enantioselectiva disminuye en importancia, esto es, los segundos términos son matemáticamente dominantes en el numerador y el denominador de la ecuación (3.17).

### 3.2.3 Influencia de la temperatura en la enantioselectividad

La influencia de la temperatura en cromatografía de gases quirales es fundamental, determina la retención, enantioselectividad y, consecuentemente, la enantiorresolución. El comportamiento usualmente observado es que tanto los factores de retención como de enantioselectividad disminuyen al aumentar la temperatura de la columna.

La termodinámica clásica proporciona una expresión que relaciona el cambio en la energía libre molar parcial estándar de un soluto en función de la constante de equilibrio que, en el caso de cromatografía quiral, será la constante de asociación del soluto *i* con el selector quiral ( $K_{SXi}$ ). La expresión es la siguiente:

$$RT \ln K_{SXi} = -\Delta G_{SXi}^0 \quad (3.18)$$

donde *R* es la constante de los gases, *T* es la temperatura absoluta, y  $\Delta G_{SXi}^0$  es el cambio en la energía libre estándar de Gibbs para el proceso de formación del complejo entre enantiómero y selector quiral.

A su vez, el cambio de energía libre estándar de Gibbs puede ser escrito como la suma de otras dos funciones de estado:

$$\Delta G_{SXi}^0 = \Delta H_{SXi}^0 - T\Delta S_{SXi}^0 \quad (3.19)$$

siendo  $\Delta H_{SXi}^0$  y  $\Delta S_{SXi}^0$  respectivamente, el cambio de entalpía y de entropía molares parciales debidos al proceso de asociación entre *i* y el selector quiral. La dependencia entre la constante de asociación del soluto *i* ( $K_{SXi}$ ) con la temperatura puede expresarse según la siguiente ecuación:

$$\ln K_{SXi} = -\frac{\Delta H_{SXi}^0}{RT} + \frac{\Delta S_{SXi}^0}{R} \quad (3.20)$$

Combinando esta expresión con el factor de enantioselectividad verdadero ( $\alpha_{D/L} = K_{sx_D}/K_{sx_L}$ ), se puede escribir que:

$$RT \ln \alpha_{D/L} = -\Delta(\Delta H_{SXi}^0) + T\Delta(\Delta S_{SXi}^0) = -\Delta(\Delta G_{SXi}^0) \quad (3.21)$$

donde  $\Delta(\Delta H_{SXi}^0)$ ,  $\Delta(\Delta S_{SXi}^0)$  y  $\Delta(\Delta G_{SXi}^0)$  expresan, respectivamente, las diferencias en el cambio entalpía, de entropía y de energía libre, para la asociación de cada enantiómero con el selector quiral disueltos en el polisiloxano. Del ajuste lineal de  $\ln \alpha_{D/L}$  vs  $1/T$  se puede obtener  $\Delta(\Delta H_{SXi}^0)$  y de la diferencia con  $\Delta(\Delta G_{SXi}^0)$  se puede calcular  $\Delta(\Delta S_{SXi}^0)$ , siempre que estas cantidades sean independientes de la temperatura.

Desde el punto de vista fisicoquímico,  $\Delta(\Delta H_{SXi}^0)$  es una medida de las diferencias en las interacciones relativas entre cada enantiómero al transferirse desde la solución en polisiloxano al selector quiral con el que forma un complejo de asociación metaestable. El término entrópico,  $\Delta(\Delta S_{SXi}^0)$ , es una medida de las diferencias en el cambio del estado de orden inducido por la interacción específica entre cada enantiómero y el selector quiral. Valores absolutos mayores (más negativos) de  $\Delta(\Delta H_{SXi}^0)$  indican una asociación más exotérmica para el enantiómero preferencialmente complejado con el selector quiral. Valores negativos de  $\Delta(\Delta S_{SXi}^0)$  pueden interpretarse como un aumento en el orden o una pérdida mayor en los grados de libertad asociados al proceso de enantiorreconocimiento con el enantiómero con el que el selector forma el complejo más estable. Usualmente, la formación de asociaciones intermoleculares altamente ordenadas conlleva a 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, por ejemplo, en complejaciones en medios solvatados. En las situaciones en que este proceso de desolvatación domina,  $\Delta(\Delta S_{SXi}^0)$  será positivo y, entonces, el proceso de enantioseparación se favorece al aumentar la temperatura. No es el caso de complejaciones en cromatografía de gases.

Dado que la formación del complejo enantiómero-selector quiral más fuerte, es decir, enantiómero más retenido, implica una ganancia en entalpía y una pérdida de entropía (mayor ordenamiento en el complejo unido más fuertemente), las dos contribuciones a la diferencia de energía de Gibbs de la asociación actúan en direcciones opuestas y habría una temperatura

particular a la cual estas contribuciones se anulan entre sí. Esta temperatura, llamada temperatura de isoelución,  $T_{ISO}$ , será igual al cociente  $\Delta(\Delta H_{SXi}^0)/\Delta(\Delta S_{SXi}^0)$ . Cuando se alcance dicha temperatura, los enantiómeros coeluyen, es decir,  $K_{SXD}=K_{SXL}$ ;  $\Delta(\Delta G_{SXi}^0) = -RT \ln \alpha_{D/L} = 0$ ; y  $\alpha_{D/L}=1$ . Koppenhöfer [3], 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 unos pocos casos en CG [4-7].

### 3.3 Resultados y discusión

#### 3.3.1 Densidad de las fases estacionarias

Con el objetivo de conocer con exactitud la relación de fases a cada temperatura de las columnas capilares quirales construidas fue necesario determinar la densidad de las fases estacionarias en función de la temperatura por picnometría. Para ello se calibró un picnómetro tipo Gay-Lussac, de pequeño volumen, utilizando como estándares n-tetradecano y n-hexadecano, cuyas densidades son obtenibles, en el rango de temperaturas de 20 a 140°C de las bases de datos [8,9]. En el Anexo A.II se muestran los resultados de los volúmenes calculados a partir de las masas determinadas con los dos estándares.

En la Figura 3.1 se graficó el volumen del picnómetro obtenido cuando se lo calibró con n-tetradecano y n-hexadecano en función de la temperatura. Se puede observar que no existe variación significativa del volumen del mismo, independientemente del estándar usado en la calibración, con el cambio de temperatura:  $0.362 \pm 0.001$  mL,  $n=39$ , entre 26 y 139°C.

Luego se midió la densidad de OV-1701-vi puro y de dos soluciones (10.05% p/p y 19.45% p/p del selector quiral en el polímero OV-1701-vi) en un rango de temperatura de 50 a 140°C. Los resultados de las densidades fueron graficados (en escala logarítmica) frente a la temperatura absoluta en la Figura 3.2. Puede verse que la densidad de la mezcla selector quiral/polímero aumenta a medida que aumenta el porcentaje de ciclodextrina a todas las temperaturas, siendo menos densa la fase estacionaria conteniendo polisiloxano puro.

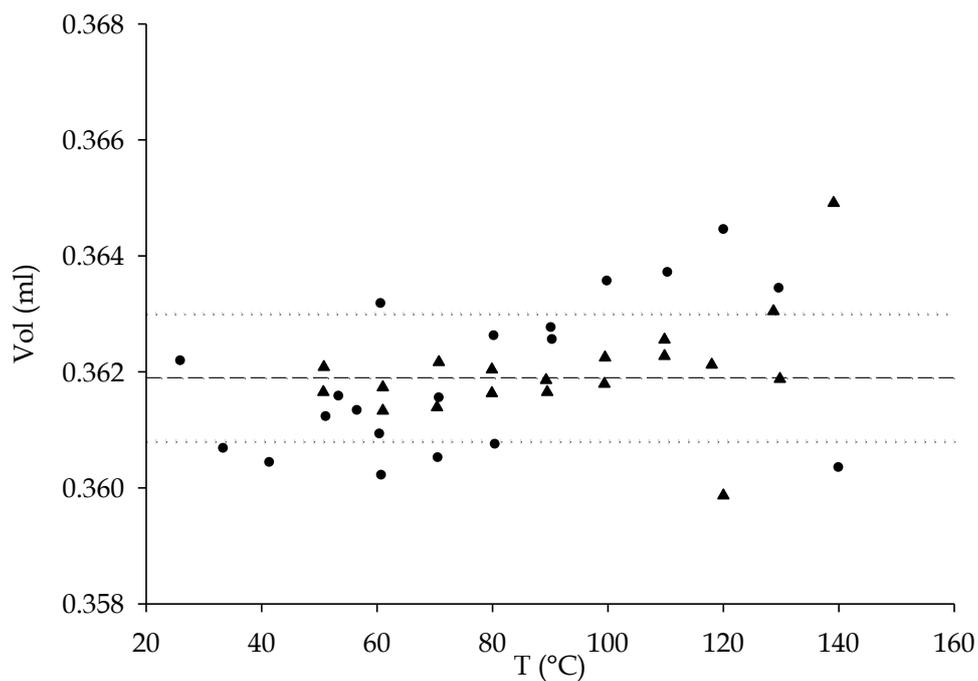


Figura 3.1. Volumen del picnómetro en función de la temperatura. Calculado utilizando los estándares (•) *n*-tetradecano y (▲) *n*-hexadecano

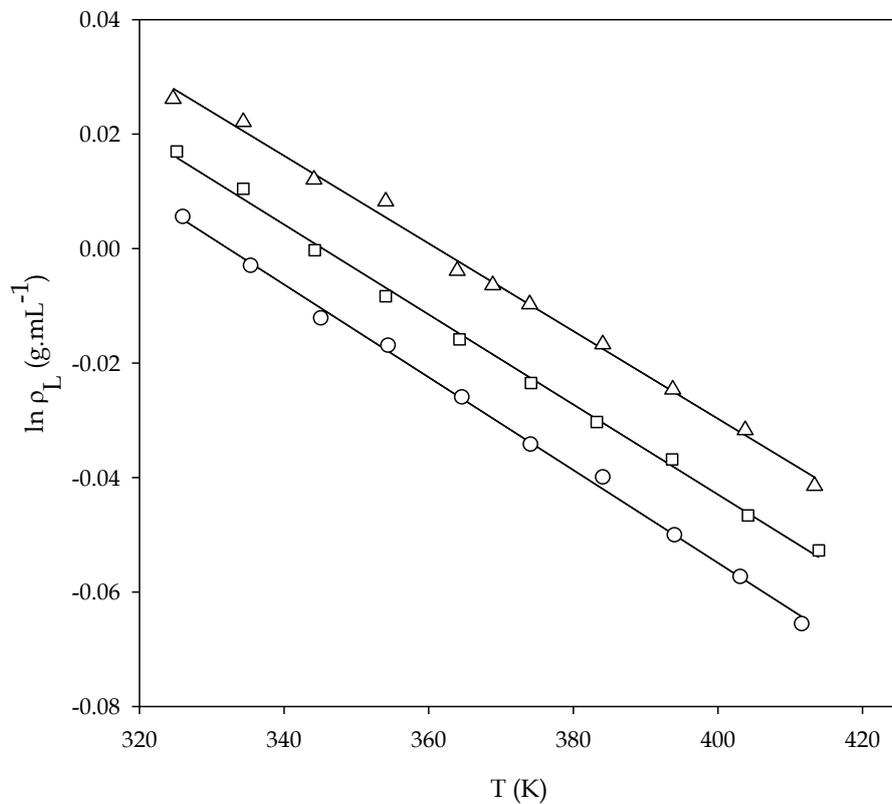


Figura 3.2. Logaritmo de la densidad en función de la temperatura para: (○) 100% p/p OV-1701-vi; (□) 10.05% p/p  $\gamma$ CD en OV-1701-vi y (Δ) 19.45% p/p  $\gamma$ CD en OV-1701-vi.

Luego se ajustaron los datos experimentales mediante un análisis de regresión por cuadrados mínimos a una función lineal. Los ajustes obtenidos son los siguientes:

$$\ln \rho_L \text{ 100\%OV-1701-vi (g/ml)} = 0.269(\pm 0.005) - 0.00081 (\pm 0.00001) \times T \quad (3.22)$$

$$R^2 = 0.998 ; \text{ s.e.} = 0.0011$$

$$\ln \rho_L \text{ 10.005\%CD/OV-1701-vi (g/ml)} = 0.271 (\pm 0.005) - 0.00079 (\pm 0.00001) \times T \quad (3.23)$$

$$R^2 = 0.997 ; \text{ s.e.} = 0.0013$$

$$\ln \rho_L \text{ 19.45\%CD/OV-1701-vi (g/ml)} = 0.277 (\pm 0.006) - 0.00076 (\pm 0.00001) \times T \quad (3.24)$$

$$R^2 = 0.995 ; \text{ s.e.} = 0.0015$$

A partir de las ecuaciones (3.22), (3.23) y (3.24) se calcularon las densidades a temperaturas fijas, se realizó una regresión lineal de las densidades en función del porcentaje peso en peso de la CD a cada temperatura observándose un comportamiento lineal. Estas ecuaciones fueron usadas para calcular la densidad de las fases usadas en la construcción de las columnas a cualquier temperatura. Los datos se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Datos de densidad calculada para las mezclas del selector quirral y el polisiloxano OV-1701-vi para las 4 columnas construidas.

T (°C)	$\rho_L$ (g/ml)			
	9.55% p/p $\gamma$ -CD <sup>a</sup>	18.04% p/p $\gamma$ -CD	26.8% % p/p $\gamma$ -CD	47.4 % p/p $\gamma$ -CD
50	1.005	1.015	1.026	1.050
60	0.997	1.007	1.018	1.042
70	0.989	0.999	1.010	1.034
80	0.981	0.991	1.002	1.026
90	0.973	0.983	0.994	1.018
100	0.965	0.975	0.986	1.010
110	0.957	0.967	0.978	1.002
120	0.949	0.959	0.970	0.994
130	0.941	0.951	0.962	0.986
140	0.933	0.943	0.954	0.978

<sup>a</sup> $\gamma$ -CD nomenclatura usada para Octakis(6-O-tert-butildimetilsilil-2,3-di-O-acetil)- $\gamma$ -ciclodextrina

## 3.3.2 Características físicas y cromatográficas de las columnas

### 3.3.2.1 Relación de fases $\beta$ y espesor de film

Para las columnas construidas a partir del método estático, tanto la relación de fases  $\beta$  como el espesor de film se pueden calcular muy precisamente a cualquier temperatura, utilizando las ecuaciones (2.3) y (2.4) respectivamente. Estas ecuaciones permiten una estimación exacta de ambas propiedades. Generalmente los fabricantes de columnas comerciales no proveen dicha información y en los casos en que esta propiedad se informa, la misma se asume invariable con la temperatura.

En la Tabla 3.2 se muestran las características de las 5 columnas construidas donde puede observarse un aumento en los valores de  $\beta$  hasta del 8% en el intervalo de temperatura entre 50 y 140 °C.

### 3.3.2.2 Tiempo muerto

En la Tabla 3.3 se muestran los resultados del  $t_M$ , calculado de la retención de los alcanos lineales cuyos datos fueron ajustados a la ecuación (2.5), junto con la retención del metano ( $t_{R(CH_4)}$ ) medida en cada columna. Los coeficientes de partición gas-líquido para el metano,  $K_{CH_4}$ , calculado como:

$$K_{CH_4} = \beta(t_{R(CH_4)} / t_M - 1) \quad (3.25)$$

luego fueron usados para obtener el  $t_M$  en cada corrida por inyección de metano en cualquier condición de presión a la temperatura correspondiente.

Puede observarse en la Tabla 3.3 que las diferencias entre  $t_M$  y  $t_{R(CH_4)}$  no son significativas para ninguna de estas columnas a ninguna de las temperaturas evaluadas.

Tabla 3.2. Características de las columnas capilares construidas

	Columna 0		Columna 1		Columna 2		Columna 3		Columna 4	
% (p/p) $\gamma$ -CD en OV1701-vi	0		9.55%		18.0%		26.8%		47.4 %	
Concentración molal $\gamma$ -CD	-		m= 0.0366		m= 0.0782		m= 0.127		m= 0.313	
concentración solución <sup>a</sup> (g/ml)	0.0332		0.00314		0.00388		0.00369		0.0015	
T (°C)	$\beta^b$	$d_f^c$ (um)	$\beta$	$d_f$ ( $\mu$ m)						
50	301.0	0.207	319.0	0.195	260.6	0.239	325.6	0.191	700.2	0.089
60	298.6	0.209	316.5	0.197	258.5	0.241	323.1	0.193	694.9	0.090
70	296.2	0.210	313.9	0.198	256.5	0.243	320.5	0.194	689.5	0.091
80	293.8	0.212	311.4	0.200	254.4	0.245	318.0	0.196	684.2	0.091
90	291.4	0.214	308.8	0.202	252.4	0.247	315.4	0.198	678.9	0.092
100	289.0	0.216	306.3	0.203	250.3	0.249	312.9	0.199	673.5	0.093
110	286.6	0.217	303.7	0.205	248.2	0.251	310.3	0.201	668.2	0.093
120	284.2	0.219	301.2	0.207	246.2	0.253	307.8	0.202	662.9	0.094
130	281.8	0.221	298.6	0.209	244.1	0.255	305.2	0.204	657.5	0.095
140	279.4	0.223	296.1	0.210	242.1	0.257	302.7	0.206	652.2	0.096

<sup>a</sup>Concentración de la solución de OV1701-vi + Octakis(6-O-tert-butildimetilsilil-2,3-di-O-acetil)- $\gamma$ -ciclodextrina disueltos en diclorometano usada para el llenado del capilar

<sup>b</sup>Relación de fases, incertidumbre estimada por propagación de errores ( $\pm 0.02$ )

<sup>c</sup>Espesor de film ( $\pm 0.004$ )

Tabla 3.3. Tiempo de retención del metano y tiempo muerto a cada temperatura en las 5 columnas

T (°C)	columna 0		columna 1		columna 2		columna 3		columna 4	
	$t_R(\text{CH}_4)$	$t_M$								
130	0.380	$0.378 \pm 0.003$	0.375	$0.373 \pm 0.005$	0.402	$0.399 \pm 0.005$	0.246	$0.246 \pm 0.006$	0.318	$0.310 \pm 0.01$
120	0.373	$0.371 \pm 0.008$	0.366	$0.364 \pm 0.002$	0.398	$0.397 \pm 0.004$	0.238	$0.236 \pm 0.001$	0.316	$0.320 \pm 0.01$
110	0.369	$0.367 \pm 0.008$	0.359	$0.357 \pm 0.003$	0.390	$0.404 \pm 0.002$	0.236	$0.240 \pm 0.004$	0.310	$0.310 \pm 0.003$
100	0.358	$0.357 \pm 0.005$	0.348	$0.346 \pm 0.002$	0.379	$0.376 \pm 0.002$	0.234	$0.234 \pm 0.005$	0.306	$0.304 \pm 0.002$
90	0.356	$0.354 \pm 0.002$	0.342	$0.341 \pm 0.003$	0.368	$0.365 \pm 0.003$	0.228	$0.225 \pm 0.002$	0.303	$0.302 \pm 0.004$
80	0.349	$0.345 \pm 0.005$	0.338	$0.336 \pm 0.002$	0.364	$0.362 \pm 0.002$	0.225	$0.220 \pm 0.002$	0.295	$0.293 \pm 0.01$
70	0.329	$0.326 \pm 0.070$	0.329	$0.326 \pm 0.007$	0.356	$0.352 \pm 0.004$	0.223	$0.219 \pm 0.006$	0.293	$0.290 \pm 0.006$

### 3.3.2.3 Eficiencia de las columnas

En la Figura 3.3 se muestra un cromatograma de una mezcla de n-alcanos obtenido con la columna 0 a 100°C. La evaluación de performance de las columnas construidas se determinó midiendo el número de platos por metro y las asimetrías para dichos alcanos a diferentes temperaturas. Para las mediciones fisicoquímicas, los criterios impuestos para la aceptación de la columna fueron, picos con asimetrías que oscilaron entre  $0.9 < A_s < 1.1$  y eficiencia cromatográfica superiores a 1000 platos/m a 100°C.

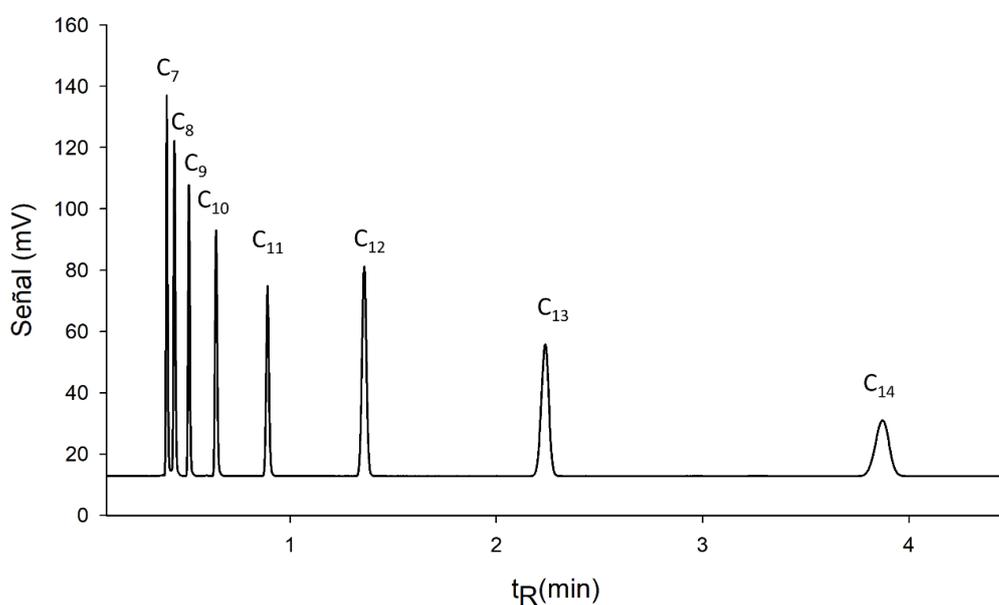


Figura 3.3. Cromatograma de una mezcla de n-alcanos desde n-heptano a n-tetradecano para la columna 0 a 100°C, donde C<sub>7</sub>=n-heptano N/m=1016; C<sub>8</sub>=n-octano N/m=1122; C<sub>9</sub>=n-nonano N/m=1090; C<sub>10</sub>=n-decano N/m= 1355; C<sub>11</sub>=n-undecano N/m=1091; C<sub>12</sub>=n-dodecano N/m= 1002; C<sub>13</sub>=n-tridecano N/m=1023; C<sub>14</sub>=n-tetradecano N/m 1296.

### 3.3.2.4 Capacidad de enantiorreconocimiento

Los datos obtenidos de selectividad aparente en la columna 1 fueron contrastados con datos obtenidos de la bibliografía, donde fueron analizados los mismos derivados de aminoácidos en una columna conteniendo el mismo porcentaje del selector Octakis(6-O-tert-butildimetilsilil-2,3-di-O-acetil)- $\gamma$ -ciclodextrina disuelto en el polímero 100% polidimetilsiloxano [10]. En la Figura 3.4 se muestran los valores de enantioselectividad aparente medidos en la columna 1 en función de la enantioselectividad aparente recogidos de

la referencia. Cabe aclarar que solo se muestran los valores de aquellos solutos que fueron corridos a la misma temperatura. Se puede observar que la selectividad aparente es superior, o a lo sumo igual, en la columna construida en el presente trabajo, respecto de los datos de bibliografía.

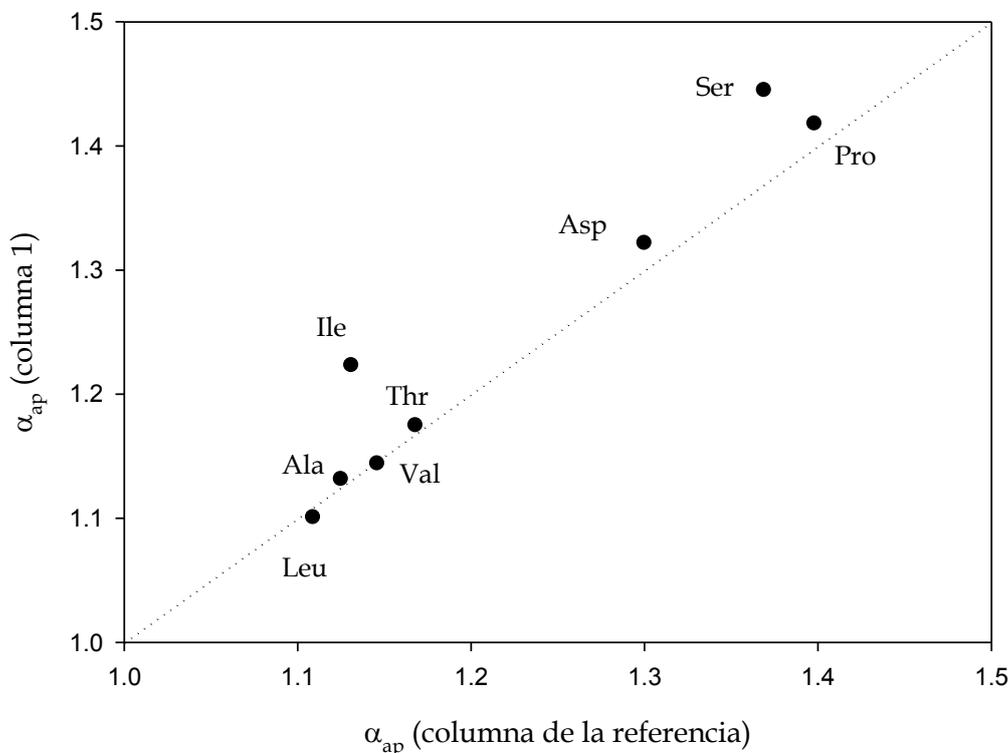


Figura 3.4. Gráfico de la selectividad aparente en la columna 1 en función de la selectividad aparente en la columna de la referencia [10].

### 3.3.2.5 Estudio de la estabilidad de las columnas

La validez de la información que se pretende obtener de estas columnas exige que se evalúe la estabilidad de las mismas cuando son usadas, especialmente si se someten a temperaturas más elevadas. Para esto se evaluó la estabilidad en el tiempo de dos columnas, CDEST 1 (entrecruzada) y CDEST2 (sin entrecruzar). En la Figura 3.5 se muestran los gráficos de A) la enantioselectividad aparente ( $\alpha_{ap}$ ) del derivado de alanina y B) el factor de retención ( $k$ ) para el n-dodecano en ambas columnas en función del tiempo.

La enantioseparación promedio obtenida en ambas columnas fue de  $1.167 \pm 0.003$  (indicado con línea de puntos en la Figura 3.5 A). Esto demuestra que no existe diferencias en la enantiorresolución al utilizar una columna con fase estacionaria entrecruzada. Para la columna CDEST 1 se obtuvo una diferencia en la enantiorresolución del 0.4% luego de 47 semanas, mientras que para la columna CDEST 2 la diferencia fue del 0.8%, con lo cual el

tratamiento de entrecruzamiento de la fase estacionaria aumenta ligeramente la estabilidad de la columna a lo largo del tiempo.

En cuanto a la retención del n-dodecano, en ambas columnas se obtuvo un factor de retención promedio de  $2.8 \pm 0.1$  (línea de puntos Figura 3.5 B), y una diferencia de 8.9 % para la columna entrecruzada y de 7.9% para la columna sin entrecruzar luego de 47 semanas. Sin embargo, los valores de factores de retención se mantuvieron aproximadamente constantes durante la mitad de ese tiempo, observándose un decrecimiento a partir de la semana 25 para ambas columnas.

En conclusión, se puede considerar que las columnas han demostrado ser estables dentro del período demandado por estas mediciones.

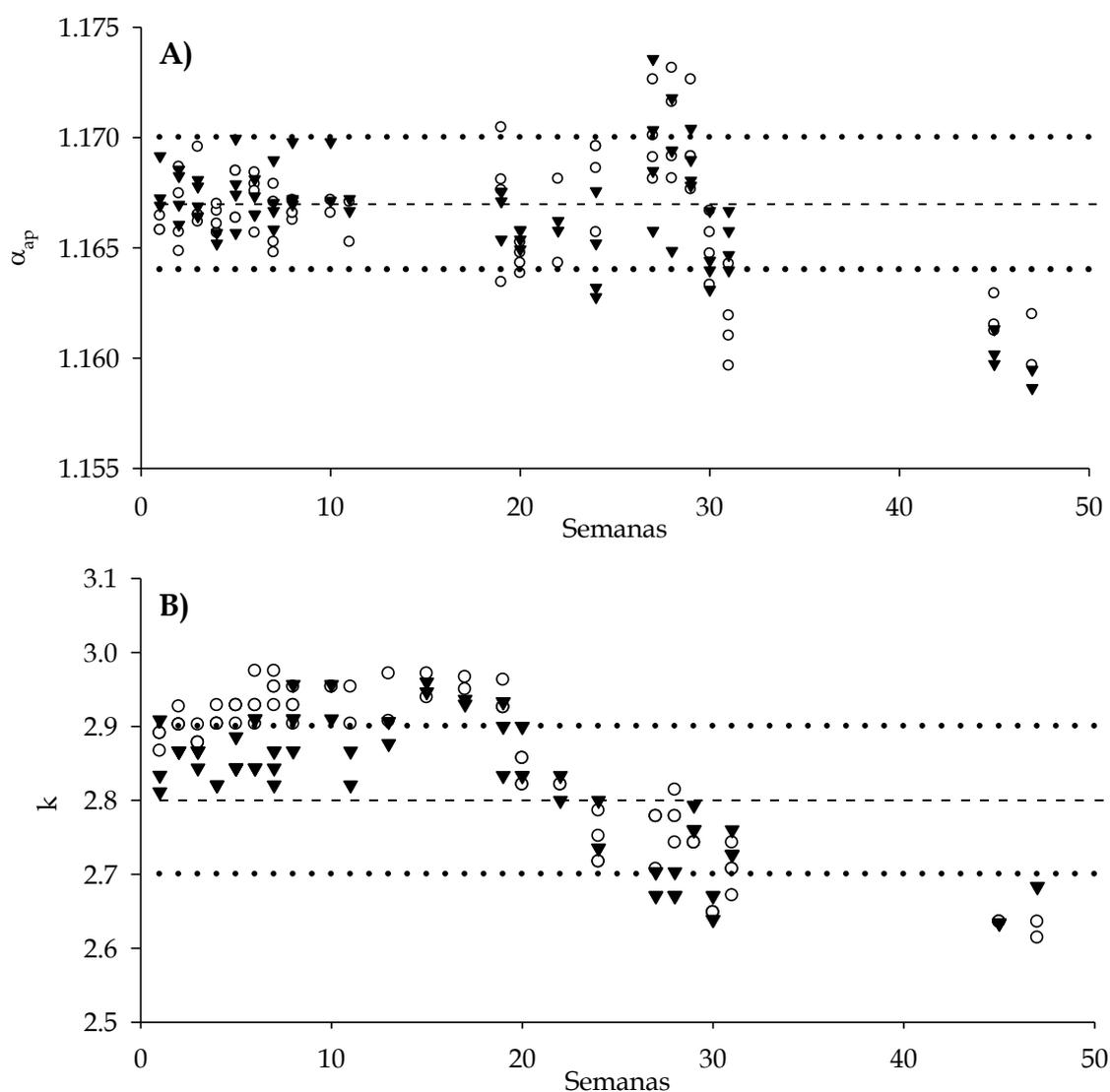


Figura 3.5. A) Factor de enantioselectividad del derivado trifluoroacetil metil éster de alanina en función del tiempo B) Factor de retención de n-dodecano en función del tiempo. Símbolos: (○) Datos en columna CDEST-1; (▼) Datos en columna CDEST-2.

### 3.3.3 Relación entre enantioselectividad y concentración del selector quiral

Los valores experimentales de retención, factores selectividad aparente y enantiorresolución logrados para los derivados de aminoácidos en las 4 columnas quirales a una sola temperatura se muestran en la Tabla 3.4. De los 21 derivados N-trifluoroacetil metil ésteres de aminoácidos aquellos que, con la columna conteniendo menor concentración de selector quiral no se logró la separación a la línea de base, fueron descartados para realizar cálculos precisos con el objeto de verificar el modelo. A modo de ejemplo, en la Figura 3.6 se muestran comparativamente los cromatogramas para algunos derivados de aminoácidos en la columna conteniendo el mayor porcentaje de selector quiral (columna 4) respecto de la columna con menor porcentaje de selector (columna 1), donde se puede observar las excelentes enantiorresoluciones obtenidas. En el Anexo A.III se informan los valores de retención, selectividad aparente y resolución para todos los derivados de aminoácidos en todas las columnas a las distintas temperaturas.

En la Figura 3.7 se muestra de forma representativa los cromatogramas obtenidos para norleucina en las 5 columnas a 100°C. Puede observarse que la enantioselectividad alcanzada en las distintas columnas está fuertemente influenciada por la concentración de selector quiral disuelto en el solvente aquiral. En la Figura 3.7 puede notarse que los picos obtenidos son significativamente más angostos con la columna 4, mientras que los picos más anchos fueron obtenidos con la columna 2. Estas diferencias se atribuyen a que la columna 2 tiene mayor espesor de película y, en consecuencia, existe una mayor dispersión de la banda por resistencia a la transferencia de masa en fase estacionaria. La columna 4 fue construida con menor espesor para compensar el tiempo de retención debido a la mayor concentración de selector.

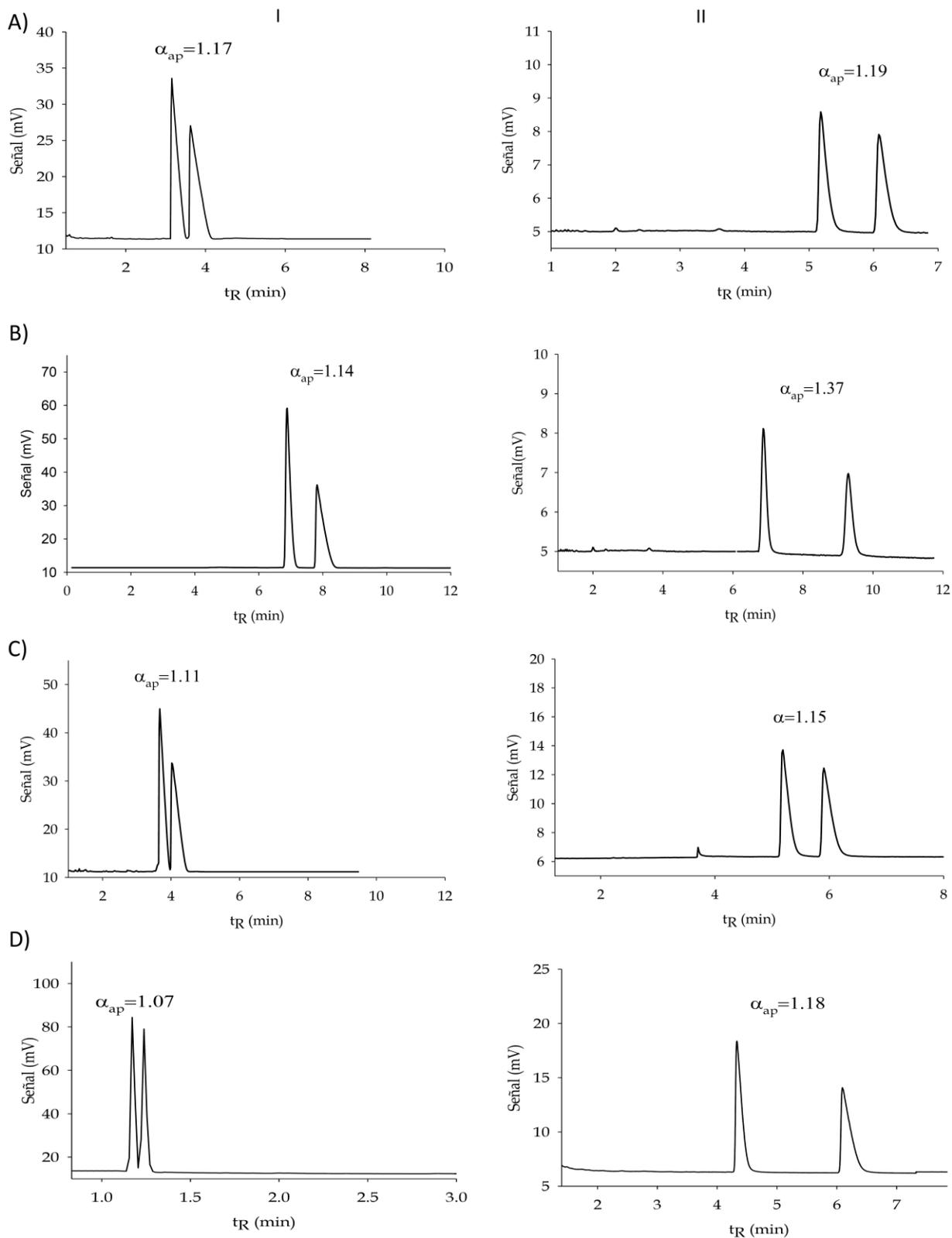


Figura 3.6. Cromatogramas obtenida en Columna 1 (I) y columna 4 (II) para los derivados de A) Ala (90°C), B) Leu (90°C), C) Abu (90°C) D) Val (120°C)

Tabla 3.4. Factores de retención para el primer enantiómero eluído ( $k_L$ ), enantioselectividad aparente ( $\alpha_{ap}$ ) y factores de resolución (Rs) para los derivados de aminoácidos, a una única temperatura.

Solutos	columna 1				columna 2				columna 3				columna 4			
	T	$k_L$	$\alpha_{ap}$	Rs	T	$k_L$	$\alpha_{ap}$	Rs	T	$k_L$	$\alpha_{ap}$	Rs	T	$k_L$	$\alpha_{ap}$	Rs
Ala	70	31.05	1.27	1.57	70	71.24	1.27	1.97	70	76.82	1.25	5.23	70	66.03	1.26	2.26
Leu	80	35.53	1.20	2.93	80	65.41	1.26	2.27	70	60.14	1.34	6.36	70	44.00	1.47	8.13
Abu	70	36.10	1.17	1.24	70	76.78	1.16	1.33	70	84.73	1.18	3.45	70	70.89	1.19	3.01
Ile	70	56.16	1.56	5.12	70	101.7	1.63	4.55	70	100.7	1.75	7.28	70	85.10	1.97	15.63
Val	90	10.16	1.20	2.68	90	16.99	1.22	1.60	90	18.72	1.31	5.22	90	14.06	1.39	6.09
Pro	90	54.31	1.58	4.19	90	92.06	1.64	3.93	90	117.6	1.77	9.85	90	99.19	1.92	10.11
Nor	70	91.88	1.25	4.01	70	163.2	1.27	2.30	70	154.3	1.35	6.42	70	115.8	1.47	8.52
Thr	100	45.06	1.24	1.50	100	82.58	1.24	1.56	100	124.1	1.22	3.60	100	115.5	1.20	2.85
t-Leu	70	34.64	1.54	8.04	70	57.69	1.59	4.14	70	61.44	1.72	11.96	70	49.04	1.91	14.87
Asp	100	74.10	1.46	2.24	100	138.3	1.51	2.90	100	194.2	1.53	5.80	100	174.8	1.59	4.81
Ser	110	27.59	1.65	3.57	120	25.66	1.54	3.63	110	64.69	1.72	4.67	110	54.84	1.75	7.35
Met	100	54.80	1.16	1.54	120	50.52	1.11	1.14	100	218.6	1.28	1.93	100	183.9	1.34	5.08
Asn	100	70.60	1.43	1.74	100	142.5	1.46	3.32	100	191.1	1.54	3.66	100	158.0	1.63	5.62
Glu	100	93.19	1.40	9.05	100	201.4	1.50	3.02	100	161.0	1.59	1.26	100	188.6	1.97	11.06

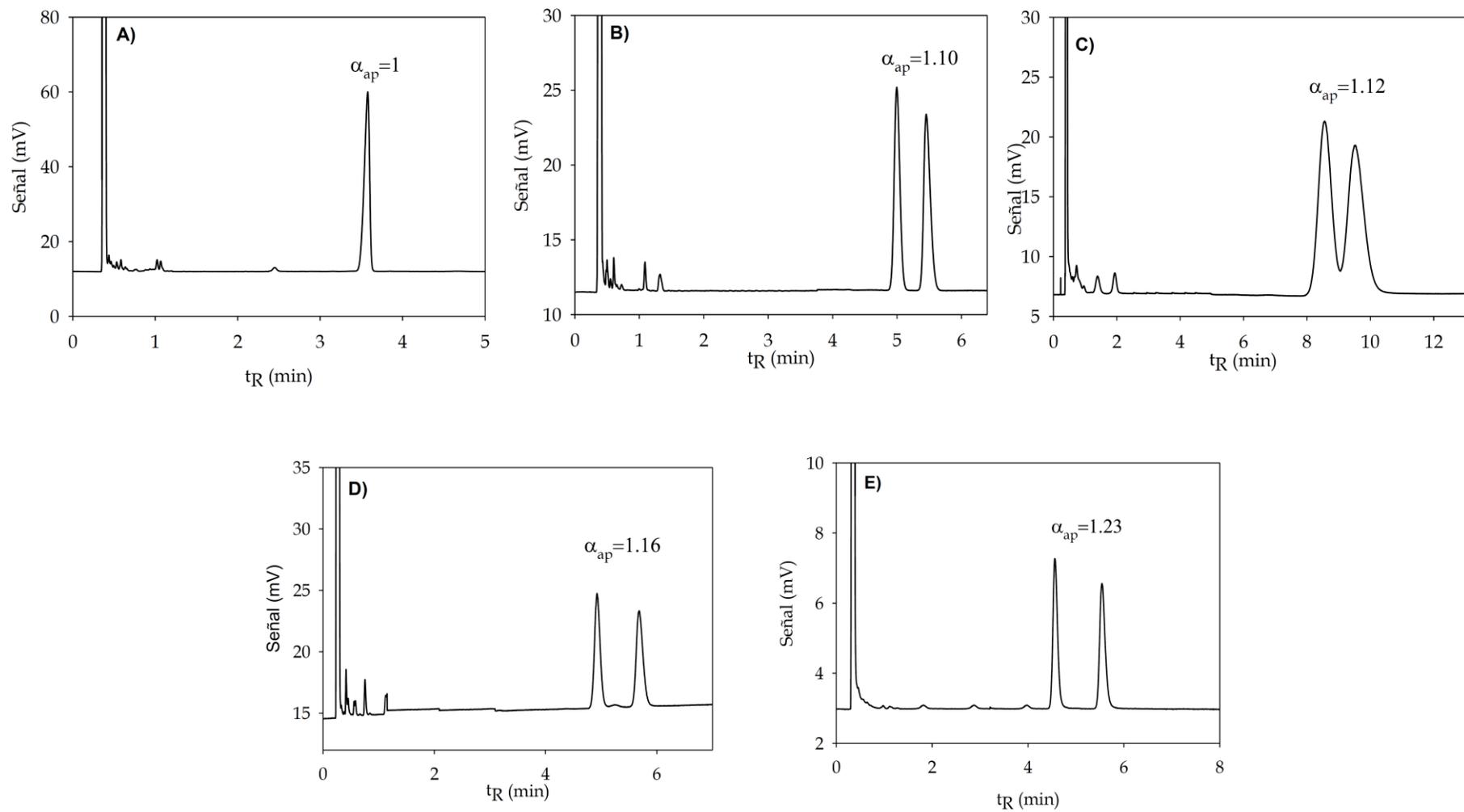


Figura 3.7. Cromatogramas de los enantiómeros del derivado de Nor a 100°C para A) columna 0, B) columna 1, C) columna 2, D) columna 3, E) columna 4 (ver Tabla 3.2)

### 3.3.4 Constantes de asociación enantiómero-selector quirál

La constante de partición aparente para cada enantiómero en cada columna a temperatura constante (definida en la ecuación (3.15)) fue calculada por reordenamiento de la ecuación (3.25) como:

$$K_{ap,xi} = k\beta = \left( \frac{t_{R(x_i)}}{t_{R(CH_4)}} \right) (\beta + K_{CH_4}) - \beta \quad (3.26)$$

donde  $t_{R(x_i)}$  es el factor de retención para cada enantiómero  $X_i$ . Esta constante  $K_{ap,xi}$  experimental depende de la temperatura y de la molalidad de la ciclodextrina, por lo tanto, no se puede obtener información termodinámica a partir de estos datos.

En la Figura 3.8 se muestran algunos los gráficos de la constante de asociación aparente frente a la concentración molal del selector quirál para algunos derivados N-trifluoroacetil metil éster de aminoácidos a temperatura constante.

Para todos los enantiómeros de los derivados de aminoácidos se ha encontrado, sin excepción, un comportamiento lineal entre  $K_{ap,xi}$  y la molalidad del selector quirál. En la Tabla 3.5 se estimaron los parámetros del ajuste lineal con sus correspondientes desviaciones estándar para todos los aminoácidos a 110°C. En el Anexo A.IV se muestran las tablas completas a todas las temperaturas. Del cociente entre la pendiente y los valores experimentales de  $K^0_L$  se calcularon los valores de las constantes de asociación entre cada uno de los enantiómeros y el selector quirál. Los coeficientes de correlación de la regresión lineal ( $R^2 > 0.96$ ) junto con las bajas desviaciones estándar en las pendientes y en las ordenadas, indican excelentes ajustes. Estos resultados pueden ser considerados como evidencias de:

- 1- La estequiometría 1:1 para la complejación entre el enantiómero  $X_i$  y el selector S sugerida en el modelo es correcta;
- 2- La sustitución de la actividad del selector por su concentración molal puede ser aceptada, es decir, el coeficiente de actividad del selector es constante, o bien cambia proporcionalmente con la concentración del selector.
- 3- Los coeficientes de actividad del soluto en la mezcla,  $\gamma_{X_i+S}^\infty$ , son constantes, o, varían linealmente con la concentración molal del selector quirál

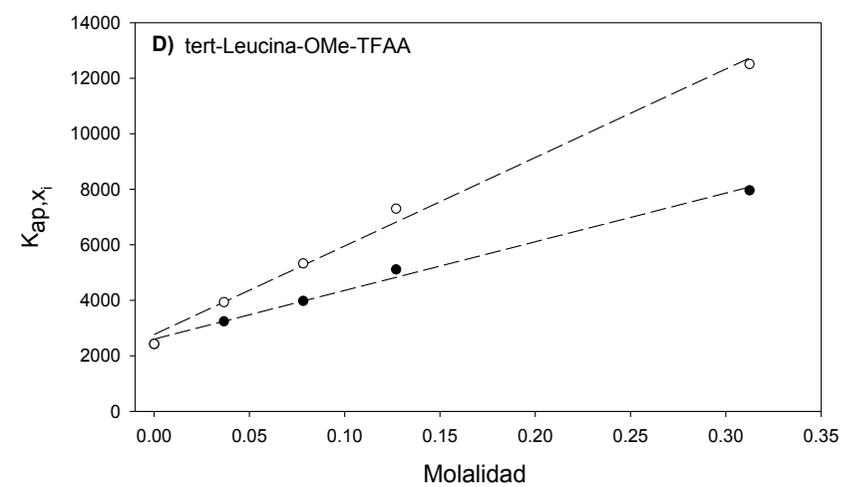
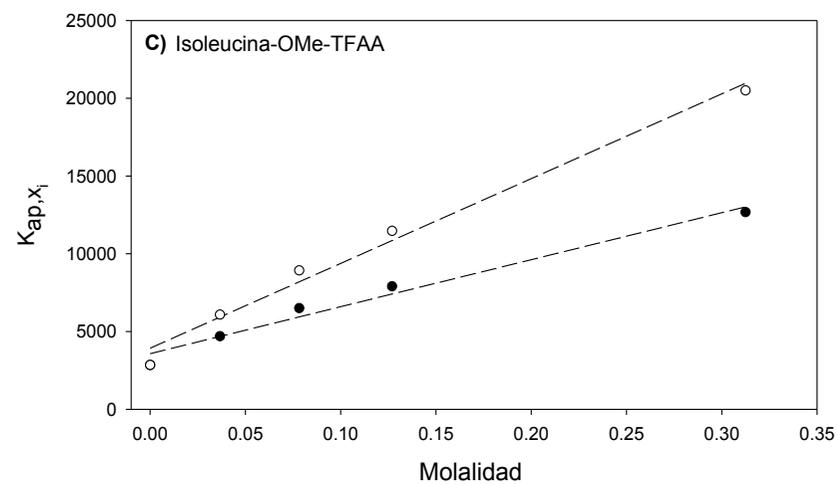
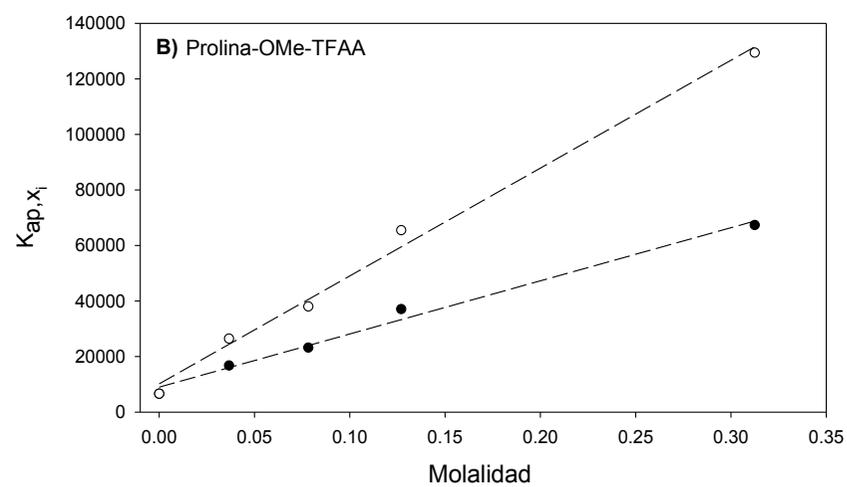
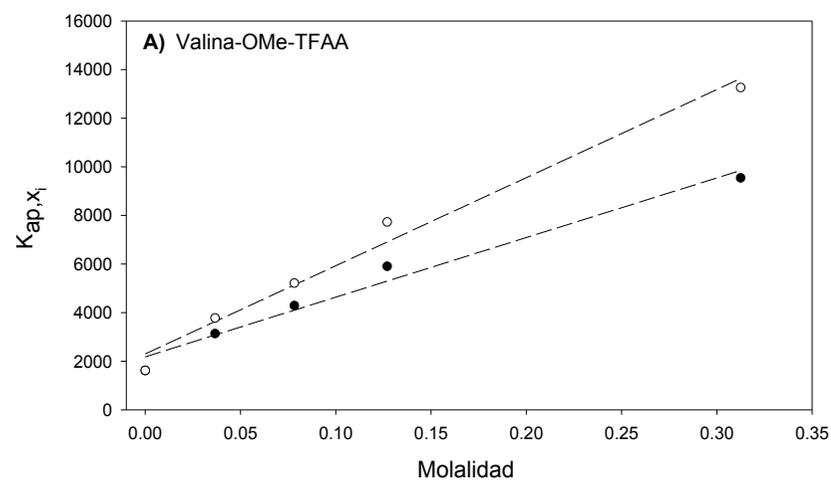


Figura 3.8.  $K_{ap,xi}$  en función de la molalidad del selector quiral a 90°C para A) Val B) Pro C) Ile D) t-Leu. Símbolos (●)(○): primer y segundo enantiómero del par, respectivamente.

Por otra parte, la asunción de que  $K_L^{*,0}$  (ordenada de las regresiones) es una buena estimación del coeficiente de partición gas-líquido  $K_L^0$  es correcta para algunos aminoácidos, pero no para todos. Los aminoácidos más polares tienen diferencias entre estas dos constantes (en promedio estas diferencias alcanzan un 20%). Una explicación de esta diferencia no puede ser atribuida solo al cambio en el volumen de fase líquida con la concentración del selector. La Tabla 3.1 y la Figura 3.2 indican un cambio de 2.3% en la densidad a 100°C desde OV-1701-vi puro respecto de la mezcla de mayor concentración molal de ciclodextrina. Por lo tanto, se infiere que ocurre un fuerte decrecimiento en el coeficiente de actividad de estos solutos polares en las mezclas comparado con los valores correspondientes en polisiloxano puro ( $\gamma_{x_i+s}^\infty < \gamma_x^\infty$ ).

Tal como indica la ecuación (3.13), las ordenadas al origen deberían tener el mismo valor para los dos enantiómeros. Esto efectivamente se verifica en la observación de los datos reportados en Tabla 3.5 (y Anexo A.IV); las diferencias para cada par son despreciables en todos los casos.

Una conclusión de este análisis, es que, en principio se acepta la validez de la hipótesis, esto es, los complejos que se forman son de estequiometría 1:1, y las ecuaciones derivadas estrictamente de la teoría cromatográfica son válidas para obtener estas constantes de equilibrio. Además, los datos experimentales obtenidos son confiables como para asegurar la calidad de la información termodinámica calculada.

Tabla 3.5. Resultados de la regresión de  $K_{ap,xi}$  versus concentración, y las constantes de asociación enantioméricas estimadas  $K_{SXL}$  y  $K_{SXD}$  a 110°C

Soluto	$(K_L^0 \pm s(K_L^0)) \times 10^2$	Primer enantiómero eluido				Segundo enantiómero eluido			
		Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXL} \pm s(K_{SXL})$	Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXD} \pm s(K_{SXD})$
Ala	3.95 ± 0.03	7.8 ± 0.6	5 ± 1	0.98	20 ± 2	9.0 ± 0.6	5 ± 1	0.98	23 ± 2
Leu	13.02 ± 0.09	8.3 ± 0.9	16 ± 1	0.96	6.4 ± 0.7	11 ± 1	16 ± 2	0.97	8.4 ± 0.8
Abu	10.36 ± 0.07	6.5 ± 0.5	9.4 ± 0.8	0.98	6.3 ± 0.5	7.3 ± 0.7	10 ± 1	0.98	7.2 ± 0.6
Ile	10.83 ± 0.08	7 ± 1	11 ± 2	0.92	7 ± 1	11 ± 0.9	13 ± 1	0.98	10.3 ± 0.8
Val	6.46 ± 0.05	6.3 ± 0.6	7.7 ± 0.9	0.97	9.7 ± 0.9	8.2 ± 0.7	8 ± 1	0.98	13 ± 1
Pro	24.3 ± 0.2	41 ± 3	29 ± 5	0.98	17 ± 1	68 ± 4	31 ± 7	0.99	28 ± 2
Nor	15.8 ± 0.1	10 ± 1	17 ± 2	0.96	6.6 ± 0.8	13 ± 1	17 ± 2	0.97	8.4 ± 0.9
Thr	9.17 ± 0.06	90 ± 6	16 ± 9	0.99	98 ± 6	107 ± 7	29 ± 11	0.99	117 ± 8
<i>t</i> -Leu	9.74 ± 0.07	4.1 ± 0.2	10.1 ± 0.3	1.00	4.2 ± 0.2	6.6 ± 0.3	10.3 ± 0.5	0.99	6.7 ± 0.3
Asp	18.3 ± 0.1	58 ± 2	24 ± 3	1.00	32 ± 1	88 ± 3	26 ± 4	1.00	48 ± 1
Ser	25.0 ± 0.2	44 ± 4	28 ± 6	0.98	18 ± 2	77 ± 7	36 ± 11	0.98	31 ± 3
Met	80.5 ± 0.6	144 ± 17	76 ± 26	0.96	18 ± 2	190 ± 20	77 ± 31	0.97	24 ± 2
Asp	63.4 ± 0.4	107 ± 12	72 ± 19	0.96	17 ± 2	179 ± 18	81 ± 29	0.97	28 ± 3
Glu	84.1 ± 0.6	126 ± 11	106 ± 17	0.98	15 ± 1	228 ± 18	110 ± 28	0.98	27 ± 2

<sup>a</sup> $s(K_{SXL})$  y  $s(K_{SXD})$  son las desviaciones estándar de  $K_{SXL}$  y  $K_{SXD}$  respectivamente calculadas como:  $s(K_{SXi}) = K_{SXi} \sqrt{\left(\frac{s(\text{pendiente})}{\text{pendiente}}\right)^2 + \left(\frac{s(K_L^0)}{K_L^0}\right)^2}$

donde  $s(K_L^0) = K_L^0 \sqrt{\left(\frac{s(\beta)}{\beta}\right)^2 + \left(\frac{s(k)}{k}\right)^2}$

### 3.3.5 Selectividad verdadera y selectividad aparente

Los valores de selectividad aparente ( $\alpha_{ap}$ ) a una dada temperatura fueron graficados como función de la molalidad para distintos derivados de aminoácidos en la Figura 3.9. Las líneas punteadas indicadas en cada gráfico corresponden a los factores de enantioselectividad absolutos ( $\alpha_{D/L}$ ), calculados como el cociente de las constantes  $K_{SXi}$ . En estos ejemplos se observan diferentes situaciones: la selectividad experimental de Asparagina crece rápidamente con la concentración del selector para alcanzar asintóticamente el valor de selectividad teórica, mientras que Leucina y Prolina muestran un aumento constante lejos de  $\alpha_{D/L}$  teórica incluso a molalidades superiores a 0.3 molal. Schurig ha discutido previamente las implicancias de grandes valores de  $K_{SXi}$  de algunos solutos sobre la selectividad, es decir, las interacciones enantioselectivas dominan sobre las interacciones no quirales y, en consecuencia, los factores de selectividad aparente experimental son menos dependientes de las concentraciones del selector [11].

Las interacciones inespecíficas entre las moléculas con la fase estacionaria se ven reflejadas en los valores de  $K^0_L$ . Las contribuciones grandes de estas interacciones no quirales a la retención tienen consecuencias muy serias sobre los resultados cromatográficos: 1- perjudican la separación y, 2- conducen a un aumento proporcional de los tiempos de análisis con la consecuente disminución de las alturas de los picos.

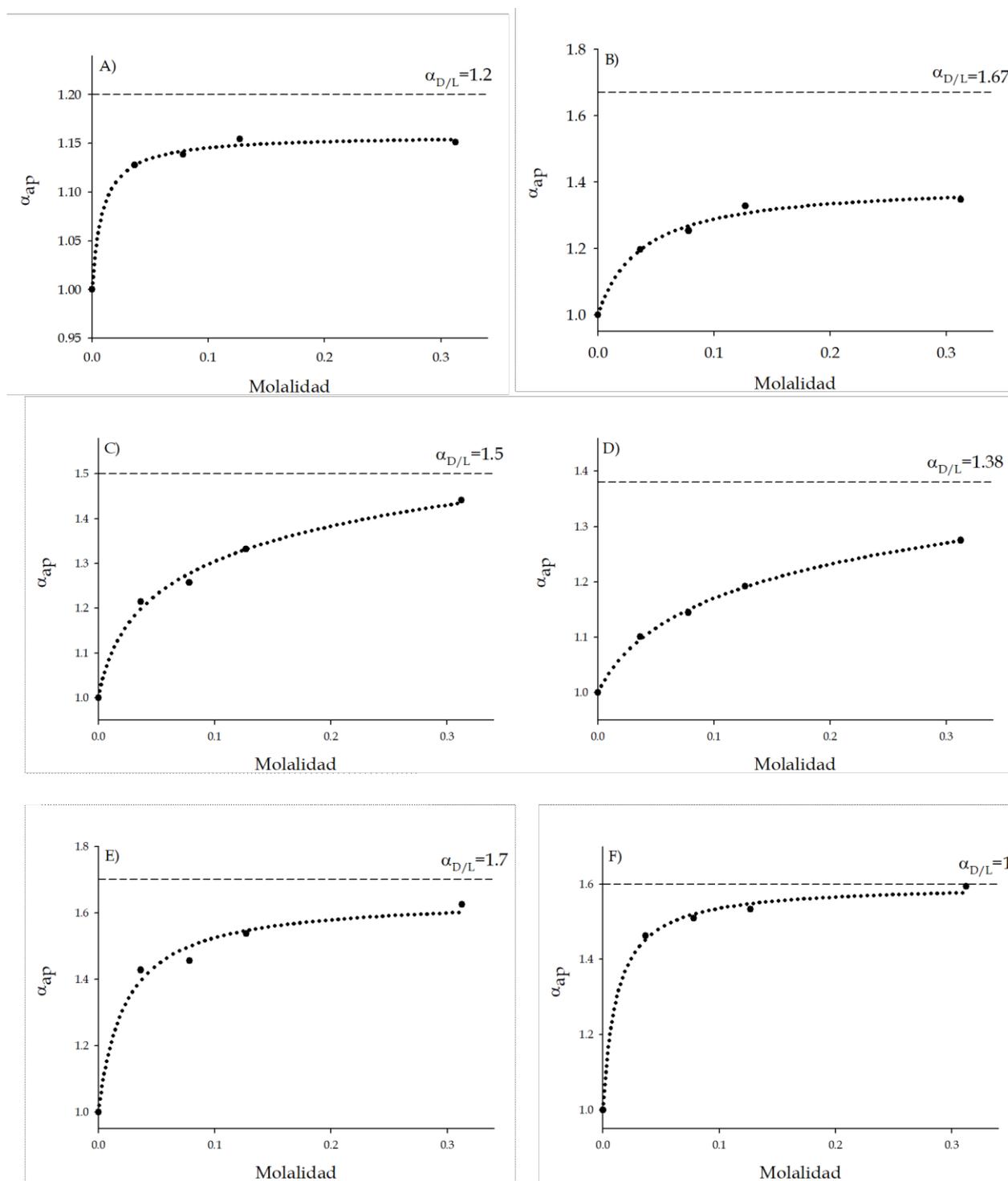


Figura 3.9. Dependencia de la enantioselectividad aparente con la concentración molar del selector quiral para los derivados N-trifluoroacetil metil éster de aminoácidos: A) Thr, T = 130 °C; B) t-Leu, T = 100 °C; C) Pro, T = 120 °C; D) Leu, T = 100 °C; E) Asn, T = 100 °C; F) Asp, T = 100 °C.

En la Figura 3.10 se comparan las contribuciones enantioselectivas a la retención y separación con las interacciones no específicas correspondientes. En la gráfica A se muestran las constantes de asociación para todos los aminoácidos en función de  $K_L^0$  y en la gráfica B se resumen los factores de enantioselectividad medidos a 100°C, frente a los correspondientes valores de  $K_L^0$ . Las fuertes interacciones quirales con el selector no siempre se pueden asociar con fuertes interacciones con la matriz de polisiloxano polar y viceversa. La gráfica A indica una independencia relativa entre las contribuciones quirales y aquirales a la retención: los solutos polares, tales como treonina y ácido aspártico, tienen contribuciones aquirales relativamente bajas e interacciones específicas significativamente grandes con el selector, mientras que otros compuestos también polares (como metionina y ácido glutámico) exhibieron grandes  $K_L^0$  y relativamente menos interacciones con el selector derivado de CD. Claramente en la gráfica B, no se observa ninguna correlación entre la capacidad de discriminación enantioselectiva y los coeficientes de partición ( $K_L^0$ ) ( $R^2=0.33$ ). Esto es esperable porque, en principio, el mecanismo de enantiodiscriminación no (necesariamente) está relacionado a las interacciones inespecíficas con la matriz. De hecho, esto remarca la importancia de poder minimizar las interacciones inespecíficas entre enantiómero y matriz, con el fin de que los factores de enantioseparación aparente sean más cercanos a los valores verdaderos. En este concepto se infiere que el selector quiral adopta una estructura espacial y una disponibilidad para el enantiorreconocimiento que es independiente del solvente (polímero) en el que se encuentra disuelto.

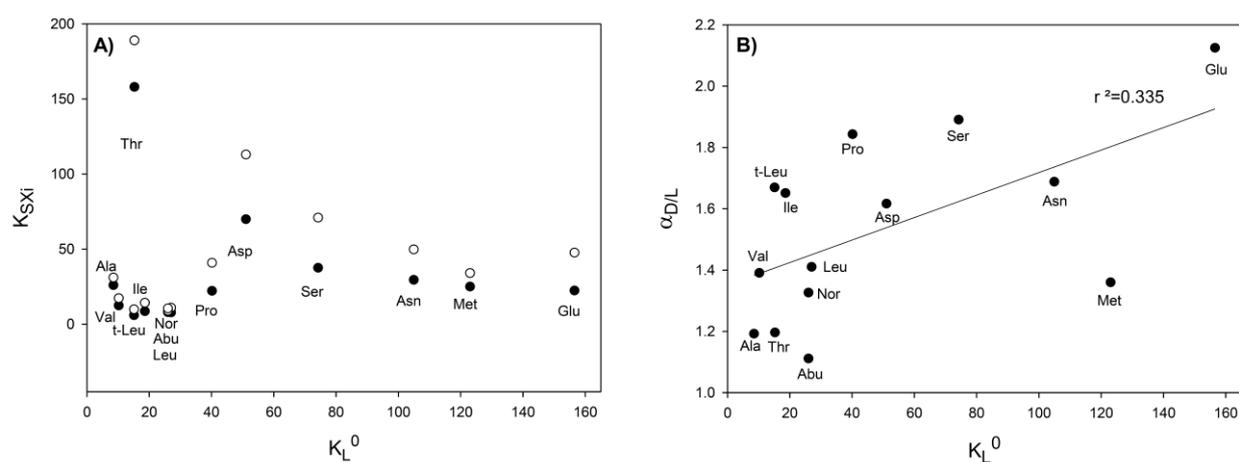


Figura 3.10. Gráficos de interacciones enantioselectivas en función de las interacciones no específicas. Representación de datos a 100°C. (A) Constante de asociación enantioselectivas en función de  $K_L^0$ . Símbolos: (○) segundo enantiómero eluido; (●) primer enantiómero del par; (B) Factores de enantioselectividad frente a  $K_L^0$ .

### 3.3.6 Modelo del incremento de retención

Las columnas capilares se han utilizado para las estimaciones de constantes de asociación entre enantiómeros y diferentes selectores quirales disueltos o unidos covalentemente a un polisiloxano, utilizando el modelo de incremento de retención propuesto por Schurig [12]. El objetivo del modelo es diferenciar la contribución a la retención originada tanto por la partición gas-líquido que involucra al solvente aquiral de la contribución a la retención originada por la interacción enantioselectiva soluto-selector sin la necesidad de determinar la relación de fases  $\beta$ .

La determinación del incremento de retención  $R'$ , se basa en medir la retención  $r$  de un soluto (enantiómero  $X_i$ ) relativo a una sustancia de referencia ( $X^*$ ) en una columna quiral que contiene una dada concentración de selector en el solvente aquiral. Las sustancias de referencia propuestas, generalmente n-alcanos, no deben interactuar con el selector. A su vez se mide la retención relativa  $r^0$  de los mismos compuestos en una columna conteniendo solamente al solvente aquiral (columna de referencia).

A partir de un reordenamiento de la ecuación (3.11):

$$K_{sx_i} a_s = \frac{K_{ap,x_i}}{K_L^0} - 1 \quad (3.26)$$

La combinación de la ecuación (3.26) con las ecuaciones (3.14) y (3.15), permite escribir que:

$$K_{sx_i} a_s = \frac{k}{k^0} \frac{\beta}{\beta^0} - 1 \quad (3.27)$$

Debido a que se "desconocen" los valores de  $\beta$  y  $\beta^0$ , Schurig sugiere el uso de una sustancia de referencia ( $X^*$ ), para calcular retenciones relativas a dicha sustancia.

Para el compuesto de referencia no quiral  $X^*$ ,  $K_{sX^*}^* = 0$ , y de la ecuación (3.27), se obtiene que:

$$\frac{k^*}{k^{0*}} \frac{\beta}{\beta^0} = 1 \quad (3.28)$$

siendo  $k^*$  y  $k^{0*}$  los factores de retención de la sustancia de referencia en la columna quiral y la aquiral, respectivamente. La relación  $\beta/\beta^0$  es igual para  $X_i$  y para  $X^*$ , y combinando las ecuaciones (3.27) y (3.28):

$$K_{Sx_i} a_S = \frac{k}{k^0} \frac{k^{0*}}{k^*} - 1 \quad (3.29)$$

con

$$\frac{k^0}{k^{0*}} = \frac{t_R^{\prime 0}}{t_R^{\prime 0*}} = r^0 \quad (3.30)$$

y

$$\frac{k}{k^*} = \frac{t_R^{\prime}}{t_R^{\prime *}} = r \quad (3.31)$$

donde  $r$  es la retención neta relativa entre el soluto  $X_i$  y el compuesto de referencia  $X^*$  en la columna quiral, siendo  $t_R^{\prime}$  y  $t_R^{\prime *}$  las retenciones ajustadas del analito y del soluto de referencia  $X^*$  en la columna quiral, respectivamente. A su vez,  $r^0$  representa la retención relativa del soluto  $X_i$  y el compuesto de referencia en la columna de referencia.  $t_R^{\prime 0}$  y  $t_R^{\prime 0*}$  representan las retenciones ajustadas del analito y de la sustancia de referencia, respectivamente, en la columna aquiral.

Reemplazando (3.30) y (3.31) en (3.29):

$$K_{Sx_i} a_S = \frac{r}{r^0} - 1 = \frac{r-r^0}{r^0} = R' \quad (3.32)$$

Se define  $R'$  como el incremento de retención. La magnitud de  $R'$  es una medida cuantitativa de la complejación entre enantiómero y selector en presencia del solvente. Schurig introdujo originalmente este modelo, adaptándolo de estudios previos sobre retención de olefinas en cromatografía de complejación con iones  $Ag(I)$  [13-16], para la determinación de constantes de complejación entre enantiómeros con selectores quirales basados en metales de transición. En ese trabajo se utilizó como sustancia de referencia *n*-alcanos que no forman complejos con el selector metálico [17]. Luego se extendió el concepto de incremento de

retención a selectores basados en ciclodextrinas [12,18], donde la elección de una sustancia de referencia no es tan trivial.

El factor de selectividad  $\alpha_{ap}$  se relaciona con los valores de incremento de retención según:

$$\alpha_{ap} = \frac{t'_{R,D}}{t'_{R,L}} = \frac{1+K_{SX,D} a_s}{1+K_{SX,L} a_s} = \frac{1+R'_D}{1+R'_L} \quad (3.33)$$

En el contexto del modelo, cuando  $a_s$  tiende a infinito y/o cuando  $K_{SX,i}$  es grande,  $(1+K_{SX,i} a_s)$  tiende a  $(K_{SX,i} a_s)$  y  $\alpha_{ap}$  tendería al verdadero  $\alpha_{D/L}$ . Esto es, según el modelo, cuando  $R'$  es grande:

$$\alpha_{D/L} = \frac{R'_D}{R'_L} \quad (3.34)$$

Con el objetivo de comparar las enantioselectividades absolutas ( $\alpha_{D/L}$ ) calculadas en la presente tesis con los valores que se obtendrían según el modelo del incremento de retención (de ahora en más lo denominaremos  $\alpha_{D/L}^*$ , para distinguirlo del absoluto,  $\alpha_{D/L}$ ) se calcularon los valores de  $r$  y  $r^0$  de los derivados de aminoácidos utilizando distintos n-alcenos (desde n-heptano hasta n-tetradecano) como analitos de referencia en la columna sin selector ( $r^0$ ), y en las 4 columnas conteniendo cantidades crecientes de selector quiral ( $r$ ). Se calcularon los valores de  $R'_D$  y  $R'_L$  y los valores de enantioselectividad  $\alpha_{D/L}^*$ .

Como ejemplo, en la Tabla 3.6 se muestran los resultados de los  $R'_D$  a 100°C obtenidos en la columna 4 para todos los aminoácidos. Se observa que los valores calculados dependen claramente de la referencia utilizada para la estimación. Esto se verificó para todas las columnas y a todas las temperaturas.

Tabla 3.6. Valores de incremento de retención  $R'_L$  (primer enantiómero eluído) utilizando n-alcenos como sustancia de referencia (desde n-heptano a n-tetradecano) a 100°C en la columna 4.

Solutos	$R'_L$							
	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>	C <sub>14</sub>
Ala	5.86 <sup>a</sup>	4.33	4.80	4.97	5.01	5.05	5.03	5.03
Leu	1.61	1.03	1.21	1.27	1.29	1.30	1.30	1.30
Ile	1.78	1.16	1.35	1.42	1.43	1.45	1.44	1.44
Val	2.67	1.85	2.10	2.19	2.21	2.23	2.23	2.22
Pro	4.88	3.57	3.97	4.12	4.15	4.19	4.17	4.17
Nor	1.65	1.06	1.24	1.30	1.32	1.33	1.33	1.33
Thr	36.33	27.99	30.54	31.46	31.68	31.92	31.83	31.81
Asp	15.86	12.09	13.24	13.66	13.76	13.87	13.82	13.81
Glu	4.93	3.61	4.01	4.16	4.19	4.23	4.22	4.21
Ser	8.38	6.28	6.92	7.15	7.21	7.27	7.25	7.24
Met	5.19	3.81	4.23	4.38	4.42	4.46	4.44	4.44
Asp	6.41	4.76	5.26	5.45	5.49	5.54	5.52	5.52
Abu	1.50	0.94	1.11	1.17	1.19	1.20	1.20	1.20

<sup>a</sup>Calculados a partir de la ecuación (3.32)

El modelo del incremento de retención se basa en el supuesto básico de que la sustancia seleccionada como referencia no interacciona con el selector quiral. La formación de complejos de inclusión entre alcanos normales y permetil- $\beta$ -ciclodextrina, sin embargo, ha sido demostrada por Casu y colaboradores [19], quienes incluso han aislado los complejos sólidos formados para estudiar su comportamiento térmico. Otros autores han admitido también la posibilidad de asociaciones entre diversos derivados de ciclodextrinas con n-alcenos [20].

Con el objetivo de determinar si existe alguna interacción entre el selector quiral y los n-alcenos, responsable de los cambios obtenidos para los incrementos de retención, se calcularon las  $K_{ap}$  a cada temperatura para los n-alcenos todas las columnas. En caso de no existir interacción, los valores de  $K_{ap}$  deberían ser constantes e iguales al valor encontrado en la columna de referencia.

En la Figura 3.11 se muestra, a modo de ejemplo, el gráfico de  $K_{ap}$  frente a la concentración molal de ciclodextrina a dos temperaturas distintas para todos los n-alcenos. Se observa claramente una tendencia creciente lineal en ambos gráficos, independientemente del n-alceno y de la temperatura, evidenciando que existe una interacción que no es despreciable entre los n-alcenos y octakis(6-*O-tert*-butildimetilsilil-2,3-di-*O*-acetil)- $\gamma$ -ciclodextrina.

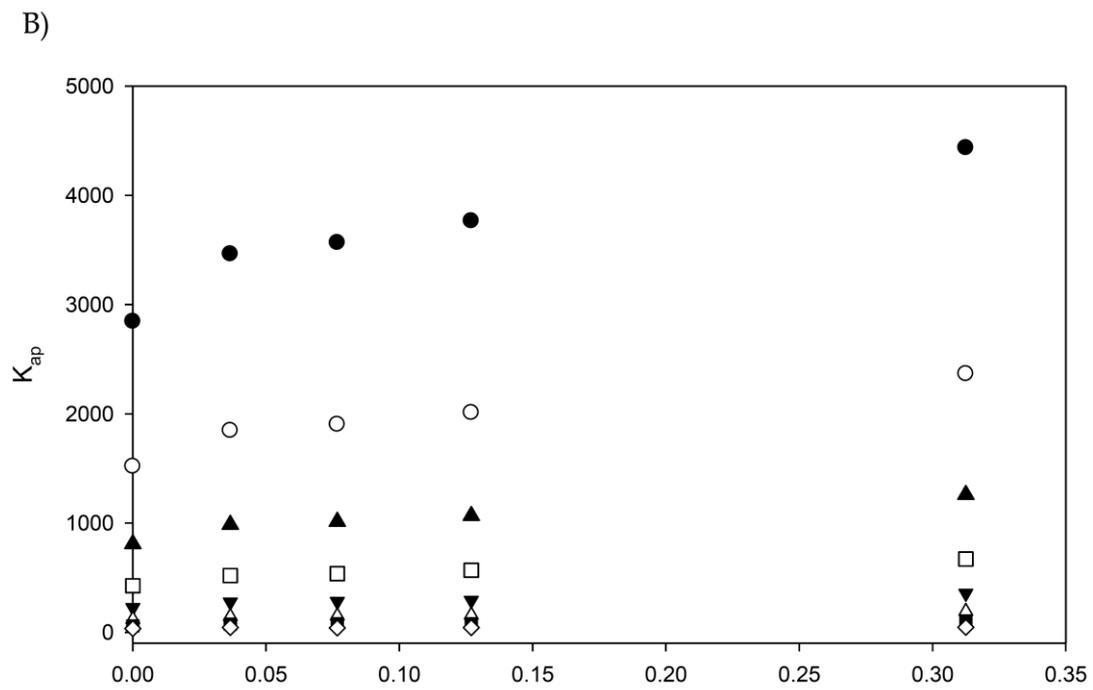
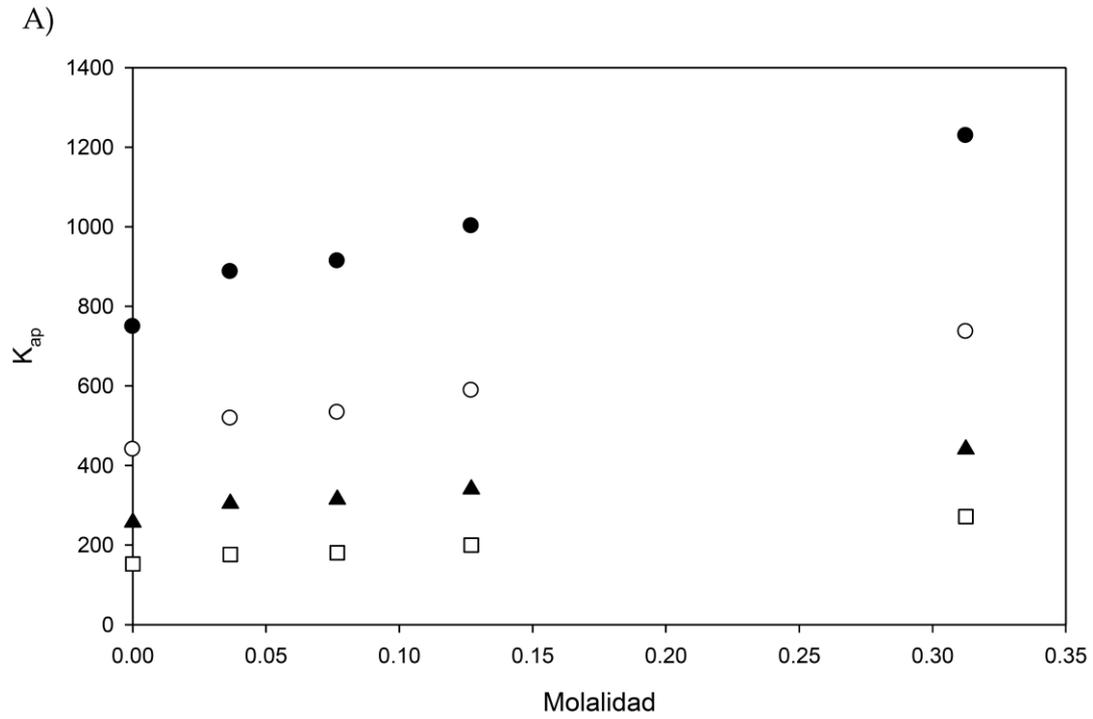


Figura 3.11. Gráficos de  $K_{ap}$  vs molalidad para (◇) *n*-heptano, (◻) *n*-octano, (△) *n*-nonano, (▼) *n*-decano, (◻) *n*-undecano, (▲) *n*-dodecano, (○) *n*-tridecano, (●) *n*-tetradecano. A) 130°C B) 100°C.

Las diferencias entre la  $K_{ap}$  de los n-alcenos de la columna conteniendo 47,4% de selector quiral respecto de los valores en la columna de referencia (sin selector), fueron en promedio de un 35%. Esto es un indicativo del error que se comete al suponer que no existe interacción entre el soluto de referencia y el selector. Si bien, la diferencia promedio entre las  $K_{ap}$  de los n-alcenos en la columna con 9.55% p/p de selector quiral respecto de la columna de referencia es menor, con un promedio del 20%, en esa región de la curva los valores de  $\alpha_{ap}$  son mucho menores que los  $\alpha_{D/L}$  (ver Figura 3.9). Con lo cual para calcular las enantioselectividades según este modelo, es aconsejable utilizar la columna 4 (con mayor porcentaje de ciclodextrina). Como consecuencia, el valor de enantioselectividad calculado a partir del modelo de incremento de retención  $\alpha_{D/L}^*$  será erróneo.

Los valores de  $t_R^*$  experimentales son mayores que los obtenidos si no existiera interacción entre n-alceno y ciclodextrina. En consecuencia, los valores de  $r_D$  y  $r_L$  son menores. Combinando las ecuaciones (3.32) y (3.34):

$$\alpha_{D/L}^* = \frac{R'_D}{R'_L} = \frac{r_D - r^0}{r_L - r^0} \quad (3.35)$$

Teniendo en cuenta que el valor de  $r^0$  será constante (es independiente de la presencia de interacción entre los n-alcenos y el selector ya que se refiere a la columna de referencia), los valores de selectividad calculados  $\alpha_{D/L}^*$  serán mayores que el valor absoluto  $\alpha_{D/L}$ , y la magnitud de esta diferencia dependerá del valor de  $r^0$ .

En la Tabla 3.7, se muestran los resultados de enantioselectividad  $\alpha_{D/L}^*$  calculados para la columna 4 según la ecuación (3.35). En las últimas dos columnas se incluyen los valores de  $\alpha_{D/L}$  (absoluto) y de enantioselectividad aparente ( $\alpha_{ap}$ ) en la misma columna, respectivamente. Se observaron diferencias en las enantioselectividades calculadas con los distintos n-alcenos, y, que, a su vez, son sistemáticamente mayores que los  $\alpha_{D/L}$ .

Estos resultados evidencian que el uso de sustancias de referencia con la hipótesis de no-interacción con el selector quiral (para soslayar el desconocimiento de la relación de fases) no es adecuado. Ha quedado demostrada la interacción existente con el selector quiral, aún para los alcanos más pequeños, como el n-heptano, por ejemplo, produciendo una variación no despreciable en los cálculos del incremento de retención ( $R'$ ), que conlleva a un error en los cálculos de enantioselectividad, con lo cual es imposible realizar cálculos rigurosos de propiedades termodinámicas a partir de este modelo.

Tabla 3.7. Enantioselectividades calculadas según el modelo del incremento de retención utilizando distintos n-alcanos como sustancias de referencia (desde n-heptano hasta n-tetradecano). T=100°C

Soluto	$\alpha_{D/L}^*$ <sup>a</sup>								$\alpha_{D/L}$ <sup>b</sup>	$\alpha_{ap}$ <sup>c</sup>
	C <sub>7</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>9</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>11</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>13</sub>	C <sub>14</sub>		
Ala	1.184	1.193	1.190	1.189	1.188	1.188	1.188	1.188	1.170	1.160
Leu	1.446	1.542	1.503	1.491	1.489	1.486	1.487	1.487	1.396	1.275
Abu	1.212	1.263	1.242	1.236	1.234	1.233	1.234	1.234	1.167	1.127
Ile	1.751	1.896	1.837	1.820	1.816	1.812	1.814	1.814	1.656	1.481
Val	1.420	1.470	1.451	1.445	1.443	1.442	1.442	1.443	1.389	1.305
Pro	1.883	1.938	1.918	1.911	1.910	1.908	1.909	1.909	1.844	1.733
Nor	1.370	1.448	1.417	1.407	1.405	1.403	1.404	1.404	1.327	1.230
Thr	1.204	1.206	1.206	1.205	1.205	1.205	1.205	1.205	1.197	1.188
Asp	1.632	1.643	1.639	1.638	1.637	1.637	1.637	1.637	1.622	1.594
Glu	2.163	2.235	2.208	2.199	2.197	2.195	2.196	2.196	2.127	1.967
Ser	1.921	1.954	1.942	1.938	1.937	1.936	1.936	1.936	1.891	1.823
Met	1.402	1.425	1.417	1.414	1.413	1.412	1.413	1.413	1.374	1.337
Asn	1.723	1.757	1.744	1.740	1.739	1.738	1.739	1.739	1.688	1.626

<sup>a</sup>-  $\alpha_{D/L}^* = R'_D/R'_L$  en la columna 4.

<sup>b</sup>-  $\alpha_{D/L} = K_{SXD}/K_{SXL}$

<sup>c</sup>-  $\alpha_{ap}$  en la columna 4.

### 3.3.7 Influencia de la temperatura en la enantioselectividad

Con el objetivo de determinar la influencia de la temperatura en la enantioselectividad del sistema, en la Figura 3.12 se graficó el  $\ln K_{SXi}$  vs  $1/T$  para algunos analitos. Se observa que los puntos se ajustan satisfactoriamente a una línea recta en el rango de temperatura estudiado. Gráficos similares fueron obtenidos para todos los aminoácidos. A partir de estas gráficas, se pudieron calcular las verdaderas propiedades termodinámicas de complejación entre los enantiómeros y el selector quiral disuelto en el polisiloxano; esto es, a partir de la ecuación (3.20) se calcularon los  $\Delta H_{SXi}^0$  por regresión por cuadrados mínimos, y  $T(\Delta S_{SXi}^0)$  se obtuvo de la ecuación (3.19). A su vez los parámetros termodinámicos que reflejan el proceso de enantioselectividad, se calcularon por regresión por cuadrados mínimos del  $\ln \alpha_{D/L}$  con la inversa de la temperatura absoluta. El supuesto inherente a todos estos cálculos es que estas funciones de estado son independientes de la temperatura en el rango de temperatura estudiado.

En la Tabla 3.8 se informan los resultados obtenidos. Los valores de diferencias en entalpías para el proceso de complejación de todos los enantiómeros con el selector quiral son negativas como también los valores de  $\Delta(\Delta H_{SXi}^0)$ . La temperatura de isoelución,  $T_{ISO}$ , para los derivados de aminoácidos fueron calculados por extrapolación de los gráficos de  $\ln \alpha_{D/L}$  en función de  $1/T$ .

En la Figura 3.13 se representaron los valores de  $\Delta(\Delta H_{SXi}^0)$  en función de  $T\Delta(\Delta S_{SXi}^0)$  para todos los aminoácidos estudiados a 100°C. Puede observarse que el proceso de complejación está dominado por las diferencias de las entalpías de asociación, en todos los casos los valores de  $\Delta(\Delta H_{SXi}^0)$  son más negativos que los valores de  $T\Delta(\Delta S_{SXi}^0)$ . Las contribuciones entrópicas a la energía libre, están sistemáticamente relacionadas a las diferencias entálpicas. El coeficiente de correlación entre estas magnitudes para todos los solutos es de 0.9772.

Los valores de  $\Delta(\Delta H_{SXi}^0)$  miden la diferencia entre las interacciones de cada enantiómero y el selector quiral presente en la solución. El enantiómero más retenido del par tiene valores más negativos de  $\Delta H_{SXi}^0$  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. Los valores negativos de  $\Delta(\Delta S_{SXi}^0)$  se deben a que el enantiómero más retenido adquiere una conformación más rígida producto de estas interacciones más fuertes con una disminución mayor en la entropía de complejación.

Según los resultados de la Tabla 3.8, no existe una correlación entre  $\Delta H_{SXi}^0$  y  $\Delta(\Delta G_{SXi}^0)$ . Esto implica que una fuerte interacción soluto-selector no implica necesariamente que el selector discrimine y se separen mejor ( $R^2=0.23$  y  $R^2=0.47$  para  $\Delta H_{SXL}^0$  y  $\Delta H_{SXD}^0$  respectivamente).

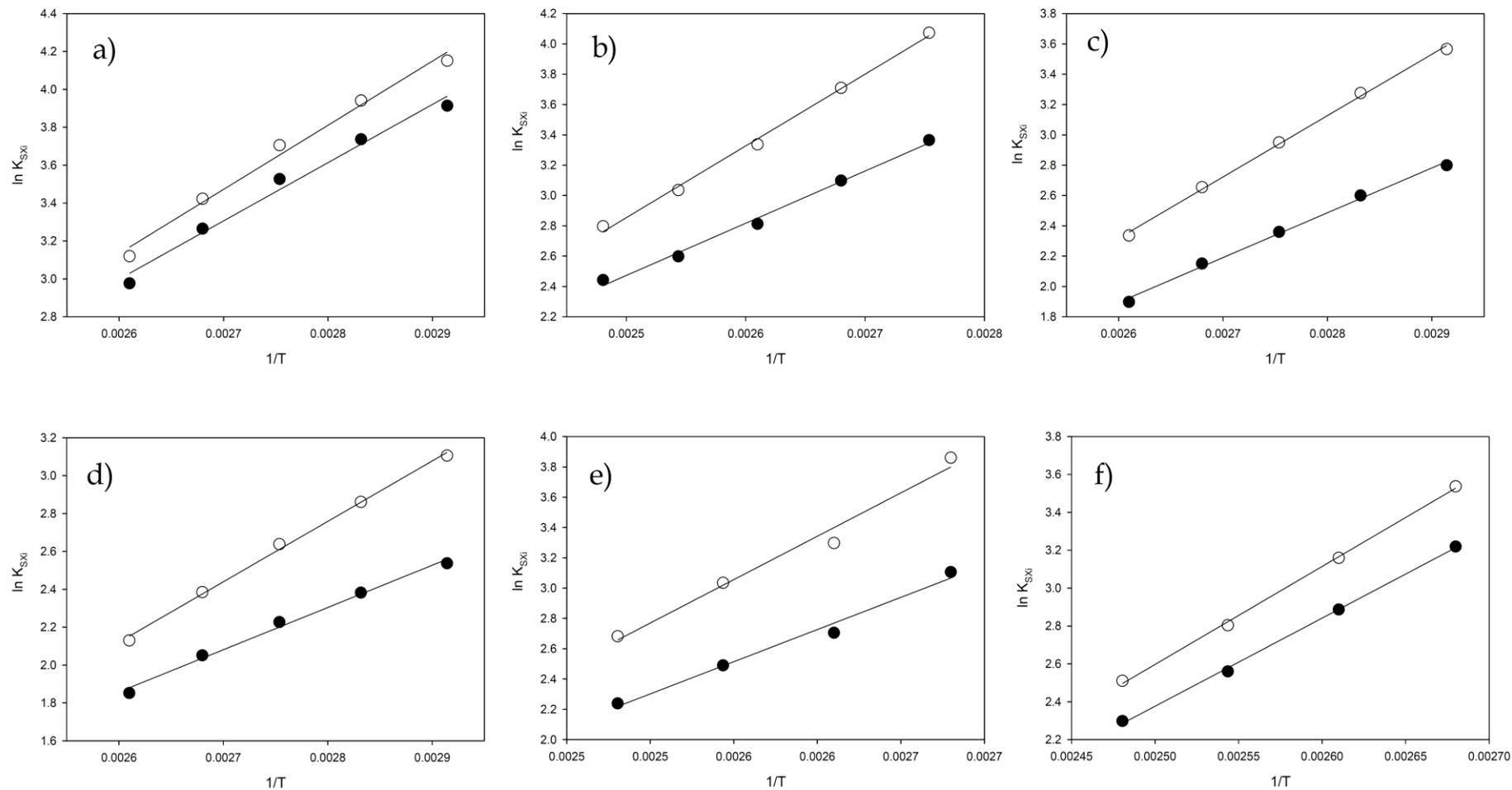


Figura 3.12. Gráficos de van't Hoff para los analitos a) Ala b) Pro c) Ile d) Leu e) Glu f) Met. Símbolos: (○) primer enantiómero del par (L); ● segundo enantiómero del par

Tabla 3.8. Propiedades termodinámicas correspondientes a la complejación entre enantiómero y el selector quiral

soluto	$\Delta H_{SXL}$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) ( $\pm s$ ) <sup>a</sup>	$\Delta H_{SXD}$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) ( $\pm s$ ) <sup>b</sup>	$\Delta G_{SXL}^b$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta G_{SXD}^b$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$T\Delta S_{SXL}$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	$T\Delta S_{SXD}$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	$\Delta(\Delta G_{SXi})^d$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta(\Delta H_{SXi})$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) ( $\pm s$ )	$T\Delta(\Delta S_{SXi})$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$T_{ISO}$ (K)
Ala	-25.6 $\pm$ 2.0	-28.2 $\pm$ 1.8	-10.1	-10.6	-15.4	-17.6	-0.5	-2.6 $\pm$ 0.2	-2.1	460
Leu	-18.6 $\pm$ 1.0	-26.7 $\pm$ 0.8	-6.4	-7.4	-12.2	-19.4	-1.0	-8.1 $\pm$ 0.4	-7.1	429
Abu	-23.8 $\pm$ 1.3	-25.9 $\pm$ 1.4	-6.5	-6.9	-17.5	-19.0	-0.4	-1.94 $\pm$ 0.03	-1.5	562
Ile	-24.3 $\pm$ 0.9	-33.7 $\pm$ 0.8	-6.7	-8.2	-17.9	-25.4	-1.6	-9.1 $\pm$ 0.1	-7.5	451
Val	-20.2 $\pm$ 2.1	-26.2 $\pm$ 2.4	-7.8	-8.8	-12.3	-17.4	-1.0	-6.1 $\pm$ 0.4	-5.1	448
Pro	-28.6 $\pm$ 1.4	-39.3 $\pm$ 1.3	-9.6	-11.5	-19.0	-27.8	-1.9	-10.72 $\pm$ 0.06	-8.8	453
Nor	-17.3 $\pm$ 0.4	-23.5 $\pm$ 0.4	-6.7	-7.7	-10.6	-15.8	-0.9	-6.2 $\pm$ 0.1	-5.3	435
Thr	-52.1 $\pm$ 2.2	-53.4 $\pm$ 2.0	-15.7	-16.3	-36.4	-37.1	-0.6	-1.3 $\pm$ 0.1	-0.8	930
t-Leu	-27.0 $\pm$ 1.3	-35.5 $\pm$ 1.0	-5.5	-7.1	-21.5	-28.4	-1.6	-8.6 $\pm$ 0.4	-7.0	458
Asp	-44.0 $\pm$ 1.2	-48.1 $\pm$ 1.0	-11.9	-13.3	-32.1	-34.8	-1.3	-4.1 $\pm$ 0.3	-2.7	550
Ser	-45.4 $\pm$ 1.1	-49.7 $\pm$ 1.1	-10.0	-11.9	-35.4	-37.8	-1.9	-4.33 $\pm$ 0.08	-2.5	642
Met	-36.9 $\pm$ 2.0	-44.1 $\pm$ 0.4	-10.0	-11.0	-28.6	-32.0	-1.0	-4.3 $\pm$ 0.3	-3.4	483
Asn	-42.6 $\pm$ 7.5	-46.2 $\pm$ 6.5	-10.5	-12.1	-32.1	-34.0	-1.6	-4 $\pm$ 1	-1.9	687
Glu	-35.3 $\pm$ 3.1	-47.6 $\pm$ 4.8	-9.6	-12.0	-25.7	-35.6	-2.3	-12 $\pm$ 2	-10.0	461

<sup>a</sup> desvíos estándar de  $\Delta H_{SXi}$

<sup>b</sup> valores a 100°C

<sup>c</sup> calculado como ( $\Delta G_{SXi}$ -  $\Delta H_{SXi}$ )

<sup>d</sup> calculado de  $-RT \ln \alpha_{D/L}$

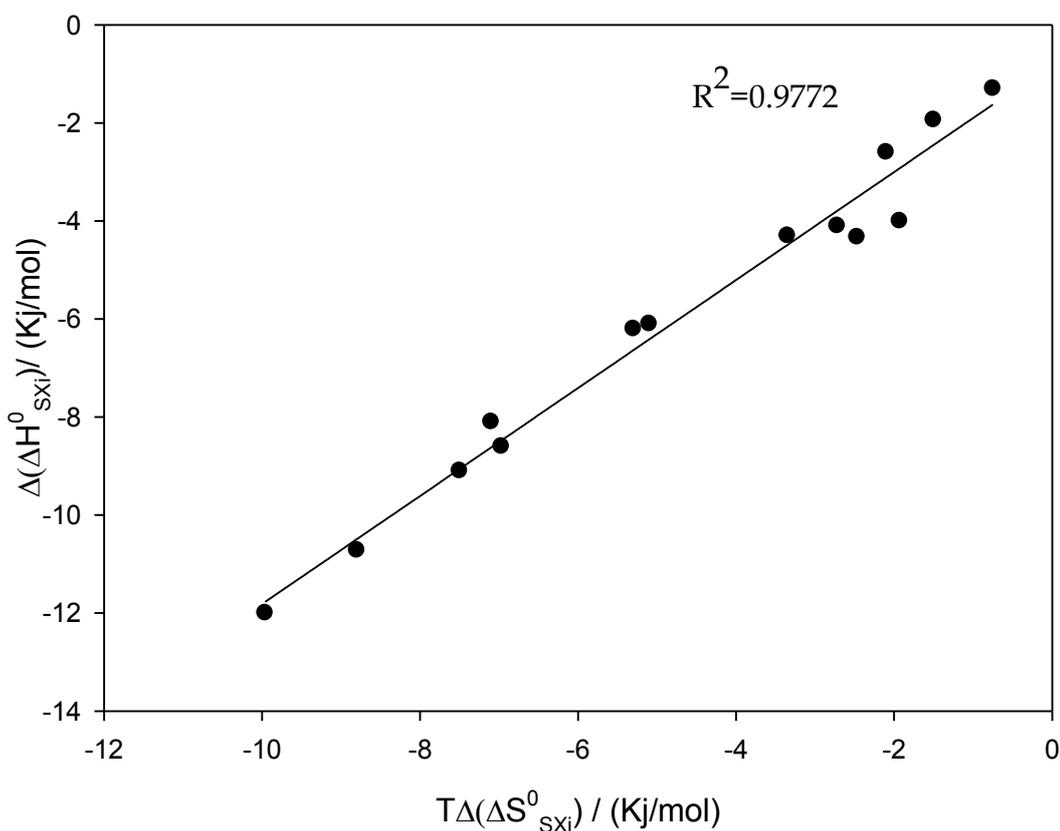


Figura 3.13. Gráfico de  $\Delta(\Delta H_{SXi}^0)$  (Kj/mol) en función de  $T\Delta(\Delta S_{SXi}^0)$  (Kj/mol) para todos los aminoácidos estudiados a 100°C

Al comparar los  $\Delta H_{SXi}^0$  de la Tabla 3.8 para los distintos aminoácidos, se puede inferir cualitativamente, que existen fuertes interacciones entre los solutos más polares con la ciclodextrina respecto de los menos polares. A fin de evaluar si este efecto es real, se estudió la relación entre la hidrofobicidad de los aminoácidos y los valores de  $\Delta H_{SXi}^0$  obtenidos. Para ello se utilizaron 3 formas de medida de la hidrofobicidad y se graficó  $\Delta H_{SXi}^0$  en función de estos parámetros, mostrando una fuerte correlación entre ellos. Por un lado, el tradicional coeficiente de partición octanol-agua [21] con el cual se obtuvieron coeficientes de correlación de  $R^2=0.6$  ( $\Delta H_{SXL}^0$ ) y  $R^2=0.5$  ( $\Delta H_{SXD}^0$ ), el coeficiente de partición ciclohexano-agua [22] con  $R^2=0.6$  (para ambos  $\Delta H_{SXi}^0$ ) y el parámetro de hidrofobicidad  $\pi$  [21] con  $R^2=0.6$  ( $\Delta H_{SXL}^0$ ) y  $R^2=0.5$  ( $\Delta H_{SXD}^0$ ).

En la Figura 3.14 se muestra el gráfico de  $\Delta H_{SXL}^0$  calculado para cada enantiómero en función del logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua ( $\log P_{OW}$ ), el cual fue elegido debido a que se tenían mayor número de datos de aminoácidos.

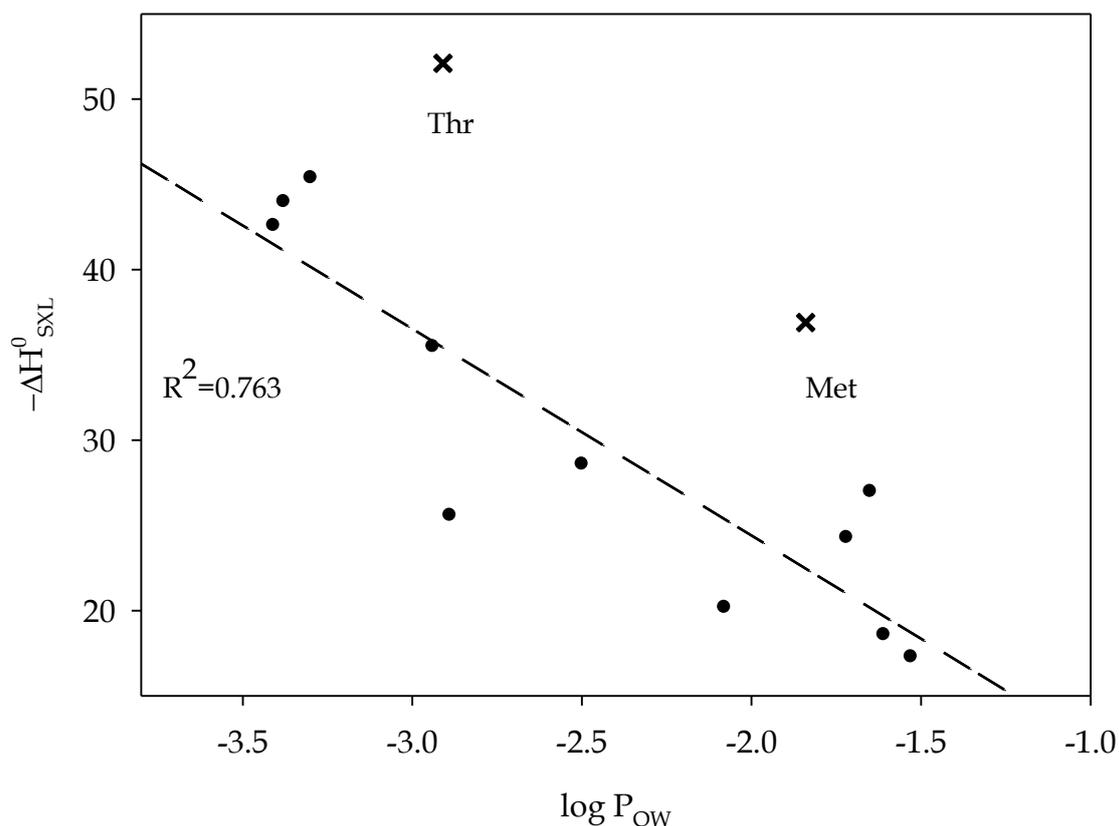


Figura 3.14. Gráfico de  $\Delta H_{SXL}^{\circ}$  en función de  $\log P_{OW}$  [21] para los distintos aminoácidos.

Este análisis debe ser considerado solo semi-cuantitativo porque los aminoácidos con cadenas laterales con algunos grupos funcionales son potencialmente derivatizados adquiriendo en consecuencia otros valores de  $\log P_{OW}$  (Thr, Asp, Asn, Ser y Glu). La gráfica 3.14 muestra que los puntos correspondientes a la mayoría de los analitos muestran una tendencia de entalpía de formación del complejo analito-selector creciente con la polaridad del soluto, con dos claras excepciones. Si se calcula la correlación excluyendo a Thr y Met, el  $R^2$  es de 0.763. En principio, podría concluirse que los grupos acetilo (polares) del selector participan fuertemente de la retención. Como se mencionó en la introducción los distintos tipos de derivados de ciclodextrina que existen se pueden dividir básicamente en dos grandes grupos: los alquil derivados (metilo, etilo, butilo o pentilo) y los derivados polares (acetilo, propionilo o trifluoroacetilo). Cuando el grupo hidroxilo de la posición 3 de la unidad de glucosa está sustituido por grupos polares la interacción quiral está dada mayormente por interacciones de tipo superficial más que interacciones de inclusión [23]. Los resultados hallados indicarían entonces que los aminoácidos más polares interaccionan por fuerzas intermoleculares del tipo dipolo con la cavidad exterior polar del derivado acetilado de la  $\gamma$ -CD.

Los solutos Thr y Met tienen un  $\Delta H_{SXi}^0$  muy grande en relación con sus respectivos log  $P_{ow}$ . Una posible explicación sería que la Thr podría tener un log  $P_{ow}$  distinto si se tiene en cuenta que el OH de la cadena lateral es susceptible a derivatización formándose el trifluorometil éster, pero este no es el caso de Met. Con lo cual, sus entalpías de asociación no se explicarían solo por la polaridad. Se puede hipotetizar que su  $\Delta H_{SXL}^0$  tiene un componente dispersivo, además, de la interacción polar con los acetilos de C-2 y C-3. Estas interacciones dispersivas deberían tener lugar en el interior hidrofóbico de la cavidad de la  $\gamma$ -CD.

Para evaluar la posibilidad de inclusión o no de los enantiómeros en el interior del selector se construyó una columna equivalente a la columna 4, con el derivado heptakis(6-*O*-*tert*-butildimetilsilil-2,3-di-*O*-acetil)- $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) y conteniendo 47% de selector en OV-1701-vi. Se realizaron las corridas cromatográficas de estos solutos a temperatura constante con el objetivo de comparar los resultados. La Figura 3.15 A) reúne los valores de  $k_L$  obtenidos en la columna con  $\gamma$ -CD en función de los mismos valores obtenidos en la columna con  $\beta$ -CD (corregidos para el mismo espesor de film) y en la Figura 3.15 B) se muestran los valores de  $\alpha_{ap}$  obtenidos en la columna conteniendo  $\gamma$ -CD en función de los obtenidos en la columna con  $\beta$ -CD a la misma temperatura.

El gráfico de la Figura 3.15 A) muestra que las retenciones son ligeramente mayores en la columna conteniendo  $\gamma$ -CD que en la que se construyó con  $\beta$ -CD. Las excepciones aparentes son Thr que se retiene mucho más, Asn un poco más y Met algo menos. Las interacciones inespecíficas que, en el caso de Met son altas (ver Tabla 3.5), serán iguales en ambas columnas dado que el polímero solvente es el mismo. Es posible que la Thr (y en menor medida, también Asn) sean parcialmente excluidos de la  $\beta$ -CD. En cambio, si se acepta que la Met forma un complejo en el que existe un componente dispersivo en la  $\gamma$ -CD, también existirá en la interacción con la  $\beta$ -CD.

Mas allá de los valores de retención, ninguno de estos dos solutos (Met y Thr) y tampoco Nor fueron separados en la  $\beta$ -CD (Figura 3.15 B)) lo que reafirma el hecho de que una retención intensa no implica enantioseparación. Todos los solutos fueron igual o mucho mejor separados en la  $\gamma$ -CD, con excepción de Asn que tiene un menor  $\alpha_{ap}$  en  $\gamma$ -CD que en  $\beta$ -CD.

Con estos resultados, se podría concluir que los grupos polares (acetilo) presentes en los C-2 y C-3 son importantes para la retención y enantioselectividad de estos compuestos y que la cavidad de la CD parece contribuir en parte a esta retención. El tamaño de la misma puede ser un impedimento para la inclusión de algunos solutos en su interior. Evidencias de la participación de grupos polares e inclusión en este selector específico fue observado previamente en el análisis enantiomérico de  $\delta$ - y  $\gamma$ - lactonas [24].

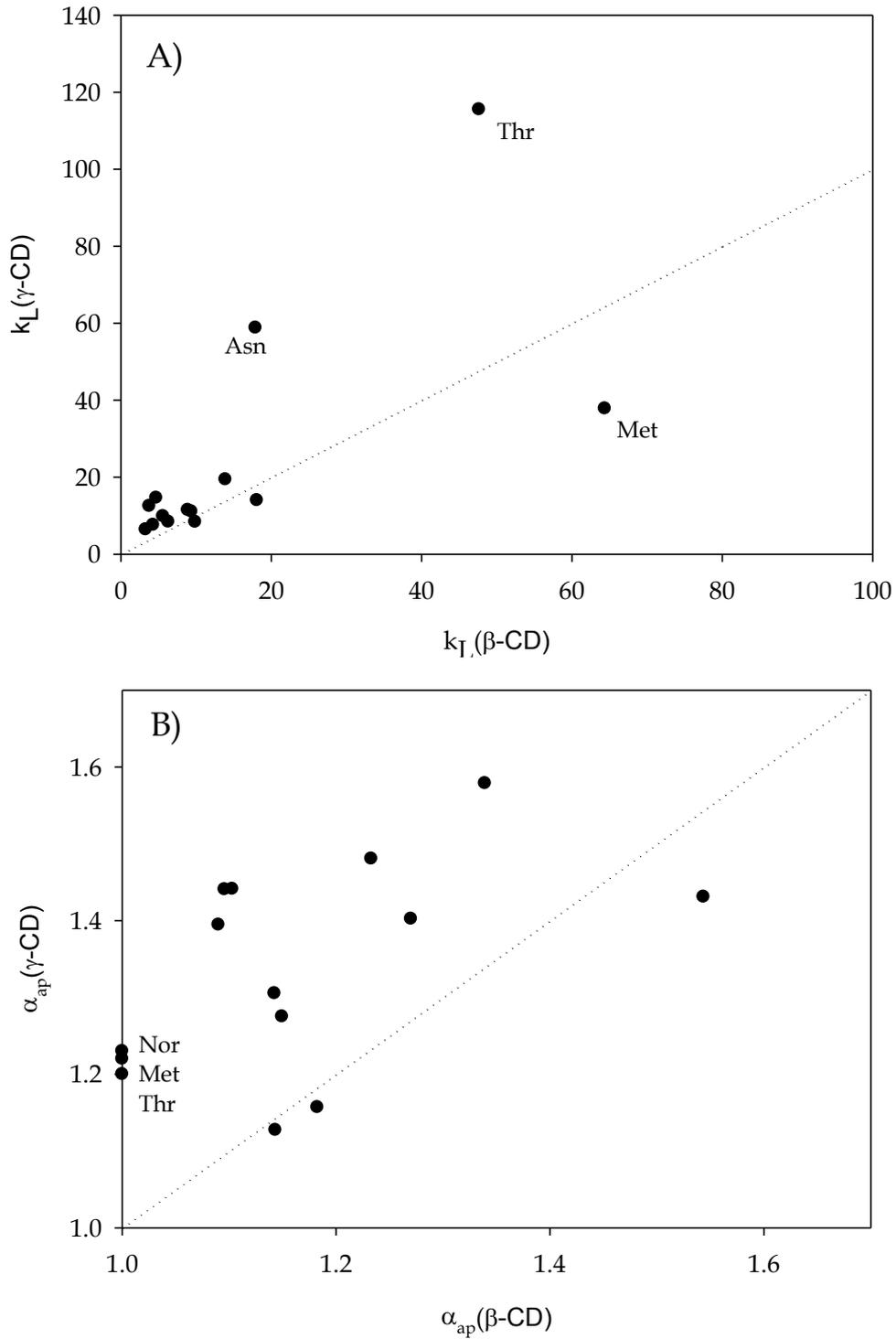


Figura 3.15. A) Gráfico de  $k_L$  en la columna con  $\gamma\text{-CD}$  en función de  $k_L$  con la columna con  $\beta\text{-CD}$  B) Gráficos de  $\alpha_{ap}$  en la columna con  $\gamma\text{-CD}$  en función de  $\alpha_{ap}$  en la columna con  $\beta\text{-CD}$ . Las líneas de puntos indican  $x=y$

### 3.4 Conclusiones parciales

Se han fabricado columnas capilares quirales eficientes mediante el depósito uniforme de distintas soluciones del derivado octakis(6-O-tert-butildimetilsilil-2,3-di-O-acetil)- $\gamma$ -ciclodextrina en la matriz aquiral OV-1701-vi, utilizando un método estático rápido y reproducible para el recubrimiento con fase estacionaria. A partir de las determinaciones de la densidad de las mezclas, se ha podido obtener información precisa sobre las propiedades físicas de esas columnas, esto es, la relación de fases y el espesor de la película depositada a cada temperatura.

En cuanto a la caracterización cromatográfica de las columnas construidas, han mostrado ser eficientes, y presentaron una excelente capacidad de enantiorreconocimiento hacia prácticamente todos los derivados N-trifluoroacetyl metil ésteres de aminoácidos. Para el estudio teórico encarado en este capítulo se seleccionaron 14 aminoácidos, que son aquellos que fueron resueltos aun en la columna conteniendo menor concentración de selector quiral a alta temperatura. Se evaluó la estabilidad de estas columnas en el tiempo cuando son utilizadas a alta temperatura, utilizando como solutos testigos n-dodecano y el derivado fluorado de alanina, encontrándose que las mismas son muy reproducibles y muy estables a lo largo de más de 25 semanas y solo se observaron disminuciones de un 10% en los factores de retención luego de 47 semanas de examen en programas de temperaturas.

Se ha observado un comportamiento muy diferente en cuanto a los factores de enantioselectividad, tanto aparentes como verdaderos, para este conjunto de aminoácidos, incluso cuando pertenecen a una única familia de compuestos. Esto es coincidente con la idea generalizada de que la predicción de capacidad de enantiorreconocimiento para un selector quiral dado es dificultosa.

El método utilizado para obtener información sobre las constantes de asociación entre selector quiral y los enantiómeros es un método sencillo, directo y confiable, cuyas ecuaciones están basadas en la teoría de cromatografía gas-líquido. A partir de mediciones cromatográficas sencillas como el tiempo de retención de ambos enantiómeros en el sistema selector/solvente aquiral a una dada temperatura en las columnas conteniendo distinta concentración de selector quiral, junto con la medición de la retención de metano y de la relación de fases de las columnas a cada temperatura, se pudo obtener parámetros termodinámicos del sistema como constantes aparentes de partición, constantes absolutas de asociación enantiómero/selector a distintas temperaturas, enantioselectividades absolutas y variaciones de entalpías y entropías del sistema bajo estudio. Esto demuestra, que la

cromatografía gaseosa quiral empleando columnas capilares, es una excelente herramienta para obtener propiedades fisicoquímicas de sistemas complejos.

Se realizó además una comparación de las constantes absolutas obtenidas a una dada temperatura con los valores obtenidos a partir del modelo de incremento de la retención. Se ha evidenciado que el uso de sustancias de referencia no es un enfoque correcto. Esto se debe a que se ha demostrado la interacción existente entre los n-alcenos utilizados como referencia con el selector quiral. Es por ello que se produce una variación, que no es despreciable, en los cálculos del incremento de retención ( $R'$ ), y por lo tanto se produce un error en los cálculos de enantioselectividad. Con lo cual es imposible realizar cálculos rigurosos de propiedades termodinámicas a partir de este modelo.

### 3.5 Referencias

- [1] J.H. Purnell, *Gas chromatography*, Institute of Petroleum: London, 1967.
- [2] J.R. Conder, C.L. Young, *Physicochemical Measurement by Gas Chromatography*, Chichester: New York: Wiley, 1979.
- [3] B. Koppenhoefer, E. Bayer, *Chiral Recognition in the Resolution of Enantiomers by GLC*, *Chromatographia*. 19 (1984) 123-130.
- [4] B. Koppenhoefer, B. Lin, *Thermodynamic Properties of Enantiomers of Underivatized Diols Versus the Cyclic Carbonates in Gas Chromatography on Chirasil-Val*, *J. Chromatogr.* 481 (1989) 17-26.
- [5] V. Schurig, J. Ossig, R. Link, *Evidence for a Temperature Dependent Reversal of the Enantioselectivity in Complexation Gas Chromatography on Chiral Phases*, *Angew. Chemie Int. Ed. English*. 28 (1989) 194-196.
- [6] K. Watabe, R. Charles, E. Gil-Av, *Temperature Dependent Inversion of Elution Sequence in the Resolution of  $\alpha$ -Amino Acid Enantiomers on Chiral Diamide Selectors*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989) 192-194.
- [7] V. Schurig, F. Betschinger, *Metal-Mediated Enantioselective Access to Unfunctionalized Aliphatic Oxiranes: Prochiral and Chiral Recognition*, *Chem. Rev.* 92 (1992) 873-888.
- [8] T.S. Khasanshin, A.P. Shchemelev, *The Thermodynamic Properties of n -Tetradecane in Liquid State*, *High Temp.* 40 (2002) 207-211.
- [9] The Dortmund Data Bank (DDBST GmbH), (n.d.).  
<http://ddbonline.ddbst.de/DIPPR105DensityCalculation/DIPPR105CalculationCGI.exe?component=Hexadecane>.
- [10] I. Abe, N. Fujimoto, T. Nakahara, *Enantiomer Separation of Amino Acids by Capillary Gas Chromatography Using Cyclodextrin Derivatives as Chiral Stationary Phases*, *J. Chromatogr. A* 676 (1994) 469-473.
- [11] V. Schurig, *Separation of Enantiomers by Gas Chromatography*, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 275-99.
- [12] M. Jung, D. Schmalzing, V. Schurig, *Theoretical Approach to the Gas Chromatographic Separation of Enantiomers on Dissolved Cyclodextrin Derivatives*, *J. Chromatogr. A* 552 (1991) 43-57.
- [13] M.A. Muhs, F.T. Weiss, *Determination of Equilibrium Constants of Silver-Olefin Complexes Using Gas Chromatography*, *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 4697-4705.
- [14] R.J. Cvetanović, F.J. Duncan, W.E. Falconer, R.S. Irwin, *Secondary Deuterium Isotope Effects on the Stability of the Silver Ion-Olefin Complexes*, *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 1827-1832.
- [15] C.L. De Ligny, T. Van 'T Verlaat, 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*, *J. Chromatogr.* 76 (1973) 115-124.
- [16] E. Gil-Av, J. Herling, *Determination of the Stability Constants of Complexes By Gas Chromatography*, *J. Phys. Chem.* 66 (1962) 1208-1209.
- [17] V. Schurig, R. Weber, *Manganese(II)-bis(3-heptafluorobutyryl-1-R-camphorate): A Versatile Agent for the Resolution of Racemic Cyclic Ethers by Complexation Gas*

- Chromatography, *J. Chromatogr.* 217 (1981) 51–70.
- [18] V. Schurig, R. Schmidt, Extraordinary Chiral Discrimination in Inclusion Gas Chromatography. Thermodynamics of Enantioselectivity Between a Racemic Perfluorodiether and a Modified  $\gamma$ -Cyclodextrin, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 311–324.
- [19] B. Casu, M. Reggiani, G.R. Sanderson, Methylated Cycloamyloses (Cyclodextrins) and their Inclusion Properties, *Carbohydr. Res.* 76 (1979) 59–66.
- [20] N.T. McGachy, N. Grinberg, N. Variankaval, Thermodynamic Study of N-Trifluoroacetyl-O-alkyl Nipicotic Acid Ester Enantiomers on Diluted Permethylated  $\beta$ -Cyclodextrin Stationary Phase, *J. Chromatogr. A* 1064 (2005) 193–204.
- [21] V. Pliska, M. Schmidt, J.-L. Fauchere, Partition Coefficients of Amino Acids and Hydrophobic Parameters  $\pi$  of their Side-Chains as Measured by Thin-Layer Chromatography, *J. Chromatogr.* 216 (1981) 79–92.
- [22] A. Radzicka, R. Wolfenden, Comparing the Polarities of the Amino Acids: Side-Chain Distribution Coefficients between the Vapor Phase, Cyclohexane, 1-Octanol, and Neutral Aqueous Solution, *Biochemistry.* 27 (1988) 1664–1670.
- [23] T. Beesley, The State of the Art in Chiral Capillary Gas Chromatography, *LCGC North Am.* 29 (2011) 642–651.
- [24] H. Schmarr, A. Mosandl, Influence of Derivatization on the Chiral Selectivity of Cyclodextrins: Alkylated/ Acylated Cyclodextrins and  $\gamma$ -/ $\delta$ -Lactones as an Example, *J. Microcolumn Sep.* 3 (1991) 395–402.

# Capítulo 4

---

Influencia del polímero empleado para la  
disolución del selector quiral en la  
enantioseparación de compuestos de baja  
volatilidad

## 4.1 Objetivo

El objetivo del estudio descrito en el presente capítulo fue estudiar la influencia del polímero empleado en la disolución de un selector quiral cuando se requiere usar una columna de CG en la enantiorresolución de compuestos de baja volatilidad. Se escogieron como analitos poco volátiles un grupo de pesticidas polares usados en las prácticas agrícolas de nuestro país. Estos son: mecoprop, diclorprop, fenoprop, hidroprop, metalaxil, haloxifop metilo y fenoxaprop etilo. Dichos compuestos son moléculas que poseen muy baja presión de vapor, y, en consecuencia, requieren temperaturas relativamente altas para su elución en columnas de CG (ver Tabla 2.2). En el capítulo anterior se discutió la influencia de la temperatura sobre la enantioseparación (ver Figura 3.12) así como la influencia positiva de incrementar la molalidad del selector (Figura 3.9). Es decir, la dificultad analítica de enantioseparar compuestos poco volátiles radica en que la enantiorresolución, sin excepción, se ve favorecida por: i) temperaturas relativamente bajas y ii) altas concentraciones de selector quiral en el solvente polimérico. Por este motivo, la enantioseparación de compuestos polares por CG no es una tarea sencilla. En este capítulo se propuso evaluar distintos solventes poliméricos del selector quiral heptakis(2,3,6-tri-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina (PM- $\beta$ -CD), con el fin de aumentar la concentración de selector quiral en la mezcla buscando compensar la disminución de los factores de enantioseparación por efecto del aumento de la temperatura. Un objetivo adicional fue lograr la enantiorresolución de un gran número de pesticidas utilizando una única columna quiral.

## 4.2 Introducción

Los pesticidas quirales pertenecen a numerosas familias químicas. En el año 2005 se hizo una estimación de que alrededor del 25% de todos los productos agroquímicos son quirales, junto con la predicción de que esta proporción aumentaría en el tiempo a medida que se introducen compuestos de mayor complejidad química [1]. Por razones económicas, muchos de estos agroquímicos quirales se aplican en actividades agrícolas y forestales formulados como racematos. Hasta la fecha, sin embargo, la estereoisomería de los contaminantes ambientales ha recibido poca atención. Como se mencionó anteriormente, los enantiómeros presentan las mismas propiedades físicas y químicas, por lo que los procesos medioambientales abióticos afectan generalmente de la misma manera a los enantiómeros. Sin embargo, los procesos bioquímicos (por ejemplo biotransformaciones) y toxicológicos pueden ser enantioselectivos porque los estereoisómeros individuales pueden interactuar diferencialmente con otras moléculas quirales, tales como enzimas y receptores biológicos [2]. Finalmente, la presencia de microorganismos en el medioambiente es la responsable de la degradación enantioselectiva que se observa para muchos de estos compuestos.

### 4.2.1 Determinación de los pesticidas

Los métodos analíticos utilizados para la determinación enantiomérica en matrices ambientales incluyen cromatografía de líquidos, electroforesis capilar y cromatografía de gases, usualmente acoplados a detección por espectrometría de masas para proporcionar la sensibilidad requerida para el control de contaminantes y la selectividad necesaria en el análisis de mezclas complejas. Los métodos de cromatografía gaseosa con fases estacionarias quirales son preferidos principalmente para la separación directa de enantiómeros volátiles y térmicamente estables debido a las ventajas de alta sensibilidad, eficiencia y precisión. Sin embargo, la enantioseparación de compuestos polares (y menos volátiles) es difícil debido a que habitualmente es necesario disminuir la temperatura de la columna para mejorar los factores de enantioselectividad, con el consiguiente aumento en la retención del analito, haciendo muchas veces inviable la técnica analítica [3]. Una manera de mantener tiempos de análisis razonables a una temperatura de elución relativamente baja consiste en el uso de columnas más cortas recubiertas con una película de fase estacionaria de espesor reducido. Otra posibilidad implica su conversión en derivados volátiles que puedan eluirse a temperaturas relativamente más bajas.

La búsqueda de columnas quirales con capacidad de discriminación más amplia ha resultado en la propuesta de distintos derivados de ciclodextrinas, especialmente las basadas en  $\beta$ - y en  $\gamma$ -CD. Como se discutió en la introducción, las columnas capilares suelen desarrollarse con mezclas de estas CD modificadas con los polímero típicamente utilizados como fase estacionaria en CG [4]. El uso de selectores quirales diluidos tiene las ventajas discutidas en la introducción general.

La mayoría de los estudios sobre el efecto de diferentes solventes sobre la capacidad de enantiorreconocimiento de diversos selectores datan de más de veinte años. Con sólo unas pocas excepciones, se ha encontrado que OV-1701 es el polisiloxano más común usado para la preparación de fases estacionarias quirales de CD diluidas [5]. Sin embargo, algunos trabajos han demostrado que las características de enantioselectividad de estas CD pueden ser influenciadas por el líquido polimérico usado como disolvente. Dietrich y colaboradores [6], realizaron una comparación del rendimiento de las columnas recubiertas con heptakis(6-*O*-*tert*-butildimetilsilil-2,3-di-*O*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina diluida con 100% PDMS (SE-30), poli(dimetilsiloxano-co-difenilsiloxano) 95% PDMS (SE-52) y con OV-1701-vi, las que fueron usadas para el análisis de racematos de ácidos grasos ramificados y encontraron que SE-52 condujo a una enantioselectividad mejorada. Bicchi y colaboradores [7], sin embargo, compararon la separación de compuestos volátiles en columnas recubiertas con el derivado heptakis(2,6-di-*O*-metil-3-*O*-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina, diluido con OV-1701, con la separación obtenida en columnas preparadas con el mismo selector quiral pero diluidas con fases de polaridades diferentes poli(dimetilsiloxano-co-difenilsiloxano) 15% PDMS (PS-086), 100% PDMS (PS-347.5) y poli(dimetilsiloxano-co-cianopropilfenilsiloxano) 50% PDMS (OV-225)). En este caso, encontraron que ninguno de los polímeros de dilución investigados fue inequívocamente mejor que otro, aunque PS-347.5, PS-086 y OV-1701 generalmente dieron mejores resultados con los racematos estudiados que OV-225. Posteriormente, Dietrich y colaboradores [8] investigaron la influencia de diferentes polisiloxanos sobre la enantioselectividad y la eficiencia de columnas capilares recubiertas con heptakis(6-*O*-*tert*-butildimetilsilil-2,3-di-*O*-acetil)- $\beta$ -ciclodextrina. Los autores concluyeron que una cierta combinación de CD/polisiloxano es superior a otras sólo a una temperatura particular. Los estudios de Osorio Grisales y colaboradores [9] tampoco arrojaron resultados conclusivos. Ensayando columnas con diferentes concentraciones de PM- $\beta$ -CD como selector quiral disuelto en SE-30, SE-54 y Carbowax 20M para la enantioseparación de compuestos volátiles, mostraron ejemplos de enantiómeros bien resueltos en una columna, pero no en otras.

## 4.3 Resultados y discusión

La Tabla 4.1 resume las propiedades físicas de las columnas capilares empleadas. Las columnas que contenían 30% de PM- $\beta$ -CD se construyeron con un espesor de película más delgado para compensar la concentración de selector más alta y, de este modo, disminuir algo la retención de solutos y el tiempo de análisis.

Se midieron las eficiencias (platos teóricos/m) con n-dodecano a 120°C para las cuatro columnas capilares, y se observaron mayores números de platos en la columna comercial. La menor eficiencia observada para las columnas preparadas con SE-54 y C20M se atribuyó al mayor porcentaje de derivado de CD contenido en estas fases [9-11]. Desafortunadamente, se desconoce la información sobre las propiedades de la columna comercial Hydrodex  $\beta$ -PM (por ejemplo, el espesor de la película, la matriz polimérica aquiral y la concentración del selector), haciendo imposible una comparación inequívoca entre las distintas columnas.

### 4.3.1 Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura se evaluó para cada una de las cuatro columnas bajo investigación. La Figura 4.1 ilustra los cromatogramas de los ésteres metílicos de los herbicidas mecoprop, diclorprop y fenoprop obtenidos a partir de las cuatro columnas y bajo dos programas de temperatura diferentes. El derivado de fenoprop no pudo ser resuelto en ninguna de las 4 columnas con el primer programa, mientras que se consiguió una resolución parcial en las columnas con SE-54 y OV-1701-vi cuando se utilizó un programa de aumento de temperatura más lento (Figura 4.1 B)). El cambio del polímero diluyente no afectó significativamente la elección de las temperaturas de funcionamiento. Como era de esperar, un lento aumento de temperatura favoreció las retenciones relativas ( $k_D/k_L$ ) de los otros dos racematos, y se observaron resultados similares tanto para los ésteres de etilo como de trifluoroetilo. Por lo tanto, se utilizó este programa más lento para todos los experimentos posteriores.

Tabla 4.1. Propiedades geométricas y cromatográficas de las columnas capilares.

Columnas capilares	Dimensiones: longitud (m) x espesor de película ( $\mu\text{m}$ )	% Ciclodextrina (p/p)	Solvente polimérico	Polaridad del solvente polimérico <sup>a</sup>	máximo % (p/p) PM- $\beta$ -CD a la mínima temperatura <sup>b</sup>	N/m <sup>c</sup>
PM- $\beta$ -CD/C20M	20x0.1	30	C20M	2208	< 50% (60°C)	1100
PM- $\beta$ -CD/SE-54	20x0.1	30	SE-54	337	30% (>100°C)	1700
PM- $\beta$ -CD/OV-1701-vi	18.9x0.14	16	OV-1701-vi	790	10% (23°C)	2000
Hydrodex $\beta$ -PM	25x -	- <sup>d</sup>	-	-	-	2500
SE-54	20x0.1	0	-	337	-	2300
C20 M	20x0.1	0	-	2208	-	2700

<sup>a</sup>- Índices de McReynolds obtenidos de la referencia [12]

<sup>b</sup>- Datos tomados de [9,13]

<sup>c</sup>- Medido con n-dodecano a 120°C. Flujo: 1 mL/min

<sup>d</sup>- Datos no disponibles

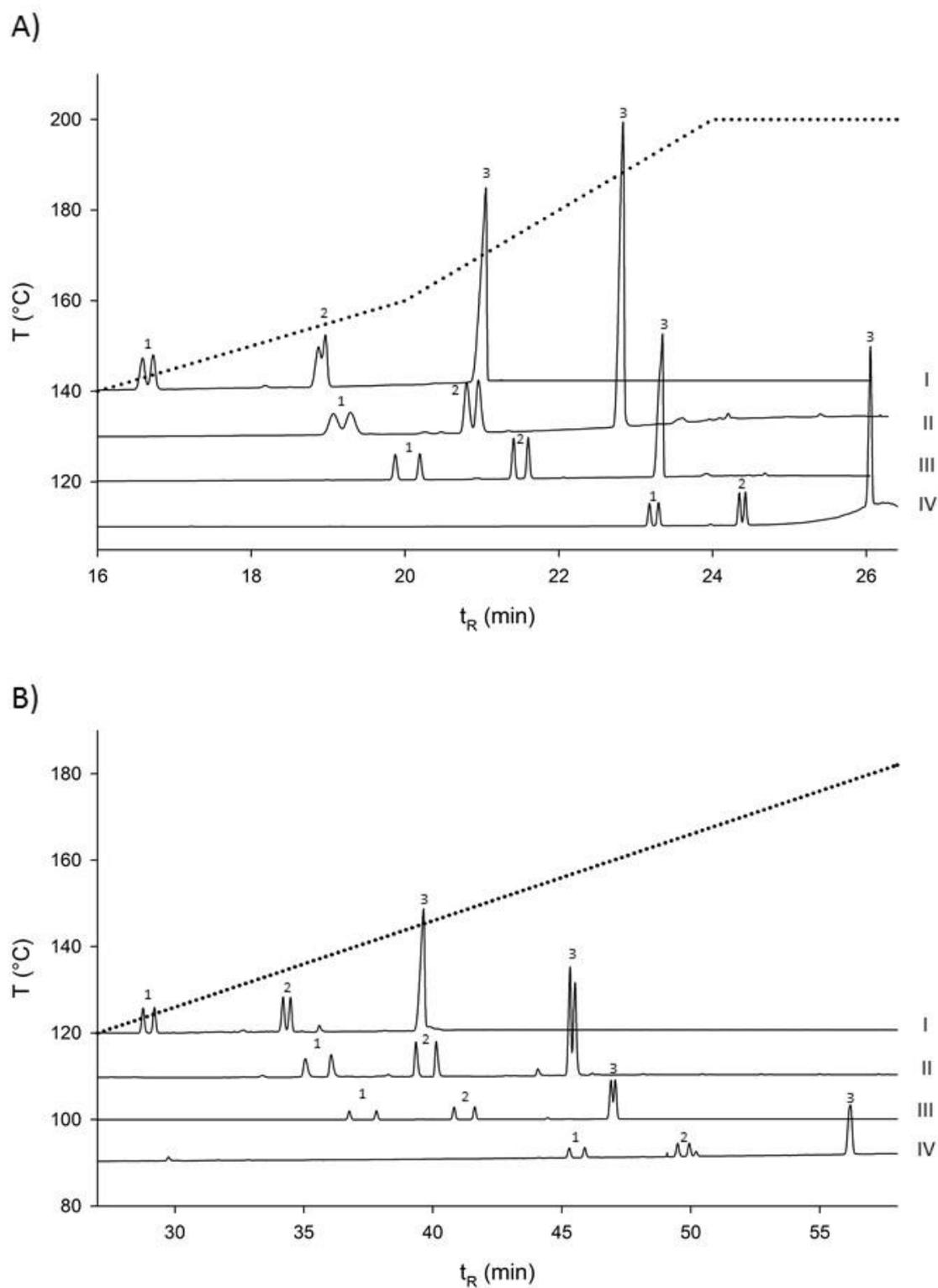


Figura 4.1. Cromatogramas de los ésteres metílicos de herbicidas fenoxipropiónicos bajo dos programas de temperatura. A) Temperatura inicial= 70°C por 2 min, seguido de calentamiento a 5°C/min hasta 160°C, y luego 10 °C/min hasta 200 °C; B) Temperatura inicial: 70°C por 2 min, seguido de calentamiento a 2 °C/min hasta 200 °C. Columnas: I, PM-β-CD/C20M; II, PM-β-CD/SE-54; III, PM-β-CD/OV-1701-vi; IV, Hydrodex-β-PM. Flujo: 1 mL/min, Solutos: 1) mecoprop; 2) diclorprop, 3) fenoprop.

### 4.3.2 Mediciones cromatográficas

La Tabla 4.2 enumera los factores de retención para el primer enantiómero eluido ( $k_L$ ), la retención relativa ( $k_D/k_L$ ) y la enantiorresolución ( $R_s$ ) medidos para todos los pesticidas y sus derivados en las cuatro columnas con el mismo programa de temperatura. Los valores más altos de retención relativa y resolución obtenidos para cada analito se indican en negrita. La columna PM- $\beta$ -CD/OV-1701-vi produjo la mayor retención, aunque el porcentaje de CD fue menor que en las otras columnas. Esto se puede atribuir al espesor de película que fue 40% mayor respecto de las otras (con la posible excepción de la columna comercial, para la cual estos datos son desconocidos). La retención relativa de los tres derivados de mecoprop y dicloroprop (metilo, etilo y trifluoroetilo) fueron apenas mayores en la columna recubierta con el PM- $\beta$ -CD/OV-1701-vi que en las otras columnas, mientras que para los otros racematos se obtuvieron mejores retenciones relativas con la columna recubierta con PM- $\beta$ -CD/SE-54.

La comparación de las columnas PM- $\beta$ -CD/SE-54 y PM- $\beta$ -CD/C20M, las cuales se construyeron con el mismo porcentaje de selector quiral y el mismo espesor de película, reveló que la retención, retención relativa y la resolución fueron sistemáticamente más altos en la columna PM- $\beta$ -CD/SE-54. La comparación entre estas dos columnas demostró claramente que la retención relativa aumenta cuando disminuye la polaridad del disolvente polimérico, independientemente de la estructura (y polaridad) de los analitos racémicos, sin excepciones.

Como se mencionó en el capítulo anterior, la retención de un soluto quiral en una fase estacionaria quiral está dada por dos contribuciones: las interacciones específicas entre cada enantiómero con el selector ( $k_L^e$  y  $k_D^e$ ), y por otro lado las interacciones no enantioselectivas ( $k_{ne}$ ), las cuales son iguales para los dos enantiómeros, en la matriz aquiral. La retención relativa experimental  $r$  será:

$$r = \frac{k_D}{k_L} = \frac{k_{ne} + k_D^e}{k_{ne} + k_L^e} \quad (4.1)$$

donde el numerador y el denominador del lado izquierdo de la ecuación aluden a los valores experimentales,  $k_L^e$  y  $k_D^e$  fueron arbitrariamente asignados y corresponden al primer y segundo enantiómero eluidos, respectivamente.

En principio, se espera que una interacción más fuerte entre el soluto y la matriz aquiral conduzca a factores de retención más grandes, aunque enantioseparaciones aparentes más bajas. Los resultados detallados en la Tabla 4.2 demostraron ser lo opuesto a esa expectativa. Con el fin de explicar el verdadero papel del disolvente polimérico, se midió la retención de

Tabla 4.2. Comparación cromatográfica de las columnas quirales: factor de retención ( $k_L$ ), resolución ( $R_s$ ) y retención relativa ( $k_D/k_L$ )

analito	C20M			SE-54			OV-1701-vi			Hydrodex- $\beta$ -PM		
	$k_L$	$R_s$	$k_D/k_L$	$k_L$	$R_s$	$k_D/k_L$	$k_L$	$R_s$	$k_D/k_L$	$k_L$	$R_s$	$k_D/k_L$
Mecoprop-metilo	19.8	2.1	1.01 <sub>6</sub>	24.4	3.5	<b>1.03</b> <sub>0</sub>	27.8	5.3	1.03 <sub>0</sub>	26.8	2.9	1.01 <sub>4</sub>
Mecoprop-etilo	20.0	2.2	1.01 <sub>9</sub>	25.6	3.7	<b>1.02</b> <sub>7</sub>	29.3	5.3	<b>1.02</b> <sub>7</sub>	28.2	2.5	1.01 <sub>2</sub>
Mecoprop-trifluoroetilo	17.9	5.4	1.04 <sub>7</sub>	22.6	4.8	1.05 <sub>8</sub>	26.4	9.0	<b>1.06</b> <sub>0</sub>	25.3	5.1	1.03 <sub>0</sub>
Diclorprop-metilo	23.7	1.3	1.00 <sub>9</sub>	27.5	3.6	<b>1.02</b> <sub>1</sub>	30.9	3.9	1.02 <sub>0</sub>	29.3	2.1	1.00 <sub>9</sub>
Diclorprop-etilo	23.9	1.3	1.01 <sub>0</sub>	28.7	3.4	1.01 <sub>9</sub>	32.5	4.3	<b>1.02</b> <sub>1</sub>	30.7	1.9	1.00 <sub>9</sub>
Diclorprop-trifluoroetilo	21.5	3.8	1.02 <sub>6</sub>	25.5	5.9	<b>1.04</b> <sub>3</sub>	29.5	7.8	<b>1.04</b> <sub>3</sub>	27.8	4.3	1.02 <sub>1</sub>
Fenoprop-metilo	27.6	-	1.00 <sub>0</sub>	31.8	<1	<b>1.00</b> <sub>4</sub>	35.7	<1	<b>1.00</b> <sub>4</sub>	33.4	-	1.00 <sub>0</sub>
Fenoprop-etilo	27.7	-	1.00 <sub>0</sub>	33.0	<1	<b>1.00</b> <sub>4</sub>	37.2	<1	1.00 <sub>2</sub>	34.7	-	1.00 <sub>0</sub>
Fenoprop-trifluoroetilo	25.9	<1	1.00 <sub>3</sub>	30.3	1.5	<b>1.00</b> <sub>8</sub>	34.8	1.4	1.00 <sub>6</sub>	32.2	<1	1.00 <sub>3</sub>
Hidroprop-trifluoroetilo	37.1	-	1.00 <sub>0</sub>	37.0	2.2	<b>1.00</b> <sub>8</sub>	38.5	1.1	1.00 <sub>5</sub>	34.0	-	1.00 <sub>0</sub>
Hidroprop-metilo	35.2	<1	1.00 <sub>3</sub>	36.9	2.5	<b>1.01</b> <sub>0</sub>	40.2	1.0	1.00 <sub>5</sub>	36.1	1.1	1.00 <sub>4</sub>
Hidroprop-etilo	36.8	<1	1.00 <sub>3</sub>	39.7	2.1	<b>1.00</b> <sub>7</sub>	43.7	1.4	1.00 <sub>5</sub>	39.4	<1	1.00 <sub>2</sub>
Metalaxil	37.0	-	1.00 <sub>0</sub>	38.9	<1	<b>1.00</b> <sub>1</sub>	43.3	-	1.00 <sub>0</sub>	39.7	-	1.00 <sub>0</sub>
Metalaxil-trifluoroetilo	32.7	<1	1.00 <sub>2</sub>	35.7	1.3	<b>1.00</b> <sub>6</sub>	40.4	<1	1.00 <sub>4</sub>	37.1	-	1.00 <sub>0</sub>
Haloxifop-metilo	41.7	-	1.00 <sub>0</sub>	45.7	1.1	<b>1.00</b> <sub>4</sub>	50.1	1.0	<b>1.00</b> <sub>4</sub>	46.0	-	1.00 <sub>0</sub>
Haloxifop-trifluoroetilo	38.6	2.0	1.00 <sub>4</sub>	42.8	2.2	<b>1.00</b> <sub>8</sub>	47.5	1.9	1.00 <sub>7</sub>	44.7	1.0	1.00 <sub>5</sub>
Fenoxaprop-etilo	40.9	-	1.00 <sub>0</sub>	40.4	<1	<b>1.00</b> <sub>2</sub>	41.6	-	1.00 <sub>0</sub>	37.1	-	1.00 <sub>0</sub>

todos los compuestos en columnas de C20M y SE-54 (sin selector quiral) bajo el mismo programa de temperatura. Los factores de retención para todos los compuestos obtenidos en la columna SE-54 se representaron frente a los valores correspondientes en la columna C20M en la Figura 4.2 A). Dado que los pesticidas ensayados son polares, la retención fue sistemáticamente más baja en el polímero menos polar, esto es, la contribución aquiral al factor de retención en la columna PM- $\beta$ -CD/SE-54 es menor. Sin embargo, el resultado más sorprendente fue que la contribución quiral a la retención no es igual en ambas columnas. Como se observa en la Figura 4.2 B), las diferencias expresadas como  $k_L^e$  para cada compuesto en la columna quiral respecto de la columna aquiral correspondiente son sistemáticamente mayores en SE-54.

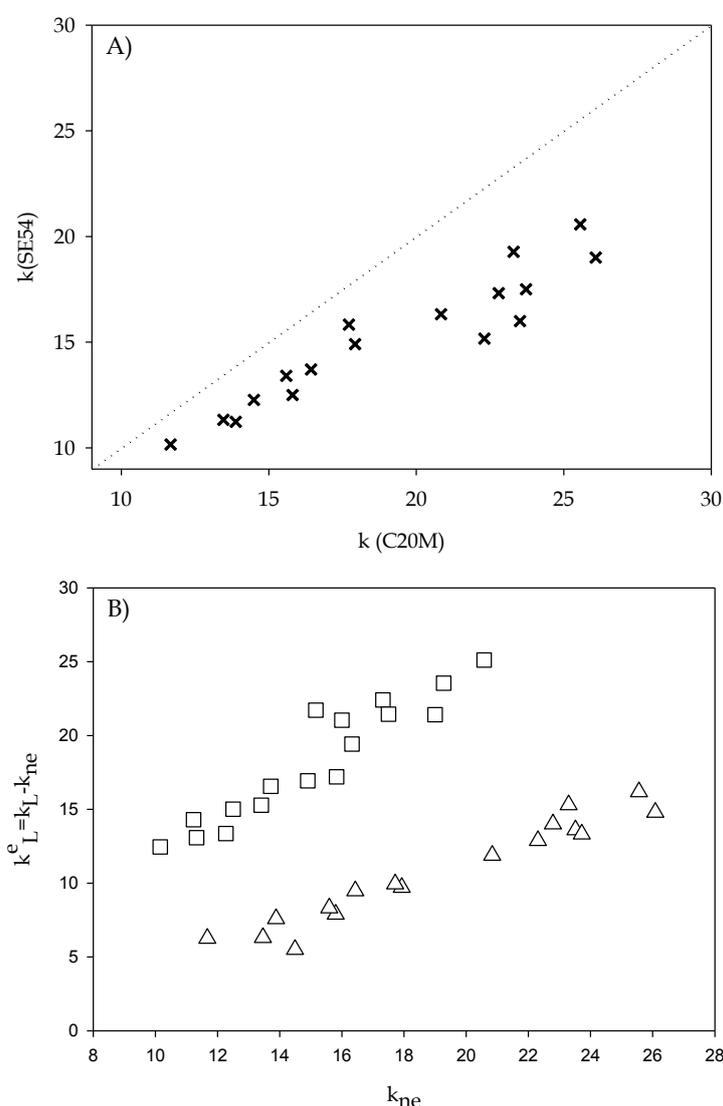


Figura 4.2. A) Factores de retención de los pesticidas racémicos en la columna que contiene SE-54 contra los valores en la columna recubierta con C20M; la línea de puntos representa  $x=y$ ; B) Contribución quiral a la retención ( $k_L^e$ ) en función de la retención en las columnas aquirales correspondientes ( $k_{ne}$ ). Símbolos: ( $\square$ ): columnas fabricadas en SE-54; ( $\Delta$ ): columnas fabricadas en C20M.

Dietrich y colaboradores [11] sugirieron que la interacción de un polímero polar y el derivado CD podría o bien "bloquear" el sitio activo en el selector o conducir a cambios conformacionales en el selector que favorecería el reconocimiento de ciertos solutos pero no otros. Nuestros resultados, sin embargo, indicarían que *todos* los compuestos estudiados se vieron afectados de forma similar en sus interacciones con el selector quirral en la columna construida con una solución de PM- $\beta$ -CD en C20M. La relación entre las contribuciones quirales a la retención ( $k_{eL}$ ) medida en PM- $\beta$ -CD/SE-54 con respecto a las medidas en PM- $\beta$ -CD/C20M arrojó un promedio de 1.76 con una desviación estándar relativa del 13.8%. Se puede inferir que la columna conteniendo PM- $\beta$ -CD/C20M se comporta como si el selector no estuviera totalmente accesible para el enantiorreconocimiento.

La enantioselectividad también depende claramente del tipo de derivatización utilizada. Las Figuras 4.3 y 4.4 representan los cromatogramas obtenidos para los derivados etilo y trifluoroetilo, respectivamente, de los tres racematos fenoxipropiónicos (mecoprop, diclorprop y fenoprop). Estas Figuras deben compararse con la Figura 4.1 B). Se puede observar que se lograron enantioseparaciones para los tres derivados en la columna PM- $\beta$ -CD/SE-54. Con los derivados metilados y etilados del fenoprop, en cambio, no se obtuvo una separación a la línea de base, mientras que con el derivado trifluoroetilado se consiguió una resolución mayor que 1 en dos columnas. Los datos de la Tabla 4.2 demuestran que para todos los analitos investigados se obtuvo una resolución mayor con los derivados trifluoroetilados (más volátiles), seguido por los derivados metilados y finalmente los derivados etilados, para los que la temperatura de elución fue mayor.

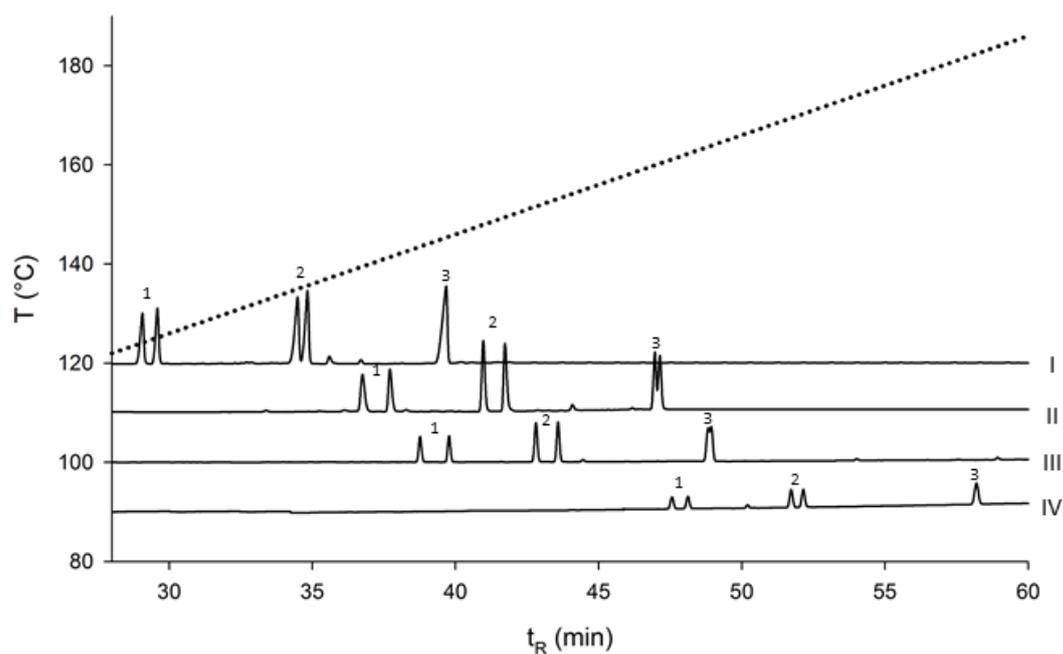


Figura 4.3. Cromatogramas de los etil derivados de los herbicidas fenoxipropiónicos. Detalles experimentales en la Figura 4.1. B)

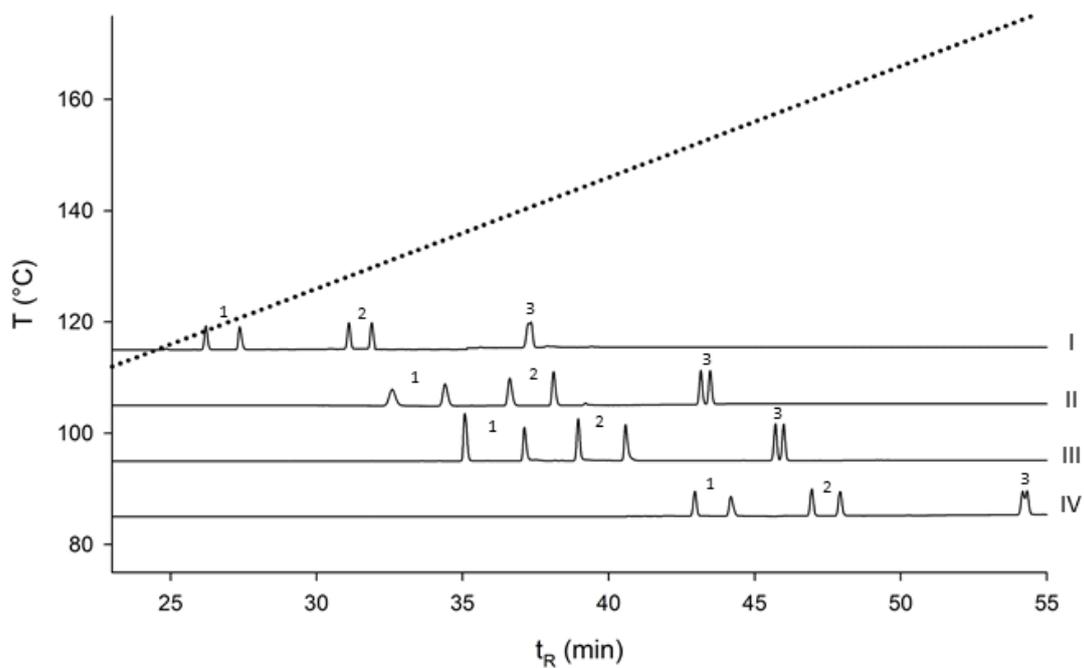


Figura 4.4. Cromatogramas de los derivados 2,2,2-trifluoroetil de los herbicidas fenoxipropiónicos. Detalles experimentales en la Figura 4.1. B)

### 4.3.3 Comparación de los resultados obtenidos con enantioseparaciones de estos pesticidas reportadas en literatura

A continuación, se compararán los resultados de enantioseparación de estos pesticidas con los antecedentes previamente reportados en la literatura. La Tabla 4.3 es una síntesis de la información recopilada. Weber y colaboradores [14] describieron la separación enantioselectiva de diferentes fenoxipropionatos en una columna Hydrodex- $\beta$ -PM. Encontraron una disminución progresiva en la eficiencia de enantioseparación desde mecoprop-metilo y diclorprop-metilo al derivado fenoprop-metilo, el cual eluyó como un único pico. Este resultado es consistente con nuestros hallazgos en la misma columna; mientras que, por el contrario, con la columna que contiene 16% de PM- $\beta$ -CD en OV-1701, y utilizando el mismo programa de temperatura, se logró una separación parcial de enantiómeros de fenoprop-metilo (Figura 4.1).

Una columna capilar con el mismo selector quiral fue utilizada por Sánchez [15] para determinar las cantidades relativas de las formas enantioméricas R y S de mecoprop-metilo y diclorprop-metilo en muestras de suelo; los cromatogramas evidenciaron resoluciones a la línea de base para ambos racematos. Müller y Buser [16,17] estudiaron la degradación de mecoprop y diclorprop metilados con diazometano en suelo en condiciones de laboratorio. La separación enantioselectiva se llevó a cabo con una columna de 20 m recubierta con heptakis(6-*O-tert*-butildimetilsilil-2,3-di-*O*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina al 35% en OV-1701. Los ésteres de mecoprop y diclorprop derivados con 2,3,4,5,6-pentafluorobencilo se separaron casi a la línea de base ( $R_s = 0.9$ ) en una columna de vidrio de 15 m (0.25 mm de diámetro interno) con una fase de polisiloxano OV-1701 que contenía 35% del mismo selector quiral [18,19].

Tabla 4.3. Enantiorresolución de los herbicidas informadas por otros autores.

Compuesto	Fase estacionaria quiral	Rs	Referencia
Mecoprop-metil	PM- $\beta$ -CD (Columna Hydrodex)	>1	[14,15]
Mecoprop-metil	heptakis(6-O- <i>tert</i> -butildimetilsilil-2,3-di-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina/OV-1701	3	[16,17]
Mecoprop-pentafluorobencilo	heptakis(6-O- <i>tert</i> -butildimetilsilil-2,3-di-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina/OV-1701	<1	[18,19]
Diclorprop-metil	PM- $\beta$ -CD (Columna Hydrodex)	>1	[14,15]
Diclorprop-metil	heptakis(6-O- <i>tert</i> -butildimetilsilil-2,3-di-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina/OV-1701	2.4	[16,17]
Fenoprop-metil	PM- $\beta$ -CD (Columna Hydrodex)	0	[14]
Metalaxil	heptakis(6-O- <i>tert</i> -butildimetilsilil)- $\beta$ -CD/15% fenil,85% dimetilpolisiloxano	1.5	[20,21]
Metalaxil-etil	heptakis(6-O- <i>tert</i> -butildimetilsilil)- $\beta$ -CD/15% fenil,85% dimetilpolisiloxano	1.3	[20,21]
Haloxifop	15% PM- $\beta$ -CD/OV-1701	1.3	[22,23]
Haloxifop-etil	15% PM- $\beta$ -CD/OV-1701	1.3	[22,23]

El metalaxil prácticamente no pudo ser separado en estas columnas, sólo en la columna PM- $\beta$ -CD /SE-54 se obtuvo un factor de separación de 1.001. También se probó un aumento más lento de temperatura del horno sin obtener mejores resultados. Por el contrario, los cromatogramas de los enantiómeros de los derivados trifluoroetilados del metalaxil que se corrieron en las cuatro columnas, muestran una resolución a línea de base lograda en la columna PM- $\beta$ -CD/SE-54, resolución parcial en las columnas PM- $\beta$ -CD/C20M y PM- $\beta$ -CD/OV-1701-vi, mientras que en la columna Hydrodex no se obtuvo separación. (Figura 4.5). En un trabajo anterior, Buser había utilizado una columna capilar con 50% de heptakis(6-O-*tert*-butildimetilsilil)- $\beta$ -CD disuelta en 15% difenilo 85% dimetilpolisiloxano para la enantioseparación de este herbicida [20], y Buerge había estudiado la degradación y la estabilidad quiral de metalaxil en el suelo con el mismo selector quiral sililado [21].

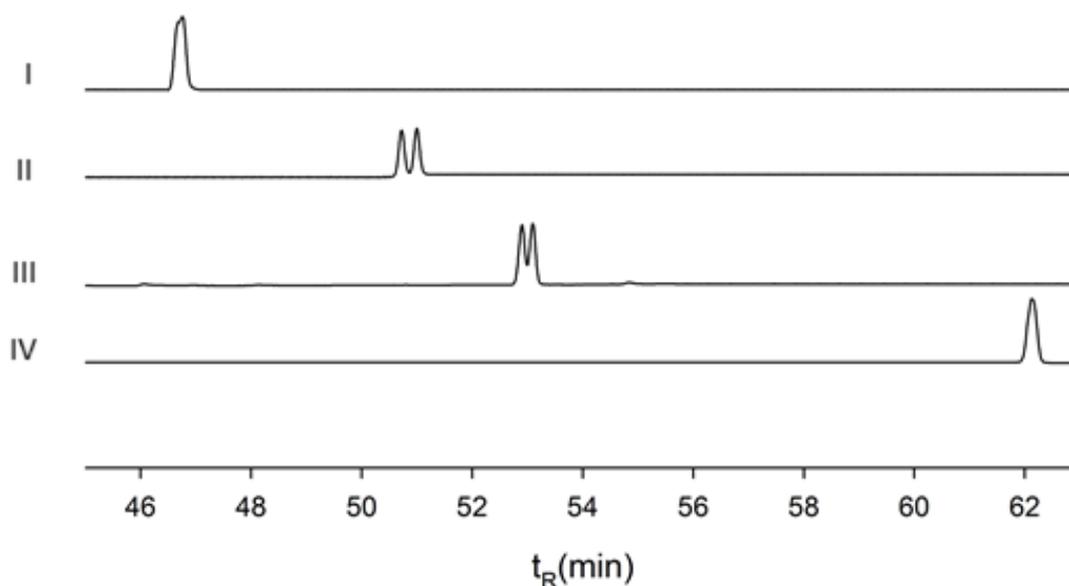


Figura 4.5. Cromatogramas del derivado trifluoroetil éster de metalaxil. El primer pico corresponde al enantiómero R. El resto de la información cromatográfica en la leyenda de la Figura 4.1. B)

Haloxifop-metil es un herbicida que se hidroliza rápidamente a ácido haloxifop, cuyo enantiómero R posee la actividad herbicida, aunque en el suelo el isómero ácido S se enantiomeriza al ácido R en menos de un día. Utilizando una columna recubierta con 15% de PM- $\beta$ -CD diluida en OV1701, han logrado la separación de haloxifop-metilo y haloxifop-etilo derivatizados con diazometano y con diazoetano, respectivamente [22,23]. En la Figura 4.6 se muestran los cromatogramas obtenidos para los derivados de A) metilo y B) trifluoroetilo del haloxifop, en cada una de las cuatro columnas. Para este compuesto, se obtuvieron resoluciones superiores a 2 para los derivados fluorados con las columnas basadas en SE-54 y OV-1701-vi junto con enantioseparaciones aceptables con las otras dos columnas.

La Figura 4.7 ilustra ejemplos de las separaciones enantioméricas del precursor hidroprop trifluoroetilo, metilo y etilo y de fenoxaprop-etilo en la columna PM- $\beta$ -CD/SE-54. La búsqueda bibliográfica no arrojó información sobre la separación por CG quiral de estos compuestos.

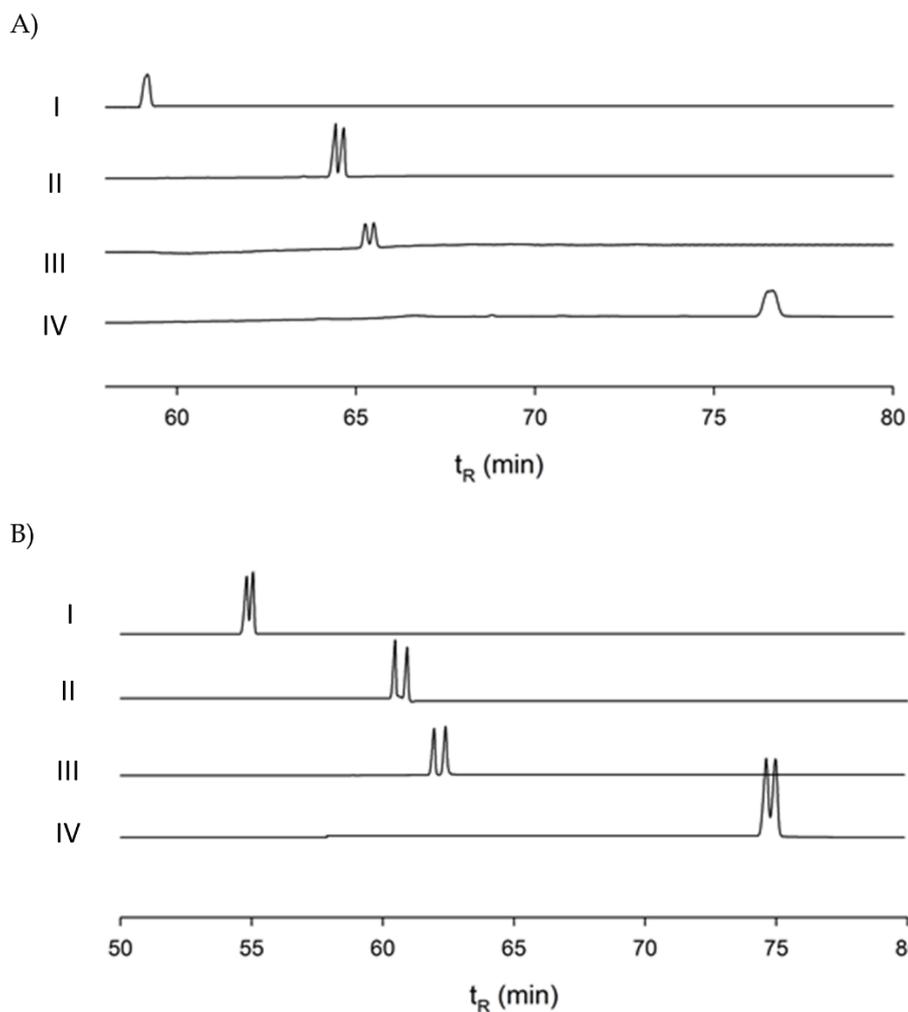


Figura 4.6. A) Cromatogramas de haloxifop-metilo en las cuatro columnas (como se indica en la Figura 4.1). B) Cromatogramas de haloxifop-trifluoroetilo en las cuatro columnas. El resto de la información cromatográfica es indicada en la leyenda de la Figura 4.1. B)

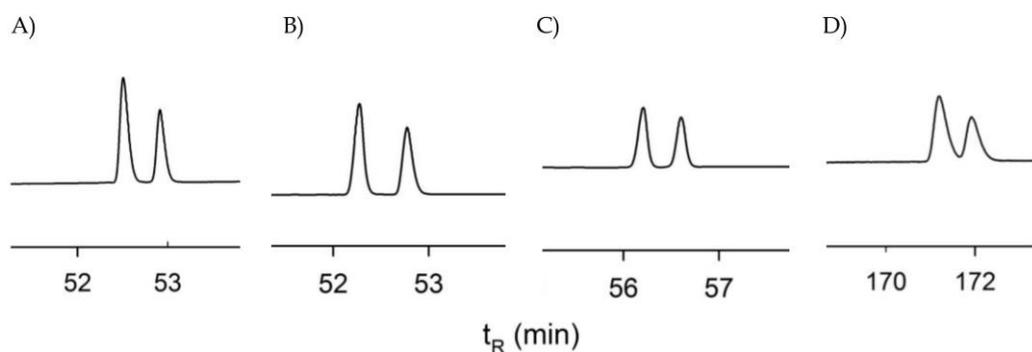


Figura 4.7. Ejemplos de enantioseparaciones de herbicidas en la columna PM- $\beta$ -CD/SE-54. Cromatogramas de hidroprop-trifluoroetilo (A); Hidroprop-metilo (B); Hidroprop-etilo (C) y de fenoxaprop-etilo (D). Programa de temperatura como en la Fig. 4.1 B, excepto para el fenoxaprop-etilo, en el cual se hizo un calentamiento inicialmente a 70 °C durante 2 min, seguido por un aumento de temperatura de 1 °C/min.

## 4.4 Conclusiones parciales

Se ha estudiado la resolución quiral de los ésteres de los pesticidas polares mecoprop, diclorprop, fenoprop, hidroprop, metalaxil, haloxifop y fenoxaprop en columnas capilares preparadas con el selector PM- $\beta$ -CD diluido en diferentes polímeros. Se obtuvieron mejores enantioseparaciones de esos racematos en las columnas preparadas con el polímero ligeramente polar. En particular, las retenciones relativas obtenidas con la columna capilar conteniendo 30% PM- $\beta$ -CD/SE-54 fueron mayores que las logradas con otras columnas para la mayoría de los racematos. Una explicación de la retención relativa generalmente más alta de estos pesticidas en esta columna puede ser la mayor concentración de PM- $\beta$ -CD en SE-54 que la preparada con OV-1701-vi. Por otro lado, la comparación de las separaciones enantioméricas de todos los compuestos en las columnas preparadas con 30% de PM- $\beta$ -CD permitió demostrar que las interacciones entre el enantiómero y el selector quiral se ven fuertemente afectadas por el disolvente polimérico. Concluimos que el uso de una silicona menos polar da como resultado columnas con mayor capacidad de discriminación hacia los racematos polares (es decir, menos volátiles) cuando se usan columnas con concentraciones de selector similares. Los resultados también evidencian que el aumento de la cantidad de selector quiral tuvo un efecto menos pronunciado sobre la enantioseparación que el uso de un disolvente polimérico menos polar.

Esta columna de PM- $\beta$ -CD/SE-54 también permitió la separación de los enantiómeros de fenoxaprop etilo que no fueron resueltos en las columnas con polímeros de mayor polaridad. La conclusión general es que la columna PM- $\beta$ -CD/SE-54 ha presentado la capacidad de enantiorreconocimiento más diversa, y la mayoría de los racematos de estos pesticidas quirales han sido resueltos satisfactoriamente. Este es un resultado muy significativo, dado que demuestra la posibilidad de emplear una única columna quiral para una diversidad de pesticidas polares. Más aún, los presentes resultados demuestran que la cromatografía gaseosa, bajo ciertas condiciones, se puede extender a sustancias de baja volatilidad y aprovechar de esta forma las ventajas que presenta frente a la cromatografía de líquidos, esto es, la implementación de métodos de rutina mucho más económicos y sensibles.

## 4.5 Referencias

- [1] W. Liu, J. Gan, D. Schlenk, W.A. Jury, Enantioselectivity in Environmental Safety of Current Chiral Insecticides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 701–706.
- [2] Moser Hans, R. Grety, S. Hanspeter, Der Einfluß von Atropisomerie und chiralem Zentrum auf die biologische Aktivität des Metolachlor / The Influence of Atropisomerism and Chiral Centre on the Biological Activity of Metolachlor, *Zeitschrift Für Naturforsch. B* 37 (1982) 451–462.
- [3] V. Schurig, Separation of Enantiomers by Gas Chromatography, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 275–99.
- [4] I. Hardt, W.A. König, Diluted Versus Undiluted Cyclodextrin Derivates in Capillary Gas Chromatography and the Effect of Linear Carrier Gas Velocity, Column Temperature, and Length on Enantiomer Separation, *J. Microcolumn Sep.* 5 (1993) 35–40.
- [5] E. Smolková-Keulemansová, W.A. König, Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins, *J. Chromatogr.* 623 (1992) 408.
- [6] A. Dietrich, B. Maas, G. Brand, V. Karl, A. Kaunzinger, A. Mosandl, Stereoisomeric Flavor Compounds, Part LX: Diluted Modified Cyclodextrins as Chiral Stationary Phases - The influence of the Polysiloxane Solvent, *J. High Resolut. Chromatogr.* 15 (1992) 769–772.
- [7] C. Bicchi, G. Aruffo, A.D. Amato, V. Manzin, A. Galli, M. Galli, Cyclodextrin Derivatives in the Gas Chromatographic 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, *J. High Resolut. Chromatogr.* 16 (1993) 209–214.
- [8] A. Dietrich, B. Maas, A. Mosandl, Diluted Modified Cyclodextrins as Chiral Stationary Phases- Influence of the Polysiloxane Solvent: Heptakis(2,3-di-O-acetyl-6-O-tert-butyl-dimethylsilyl)- $\beta$ -Cyclodextrin, *J. High Resolut. Chromatogr.* 18 (1995) 152–156.
- [9] J. Osorio Grisales, P.J. Lebed, S. Keunchkarian, F.R. González, C.B. Castells, Permethylated  $\beta$ -Cyclodextrin in Liquid Poly(Oxyethylene) as a Stationary Phase for Capillary Gas Chromatography, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6844–6851.
- [10] P.J. Lebed, S. Keunchkarian, J. Osorio Grisales, C.B. Castells, Measurements of Association Constants Between Enantiomers and Chiral Selectors by Capillary Gas Chromatography. Theoretical and Practical Considerations, *J. Chromatogr. A* 1324 (2014) 198–206.
- [11] A. Dietrich, B. Maas, A. Mosandl, Diluted Modified Cyclodextrins as Chiral Stationary phases: Influence of the Polysiloxane Solvent on Enantioselectivity and Column Efficiency, *J. Microcolumn Sep.* 6 (1994) 33–42.
- [12] J.A. Yancey, Liquid Phases Used in Packed Gas Chromatographic Columns. Part III . McReynolds' Constants, Preferred Liquid Phases, and General Precautions, *J. Chromatogr. Sci.* 24 (1986) 117–124.
- [13] D. Schmalzing, M. Jung, S. Mayer, J. Rickert, V. Schurig, Extending the Scope of Enantiomer Separations on Chirasil-Dex by GLC: Comparison with Permethylated  $\beta$ -Cyclodextrin Dissolved in OV-1701, *J. High Resolut. Chromatogr.* 15 (1992) 723–729.
- [14] K. Weber, R. Kreuzig, M. Bahadir, On Enantioselective Separation of

- Phenoxypropionates Using Permethyated- $\beta$ -Cyclodextrin HPLC and GC Columns, *Chemosphere* 35 (1997) 13–20.
- [15] F. Sánchez-Rasero, M.B. Matallo, G. Dios, E. Romero, A. Pena, Simultaneous Determination and Enantiomeric Resolution of Mecoprop and Dichlorprop in Soil Samples by High-Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography – Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A* 799 (1998) 355–360.
- [16] M.D. Müller, H.R. Buser, Conversion Reactions of Various Phenoxyalkanoic Acid Herbicides in Soil. 1. Enantiomerization and Enantioselective Degradation of The Chiral 2-Phenoxypropionic Acid Herbicides, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 1953–1959.
- [17] H.R. Buser, M.D. Müller, Conversion Reactions of Various Phenoxyalkanoic Acid Herbicides in Soil. 2. Elucidation of the Enantiomerization Process of Chiral Phenoxy Acids from Incubation in a D<sub>2</sub>O/Soil System, *Environ. Sci. Technol.* 31 (1997) 1960–1967.
- [18] C. Zipper, C. Bolliger, T. Fleischmann, M.J.F. Suter, W. Angst, M.D. Müller, H.P.E. Kohler, Fate of the Herbicides Mecoprop, Dichlorprop, and 2,4-D in Aerobic and Anaerobic Sewage Sludge as Determined by Laboratory Batch Studies and Enantiomer-Specific Analysis, *Biodegradation* 10 (1999) 271–278.
- [19] C. Zipper, M.J. Suter, M. Gruhl, H.E. Kohler, Changes in the Enantiomeric Ratio of (R)- to (S)-Mecoprop Indicate in Situ Biodegradation of This Chiral Herbicide in a Polluted Aquifer, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 2070–2076.
- [20] H.-R. Buser, M.D. Müller, T. Poiger, M.E. Balmer, Environmental Behavior of the Chiral Acetamide Pesticide Metalaxyl: Enantioselective Degradation and Chiral Stability in Soil, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 221–226.
- [21] I.J. Buerge, T. Poiger, M.D. Müller, H.R. Buser, Enantioselective Degradation of Metalaxyl in Soils: Chiral Preference Changes with Soil pH, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 2668–2674.
- [22] T. Poiger, M.D. Müller, H.R. Buser, I.J. Buerge, Environmental Behavior of the Chiral Herbicide Haloxyfop. 1. Rapid and Preferential Interconversion of the Enantiomers in Soil, *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 2583–2590.
- [23] I.J. Buerge, A. Bächli, W.E. Heller, M. Keller, T. Poiger, Environmental Behavior of the Chiral Herbicide Haloxyfop. 2. Unchanged Enantiomer Composition in Blackgrass (*Alopecurus Myosuroides*) and Garden Cress (*Lepidium Sativum*), *J. Agric. Food Chem.* 63 (2015) 2591–2596.

# Capítulo 5

---

Estudio de la extracción y degradación del  
funguicida Metalaxil en suelos

## 5.1. Objetivo

El objetivo del trabajo que se discute en el presente capítulo fue desarrollar un método analítico relativamente simple y rápido para la extracción y análisis del pesticida metalaxil y su metabolito principal, el metalaxil ácido, desde suelo, seguido del análisis enantiomérico por CG/MS. Para ello se ha utilizado una doble extracción asistida con microondas empleando una mezcla de solventes metanol:agua.

Se han optimizado los diferentes parámetros que afectan a la eficiencia del proceso de extracción de estos pesticidas: tiempo de extracción en el microondas, potencia de la radiación, composición de la mezcla de solventes y pH. La optimización de estos parámetros se ha llevado a cabo mediante la utilización de un diseño experimental  $2^k$ .

Por último, se estudió la degradación del metalaxil aplicado como racemato respecto de la degradación correspondiente al R-metalaxil, en suelos colectados de la región gran La Plata.

## 5.2. Introducción

El Metalaxil es un importante fungicida quiral, perteneciente al grupo de las fenilamidas, ampliamente utilizado en el control de enfermedades de plantas causadas por los patógenos de la familia Oomycota en varios cultivos [1]. Inicialmente se lo comercializó como el producto racémico, aunque se ha demostrado que la actividad fungicida del metalaxil se origina principalmente en el enantiómero R [2], que es aproximadamente 1000 veces más activo que el enantiómero S [1]. Actualmente se lo comercializa como mezcla racémica y además como enantiómero puro (*R*-Metalaxil). El metalaxil es químicamente estable, pero se biodegrada en plantas, suelos y animales, en una primera etapa al ácido carboxílico (metalaxil ácido), el cual también presenta quiralidad [3].

La separación enantiomérica y el análisis del metalaxil ha sido realizado por diferentes técnicas, como CE [4,5], HPLC [6-9] y CG [3,7,10-12], en la mayoría de los casos con detección por espectrometría de masas (MS).

La determinación simultánea de metalaxil y metalaxil ácido, desde muestras de suelo requiere una preparación de muestra previo al análisis de CG. La misma consiste en extraer ambos analitos del suelo y, debido a la naturaleza química del metalaxil ácido, se hace necesaria una etapa de derivatización del mismo. La interacción de los pesticidas con una matriz de suelo es generalmente más intensa que la que se observa en matriz agua o alimentos [14]. Por lo tanto, se requiere ensayar y comparar diferentes procedimientos de extracción.

Los métodos convencionales de extracción de pesticidas desde muestras complejas requieren, por lo general, un tiempo largo y el empleo de un elevado volumen de disolventes orgánicos para obtener una buena eficiencia del proceso. Una técnica bien establecida y comprobada como exhaustiva es la extracción Soxhlet. Sin embargo, en los últimos años ha sido reemplazada por técnicas más rápidas, con menos consumo de solventes y a menudo automatizadas, las que incluyen solo uno o más ciclos de extracción. Algunos ejemplos son la extracción asistida con ultrasonido [15], la extracción de fluido supercrítico [16], y la extracción asistida por microondas [17-19]. Desde que se introdujo la extracción asistida por microondas en 1986 [20], numerosas aplicaciones han informado sobre el uso de radiación de microondas para ayudar a la extracción de compuestos orgánicos a partir de matrices sólidas. Las ventajas que presenta esta técnica es que permite variar y controlar el tiempo y la potencia del horno microondas, así como realizar varias extracciones simultáneamente. Debido a que la eficiencia de esta extracción depende de varios factores experimentales simultáneamente, la influencia

de estos factores en forma combinada debe ser estudiada y, para ello, lo más conveniente es la utilización de los diseños de experimentos.

### **5.2.1 Diseño de experimentos**

El diseño de experimentos consiste en planear y realizar un conjunto de pruebas con el objetivo de generar datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteados por el experimentador sobre determinada situación [21].

La optimización de los métodos analíticos utilizando los diseños experimentales resulta una buena alternativa a la metodología clásica, representada por el proceso paso a paso, donde se estudia una variable por vez. El método clásico tiene la desventaja de que se requiere un gran número de experimentos, mayores cantidades de reactivos y tiempo para realizarse y, además, las interacciones entre variables no son consideradas, donde se entiende por interacción cuando uno de los factores no produce el mismo efecto en la respuesta con niveles diferentes de otro factor.

En primera instancia se debe identificar el proceso a analizar, junto con la respuesta de interés. Luego se seleccionan los factores y los niveles. Posteriormente se debe seleccionar el diseño experimental adecuado. Dentro del análisis estadístico utilizado en el diseño de experimentos, se tiene el Análisis de Varianza (ANAVA), con el cual, se estiman los efectos de cada factor e interacción entre factores, además de las contribuciones porcentuales de cada factor e interacción en la respuesta del proceso estudiado [22]. Por último, se obtienen conclusiones de los resultados del experimento, las cuales aportan información relevante acerca del proceso e indican cómo ajustar los factores para conseguir el resultado deseado.

### **5.2.2 Diseño factorial**

Cuando se tienen varios factores, y se tiene el mismo interés sobre todos los factores lo más conveniente es la utilización de un diseño factorial. La utilización de dicho diseño, más rápido, económico y efectivo, permite la optimización simultánea de más de una variable. Los factores se hacen variar en conjunto en lugar de uno a la vez.

Por diseño factorial se entiende que en cada ensayo del experimento se investigan todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores [22]. Dentro de los diseños factoriales, el más importante es el diseño factorial  $2^k$  en donde puede haber  $n$  factores, pero cada uno de ellos solo cuenta con 2 niveles, el nivel alto (+1) y el bajo (-1), y en total se tiene  $2^k$  tratamientos o puntos de diseño. La matriz experimental comprende  $2^k$  filas y  $k$  columnas, que corresponden a los  $k$  factores en estudio. El efecto de un factor se define como el cambio en la respuesta producido por un cambio en el nivel del factor.

En la tabla de la matriz codificada para este diseño, el nivel alto se le asigna el código +1, mientras que al nivel bajo -1.

El efecto principal de un factor es igual a la respuesta promedio observada en el nivel alto de un factor, menos la respuesta promedio en el nivel bajo y el efecto de interacción ocurre cuando dos factores interactúan de manera significativa sobre la variable de respuesta, esto es, cuando el efecto de uno depende del nivel en que está el otro. Para determinar la variabilidad total de un proceso debido a cada factor que puede afectarlo, se utiliza el análisis de varianza (ANAVA).

## 5.3 Resultados y discusión

### 5.3.1 Enantiorresolución simultánea de metalaxil y metalaxil ácido

En el capítulo anterior se demostró que con la columna de PM- $\beta$ -CD (que es una de las columnas más utilizadas) el metalaxil no pudo ser resuelto, por este motivo se probaron otras alternativas, entre ellas, la utilización de la columna construida de 42.06% con Octakis(6-*O*-*tert*-butildimetilsilil-2,3-di-*O*-acetil)- $\gamma$ -ciclodextrina disuelta en OV-1701-vi cuyas propiedades se describieron en los capítulos 2 y 3. Se optimizó la separación del metalaxil y el metalaxil ácido, el cual fue previamente derivatizado a 2,2,2-trifluoroetil éster de metalaxil (según se indicó en el apartado 2.2.4.1 del capítulo 2 materiales y métodos).

En la Figura 5.2 se muestra el cromatograma de la separación en las condiciones óptimas donde se observa la excelente resolución obtenida para los 4 picos cromatográficos. Cabe destacar que se ha obtenido una enantioseparación a la línea de base para ambos pares enantioméricos, cuya resolución es superior a la reportada en la bibliografía [3,7,10].

El orden de elución fue primero el enantiómero R y segundo el S para ambos compuestos, eluyendo primero el derivado metalaxil-trifluoroetil. El programa de temperatura optimizado consistió en una temperatura inicial de 70°C durante 2 minutos, seguido de un aumento de temperatura a 2°C/min hasta 120°C, los analitos eluyeron a una temperatura de 120°C. Se utilizó el modo de inyección sin división de flujo por 2 minutos. Para identificar los compuestos se realizó el modo de escaneo ( $m/z=40-400$ ). Como era de esperar, los espectros de masa de R- y S-metalaxyl fueron idénticos, mostrando el ion molecular ( $M^{++}$ ) a  $m/z$  279; asimismo, los espectros de masa de R- y S- metalaxil-trifluoroetil fueron idénticos y el ión molecular ( $M^{++}$ ) obtenido a  $m/z$  347. Dichos espectros de masas se muestran en la Figura 5.3 A) y B) respectivamente, donde se observan algunos de los fragmentos característicos para ambos compuestos.

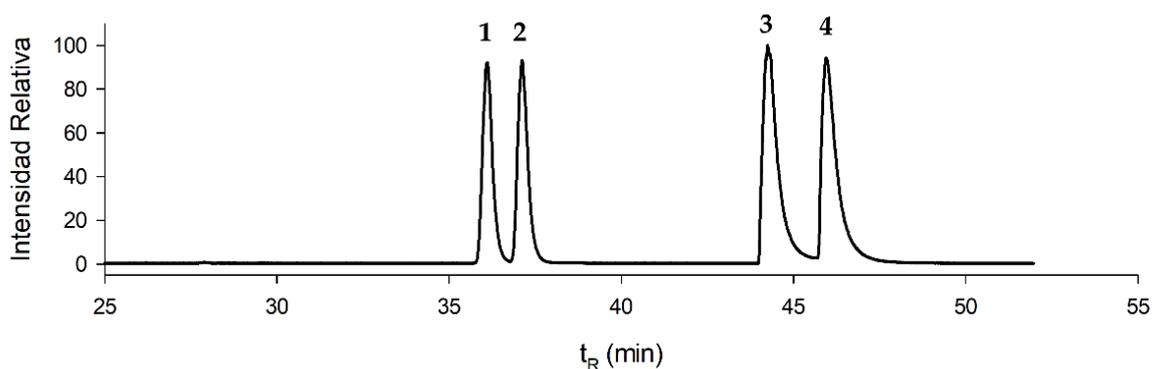


Figura 5.2. Cromatograma de 1) R-2,2,2 triluoroetil éster de Metalaxil 2) S- 2,2,2 triluoroetil éster de Metalaxil 3) R-Metalaxil 4) S-Metalaxil. Modo inyección: Sin división de flujo. Tiempo: 2 min. Temperatura inyector: 260°C, temperatura interfaz: 200°C. Flujo constante: 4ml/min. Programa de temperatura: 70°C por 2 min, aumento a 2°C/min hasta 120°C.

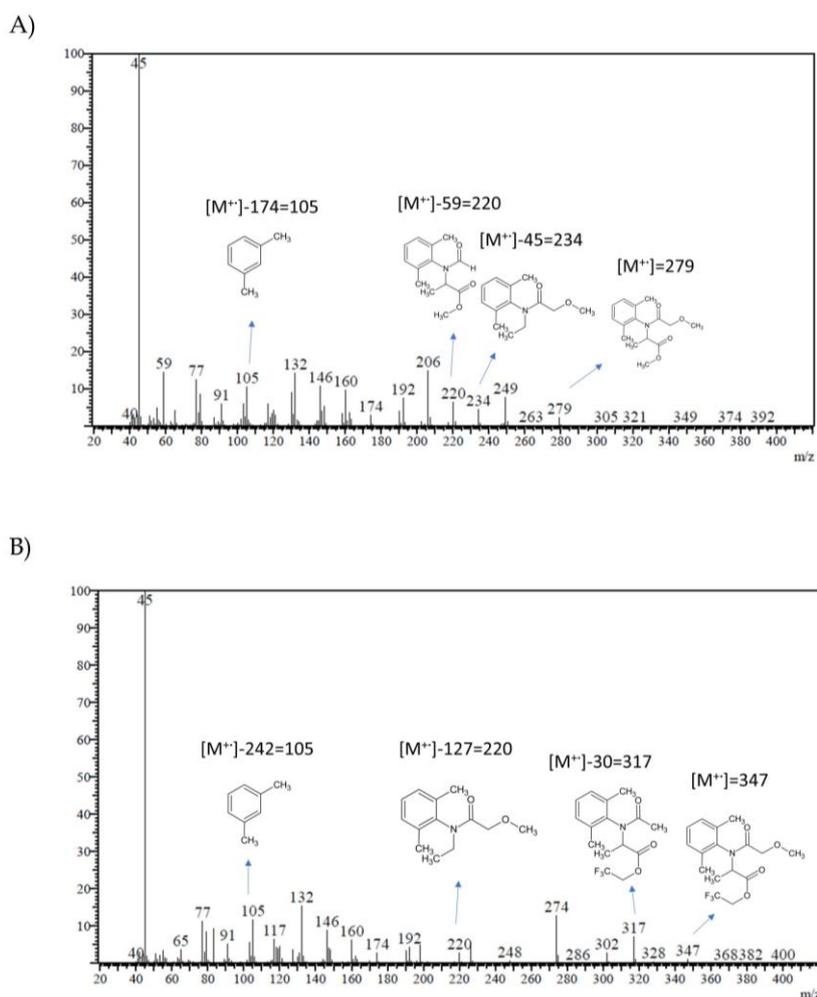


Figura 5.3. Espectros de masas para A) Metalaxil B) 2,2,2 triluoroetil éster de Metalaxil. En ambos espectros se indica la estructura de algunos iones característicos

Para determinar la cantidad de analitos se utilizó el modo de monitorización de iones seleccionados (SIM por sus siglas en inglés). Ambos compuestos producen fragmentos de iones de la misma masa exacta,  $m/z$  220, el cual fue utilizado para la cuantificación en los análisis SIM. Estos iones corresponden al ion  $M^{+\bullet} - 59$  ( $M^{+\bullet} - \text{COOCH}_3$ ) del metalaxil y al ion  $M^{+\bullet} - 127$  ( $M^{+\bullet} - \text{COOCH}_2\text{CF}_3$ ) del metalaxil-trifluoroetil, respectivamente.

### 5.3.2 Optimización de la extracción en suelos mediante un diseño $2^k$

Se realizó un estudio para evaluar los efectos que influyen en la extracción desde suelo del pesticida metalaxil y el metalaxil ácido. Para ello se diseñó un experimento factorial  $2^k$ . Los 4 factores que se utilizaron fueron: mezcla de solventes de extracción metanol:agua (70:30 y 50:50), pH (2 y 7), potencia del microondas (720 y 1500 W) y tiempo del microondas (10 y 60

min). Se realizaron 16 ensayos en forma aleatoria, con el objetivo de encontrar la mejor combinación de los niveles de los factores para la extracción de ambos compuestos. Por la sencillez del método, no se requiere un software especializado para construir la matriz de experimentos ni para el análisis de los resultados.

En la Tabla 5.1 se muestran las variables codificadas (unidades originales de las variables ver Anexo A.V).

Tabla 5.1. Variables codificadas.

	Composición	tiempo	potencia	pH
-1	70:30	10´	720	2
+1	50:50	60´	1500	7

Se estudió el efecto principal de cada factor, esto es, la variación promedio de la respuesta cuando cambia cada factor. A su vez, se calculó también el efecto de las interacciones. Los signos negativo y positivo para el efecto de interacción se obtienen al multiplicar los signos de los factores involucrados en interacción. El efecto de un factor expresa la variación de la respuesta causado por el cambio únicamente de un factor desde su nivel bajo (-) hasta el alto (+). En el Anexo A.VI se muestra la matriz del diseño codificado para los efectos principales y para las interacciones dobles, y en las últimas 2 columnas las áreas encontradas para cada analito en cada experimento. Debido al tiempo necesario para realizar cada experimento, no se realizaron replicados. Por este motivo, se decidió eliminar las interacciones superiores.

Luego de haber calculado los efectos, el primer paso para el análisis estadístico de los datos consistió en la realización del ANAVA para los resultados obtenidos para el metalaxil ácido, la cual es una herramienta útil para saber cuáles variables producen un efecto significativo y cuáles no, tal como se muestra en el Anexo A.VII. En primer lugar, es necesario analizar si los efectos de las interacciones son significativos. Al comparar el F experimental con el F de tabla (F crítico), se observa que los factores que influyen significativamente en la variable de respuesta son la composición del solvente y la interacción entre la composición de solvente y el pH (F experimental mayor que F crítico), mientras que para el resto no existe diferencia entre sus valores en cuanto a los niveles alto y bajo.

Se comienza entonces analizando la interacción entre el solvente y el pH. Es necesario evaluar para las 4 posibilidades cuál es la combinación que proporciona un mayor valor de respuesta de los analitos. Para esto se determina cuáles son las medias ( $\bar{y}_i$ ) que difieren al nivel

de significación  $\alpha=0.05$ , mediante un test LSD de comparación de medias. Para ello se plantean las siguientes hipótesis:

$$H_0: \bar{y}_i = \bar{y}_j$$

$$H_1: \bar{y}_i \neq \bar{y}_j$$

Para todo  $i$  distinto de  $j$

Entonces, si  $|\bar{y}_i - \bar{y}_j| \geq \Delta_{LSD}$  se rechaza  $H_0$ , es decir que, las medias difieren al nivel de significación  $\alpha(0.05)$ . El test LSD de comparación de medias se calcula según la siguiente ecuación:

$$\Delta_{LSD} = t(\alpha_{0.05}, \phi_{error}) s_{error} \sqrt{\frac{2}{n}} \quad (5.1)$$

donde  $S_{error}$  se calcula como:

$$s_{error} = \sqrt{CM} \quad (5.2)$$

Siendo  $n$  es el número de datos con el que se calculan las medias y  $CM$  es el cuadrado medio del error. Con lo cual, en este caso el valor de  $\Delta_{LSD}$  será: 3036.26. Se calcularon las medias de las 4 combinaciones (Tabla 5.2), y con letra superíndice se indican las medias que no difieren significativamente.

Tabla 5.2. Medias de las 4 combinaciones posibles entre composición del solvente y pH, para metalaxil ácido

Solvente	pH	
50:50	2	1989 <sup>a</sup>
50:50	7	2693 <sup>a</sup>
70:30	7	4589 <sup>a</sup>
70:30	2	8888 <sup>b</sup>

De la Tabla 5.2 se observa que la media de mayor valor para el metalaxil ácido es para la composición de solvente 70:30 y pH=2 y, además, es distinta a todas las demás. Debido a que para los otros dos factores las respuestas son indistintas según el nivel, se pueden fijar en los valores más convenientes, los cuales serán seleccionados según los resultados obtenidos para el metalaxil. Para ello, se realizó el ANAVA el cual se muestra en el Anexo A.VIII. Al comparar los  $F$  experimentales con los  $F$  de crítico, se observa que los factores que influyen

significativamente en la variable de respuesta son el pH y la interacción solvente por tiempo. El efecto del pH es positivo, esto indica que el valor más alto en la respuesta se obtiene a pH=7.

Para la interacción entra el solvente y el tiempo, se realizó nuevamente un test LSD de comparación de medias, para ver si las medias difieren al nivel de significación  $\alpha=0.05$  dando un valor de  $\Delta_{LSD}=13625$ . Se calcularon las medias de las 4 combinaciones (Tabla 5.3), donde nuevamente con letra superíndice se indican las medias que no difieren significativamente.

Tabla 5.3. Medias de las 4 combinaciones posibles para la interacción entre el solvente y el tiempo para metalaxil.

Solvente	tiempo	$\bar{y}_i$
50:50	60	17690 <sup>a</sup>
70:30	10	23431 <sup>a,b</sup>
50:50	10	25554 <sup>a,b</sup>
70:30	60	35143 <sup>b</sup>

Se observa que las respuestas más altas y estadísticamente iguales, se dan para las combinaciones solvente 70:30 y tiempo 60 min (35143); solvente 50:50 y tiempo 10 min (25554); solvente 70:30 y tiempo 10 min (23431). Esto da 3 opciones óptimas de composición y tiempo. Sin embargo, como el pH óptimo para el metalaxil da distinto al óptimo para el metalaxil ácido, se decidió analizar la interacción triple: composición del solvente, tiempo y pH, para el metalaxil, a partir de un test de comparación de medias LSD con  $\alpha 0.05$ . En la Tabla 5.4 se muestran las medias calculadas para las 8 combinaciones y con letra superíndice se indican las medias que no difieren significativamente. En este caso el test LSD arrojó un valor de 19269.

Tabla 5.4. Medias de las 8 combinaciones posibles para la interacción triple entre solvente, tiempo y pH para el metalaxil.

solvente	tiempo	pH	$\bar{y}_i$
50:50	60	2	11846 <sup>b</sup>
70:30	10	2	17191 <sup>b</sup>
50:50	10	2	19722 <sup>a,b</sup>
50:50	60	7	23535 <sup>a,b</sup>
70:30	60	2	29108 <sup>a,b</sup>
70:30	10	7	29671 <sup>a,b</sup>
50:50	10	7	31387 <sup>a,b</sup>
70:30	60	7	41177 <sup>a</sup>

Dado que, la única combinación triple con  $\text{pH}=2$ , que da entre los valores de mayor respuesta, es composición del solvente 70:30,  $\text{pH}=2$  y tiempo 60 min, fue la que se decidió usar para la siguiente etapa. Debido a que la potencia no era un factor significativo, se decidió arbitrariamente fijar su valor en 720 W.

### 5.3.3 Estudio de degradación

Con el objetivo de estudiar la degradación del metalaxil en suelos e investigar si la misma es enantioselectiva y la posible conversión de un enantiómero al otro, se realizaron experimentos de incubación de metalaxil racémico y del R-metalaxil, por separado. El estudio de degradación fue desarrollado durante 60 días en un suelo colectado de la región gran La Plata.

En la Figura 5.4, se muestran los cromatogramas en modo SIM ( $m/z=220$ ) para el metalaxil racémico después de 0, 26 y 60 días. Los cromatogramas indican que no existe una diferencia en la degradación de R-metalaxil y S-metalaxil, es decir, que la degradación del pesticida en estas muestras no resultó ser enantioselectiva, contradictoriamente a lo hallado en estudios previos de muestras de suelos de otro origen [3].

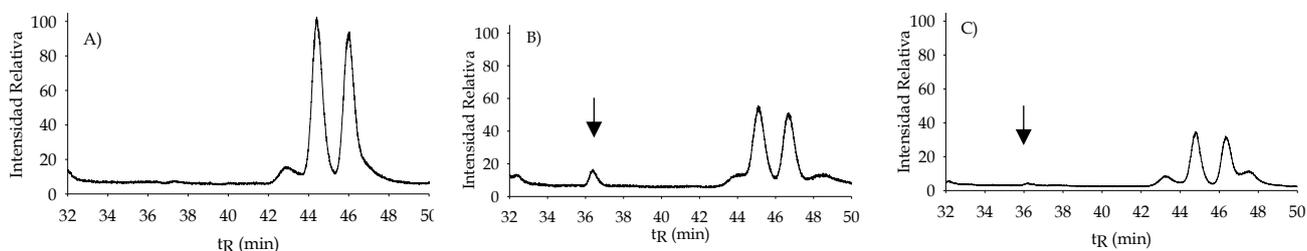


Figura 5.4. Cromatograma SIM  $m/z$  220 de Metalaxil para la incubación de metalaxil racémico en suelo. A) día 0; B) día 26; C) día 60. La flecha indica el pico del R-metalaxil-trifluoroetil

En la Figura 5.5, se muestran los cromatogramas para los experimentos de incubación del enantiómero R del metalaxil en suelo, para el día 0 y luego de 26 y 60 días de incubación, donde se puede ver que no hay presencia del enantiómero S del metalaxil.

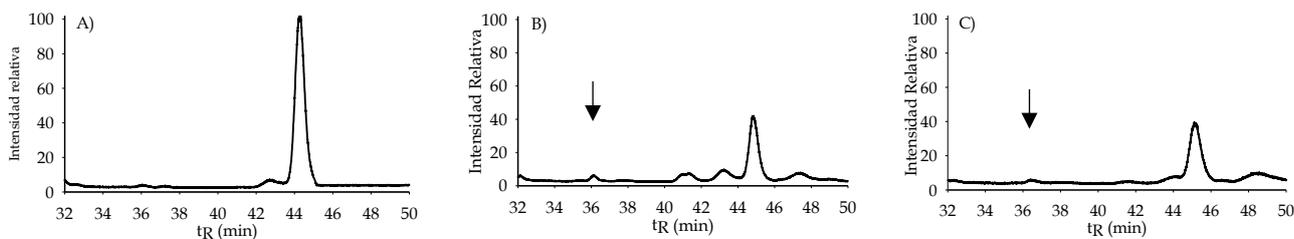


Figura 5.5. Cromatograma SIM  $m/z$  220 para la incubación de R-metalaxil en suelo. A) día 0; B) día 26; C) día 60. La flecha indica el pico del R-metalaxil-trifluoroetil

En la Figura 5.6 se graficaron las alturas normalizadas (relación de altura respecto a la altura inicial) en función de los días de incubación para el experimento de incubación de A) metalaxil racémico, y B) para la incubación de R-metalaxil. Se observaba la elevada persistencia del fungicida en este suelo, tanto en el experimento del metalaxil racémico como en el del R-metalaxil, ya que, 60 días después del tratamiento, aún queda un 15% de la cantidad inicial aplicada, con independencia de su forma enantiomérica.

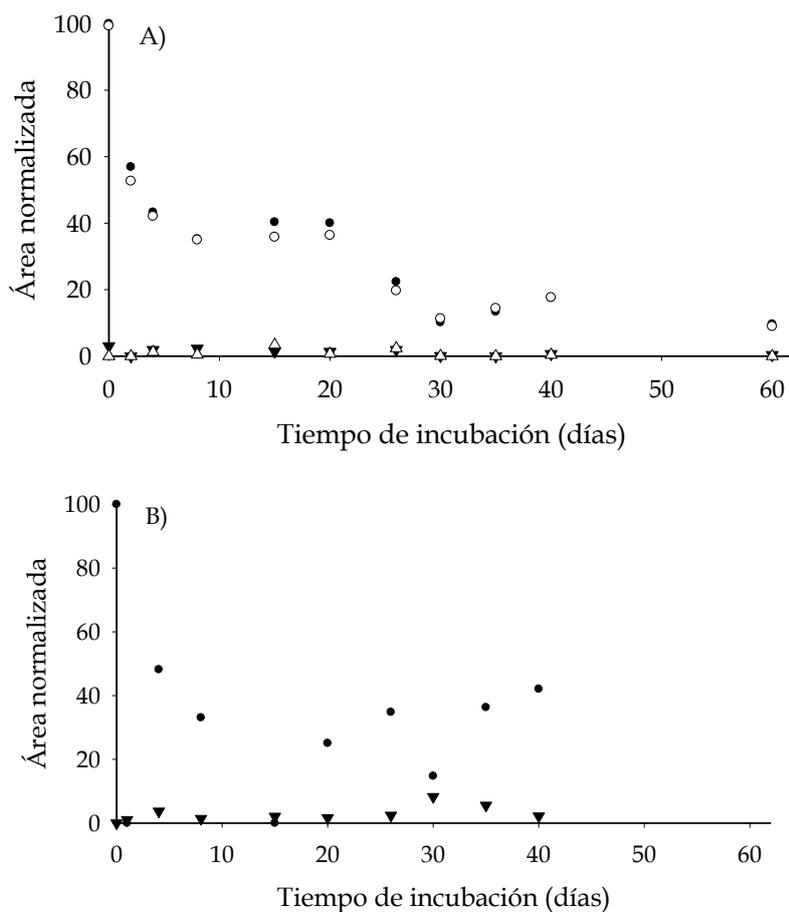


Figura 5.6. Gráfico de las alturas normalizadas (relación de altura respecto de la altura inicial) en función de los días de incubación para A) metalaxil racémico B) R-metalaxil. Símbolos (●) R-Metalaxil (○) S-Metalaxil (▼) R-Metalaxil-trifluoroetil (Δ) S-Metalaxil-trifluoroetil

En cuanto a la formación del metalaxil ácido (analizado como metalaxil-trifluoroetil) cuando se amplía el eje y de la Figura 5.6 para ambos experimentos, con el objetivo de determinar la tendencia del mismo (Figura 5.7), se observa la presencia del derivado trifluoroetil del ácido en ambos ensayos, pero con una gran dispersión de los resultados, haciendo difícil obtener una conclusión clara del comportamiento del metalaxil hacia la degradación de metalaxil ácido.

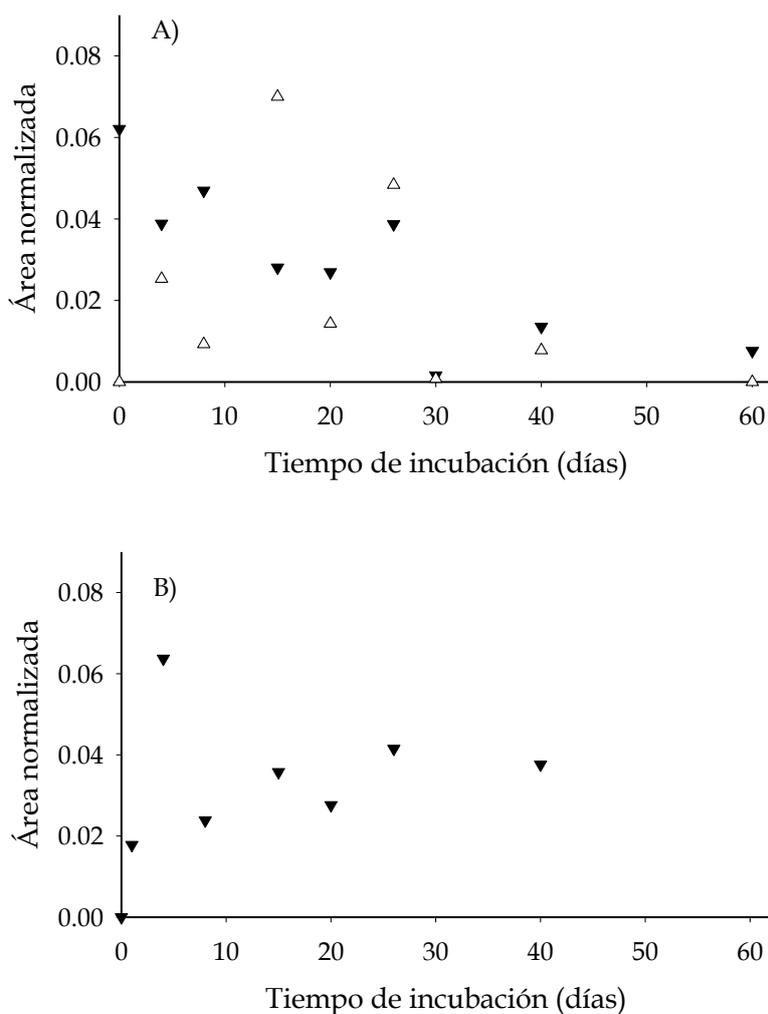


Figura 5.7. Gráfico de la Figura 5.6 ampliado en la zona del éster trifluoroetil del ácido del metalaxil para A) metalaxil racémico B) R-metalaxil. Símbolos (▼) R-Metalaxil-trifluoroetil (Δ) S-Metalaxil-trifluoroetil

## 5.4 Conclusiones parciales

En el presente estudio se optimizó la enantioseparación simultánea del metalaxil y del compuesto fluorado de metalaxil ácido obtenido por derivatización con anhídrido trifluoroacético y trifluoroetanol, utilizando una columna capilar quirál, conteniendo octakis(6-*O*-*tert*-butildimetilsilil-2,3-di-*O*-acetil)- $\gamma$ -ciclodextrina disuelto en OV-1701-vi. La enantiorresolución obtenida para ambos compuestos fue excelente y superior los resultados obtenidos de la bibliografía.

Se implementó un diseño de experimentos para optimizar la extracción de ambos compuestos desde una matriz compleja como es el suelo. La condición optimizada para la extracción fue: Composición de solvente 70:30 (MeOH:H<sub>2</sub>O); pH=2, tiempo 60 min; y como el factor potencia no influyó significativamente, se fijó arbitrariamente en 720 W.

En el estudio de la degradación del metalaxil en suelo colectado de la región gran La Plata, no se verificó degradación enantioselectiva del metalaxil, ni se observó isomerización cuando fue incubado el enantiómero R-metalaxil. Por otra parte, la hidrólisis del éster metílico del metalaxil hacia la formación del metalaxil ácido arrojó una gran dispersión en los resultados para ambos ensayos. Una posible explicación puede ser que la extracción del suelo no haya sido exhaustiva luego de un tiempo de contacto del pesticida con la matriz. Otra posible razón puede ser que la degradación continúe dando lugar a otros compuestos que no hayan sido detectados en el cromatograma siguiendo los fragmentos de masa esperados en el SIM.

## 5.5 Referencias

- [1] C. Zadra, C. Marucchini, A. Zazzerini, Behavior of Metalaxyl and Its Pure R-Enantiomer in Sunflower Plants (*Helianthus annuus*), *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 5373–5377.
- [2] N. Kurihara, J. Miyamoto, G.D. Paulson, B. Zeeh, M.W. Skidmore, R.M. Hollingworth, H.A. Kuiper, Pesticides Report. 37. Chirality in Synthetic Agrochemicals: Bioactivity and Safety Consideration (Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 69 (1997) 1335–1348.
- [3] H.-R. Buser, M.D. Müller, T. Poiger, M.E. Balmer, Environmental Behavior of the Chiral Acetamide Pesticide Metalaxyl: Enantioselective Degradation and Chiral Stability in Soil, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 221–226.
- [4] A. Santilio, M. D'Amato, L. Cataldi, A. Sorbo, R. Dommarco, Chiral Separation of Metalaxyl by Capillary Zone Electrophoresis Using Cyclodextrins, *J. Capill. Electrophor. Microchip Technol.* 9 (2006) 79–84.
- [5] V. Pérez-fernández, M.Á. García, M.L. Marina, Chiral Separation of Metalaxyl and Benalaxyl Fungicides by Electrokinetic Chromatography and Determination of Enantiomeric Impurities, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4877–4885.
- [6] C. Marucchini, C. Zadra, Stereoselective Degradation of Metalaxyl and Metalaxyl-M in Soil and Sunflower Plants, *Chirality* 14 (2002) 32–38.
- [7] H.R. Buser, M.D. Muller, Environmental Behavior of Acetamide Pesticide Stereoisomers. 1. Stereo and Enantioselective Determination Using Chiral High Resolution Gas Chromatography and Chiral High Performance Liquid Chromatography, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2023–2030.
- [8] J. Ge, L. Zhao, Y.-P. Shi, Preparation and Evaluation of a Novel Cellulose Tris(N-3,5-dimethylphenylcarbamate) Chiral Stationary Phase, *Chinese J. Chem.* 26 (2008) 139–142.
- [9] P. Wang, D. Liu, S. Jiang, X.U. Gu, Z. Zhou, The Direct Chiral Separations of Fungicide Enantiomers on Amylopectin Based Chiral Stationary Phase by HPLC, *Chirality* 19 (2007) 114–119.
- [10] M.D. Muller, H. Buser, Environmental Behavior of Acetamide Pesticide Stereoisomers. 2. Stereo and Enantioselective Degradation in Sewage Sludge and Soil, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2031–2037.
- [11] I.J. Buerge, T. Poiger, M.D. Müller, H.R. Buser, Enantioselective Degradation of Metalaxyl in Soils: Chiral Preference Changes with Soil pH, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 2668–2674.
- [12] C. Bicchi, G. Cravotto, A.D. Amato, P. Rubiolo, A. Galli, M. Galli, A. D'Amato, P. Rubiolo, A. Galli, M. Galli, Cyclodextrin Derivatives in Gas Chromatographic Separation of Racemates with Different Volatility. Part XV: 6-O-t-butyltrimethylsilyl- Versus 6-O-t-hexyltrimethylsilyl- $\beta$  and - $\gamma$  Derivatives, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 487–500.
- [13] L. He, T.E. Beesley, Applications of Enantiomeric Gas Chromatography: A Review, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 28 (2005) 1075–1114.
- [14] E. Macutkiewicz, M. Rompa, B. Zygmunt, Sample Preparation and Chromatographic Analysis of Acidic Herbicides in Soils and Sediments, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 33 (2003) 1–17.

- [15] N. Rosales-Conrado, M.E. León-González, L. V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Diez, Determination of Chlorophenoxy Acid Herbicides and their Esters in Soil by Capillary High Performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection, Using Large Volume Injection and Temperature Gradient, *Anal. Chim. Acta* 470 (2002) 147-154.
- [16] V. Lopez-Avila, N.S. Dodhiwala, W.F. Beckert, Developments in the Supercritical Fluid Extraction of Chlorophenoxy Acid Herbicides from Soil Samples, *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 2038-2044.
- [17] V. Camel, Microwave-Assisted Solvent Extraction of Environmental Samples, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 229-248.
- [18] E.A. Hogendoorn, R. Huls, E. Dijkman, R. Hoogerbrugge, Microwave Assisted Solvent Extraction and Coupled-Column Reversed-Phase Liquid Chromatography with UV Detection: Use of an Analytical Restricted-Access-Medium Column for the Efficient Multi-Residue Analysis of Acidic Pesticides in Soils, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 23-33.
- [19] J. Patsias, E.N. Papadakis, E. Papadopoulou-Mourkidou, Analysis of Phenoxyalkanoic Acid Herbicides and their Phenolic Conversion Products in Soil by Microwave Assisted Solvent Extraction and Subsequent Analysis of Extracts by On-line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography, *J. Chromatogr. A* 959 (2002) 153-161.
- [20] K. Ganzler, A. Salgó, K. Valkó, Microwave Extraction. A Novel Sample Preparation Method for Chromatography, *J. Chromatogr.* 371 (1986) 299-306.
- [21] H. Gutiérrez Pulido, R. De La Vara Salazar, *Análisis y Diseño de Experimentos*, McGRAW-HILL, México, 2008.
- [22] D.C. Montgomery, *Diseño y Análisis de Experimentos* (2a. ed.), Mexico: Limusa Wiley, 2005.

# Capítulo 6

---

Conclusiones generales

## 6.1 Conclusiones generales

En el presente trabajo de tesis se desarrollaron columnas capilares quirales conteniendo como fase estacionaria a los selectores heptakis(2,3,6-tri-O-metil)- $\beta$ -ciclodextrina, heptakis(6-O-*tert*-butildimetilsilil-2,3-di-O-acetil)- $\beta$ -ciclodextrina y octakis(6-O-*tert*-butildimetilsilil-2,3-di-O-acetil)- $\gamma$ -ciclodextrina, disueltos en distintas matrices aquirales. A partir de los resultados experimentales presentados, se puede concluir que:

- El método de construcción de columnas capilares para cromatografía gaseosa utilizado en el presente trabajo es relativamente rápido y por sobre todo permite autonomía en cuanto a disponibilidad de columnas diseñadas con diversas fases estacionarias. De esta forma, se puede contar con una amplia cantidad de columnas capilares que pueden ser usadas en el análisis enantiomérico de compuestos de diversa naturaleza química.
- Las columnas construidas han demostrado ser eficientes con una excelente capacidad de enantiorreconocimiento y resolución hacia compuestos de distinta naturaleza química, pudiendo reemplazar a las columnas comerciales a un bajo costo. Es importante remarcar que el costo estimativo de una columna de 30 metros de longitud, 250  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y un espesor de película de 0.25  $\mu\text{m}$ , construida en el laboratorio, conteniendo 40% de selector quiral disuelto en una matriz aquiral es de aproximadamente 200 dólares, donde el 90% del costo de la misma es debido al capilar de sílice fundida, mientras que una columna comercial de características geométricas similares y con el mismo selector quiral como fase estacionaria, tiene un costo de aproximadamente 1800 dólares. Además, debido a que no se fabrican en nuestro país, actualmente las columnas comerciales son importadas, sumando un costo adicional que no es despreciable.
- Se determinaron de forma exitosa las constantes de asociación absolutas enantiómero/selector a cada temperatura, y la verdadera enantioselectividad para aminoácidos derivatizados con anhídrido trifluoroacético en las columnas conteniendo como selector quiral octakis(6-O-*tert*-butildimetilsilil-2,3-di-O-acetil)- $\gamma$ -ciclodextrina. Ha quedado demostrada la importancia de la cromatografía gaseosa en la determinación de propiedades fisicoquímicas de sistemas complejos, de forma relativamente sencilla.
- Se compararon las constantes de asociación absolutas obtenidas a una dada temperatura con los valores obtenidos a partir del ampliamente difundido modelo de incremento de retención a la misma temperatura. Los resultados indicaron la existencia de interacción entre los solutos utilizados como sustancia de referencia y el selector quiral, lo cual produce variaciones en los cálculos del incremento de retención y, en consecuencia, se

produce un error en la enantioselectividad calculada como también en los cálculos de las propiedades termodinámicas del equilibrio de asociación.

- Se estudió el efecto en la enantioseparación obtenida al recubrir capilares utilizando diferentes matrices poliméricas quirales para disolver al selector quiral permetil- $\beta$ -ciclodextrina. Se resolvieron los ésteres de los pesticidas polares mecoprop, diclorprop, fenoprop, hidroprop, metalaxil, haloxifop y fenoxaprop de forma exitosa, usando una sola columna construida con una mezcla de PM- $\beta$ -CD (30% en peso) con SE-54. El uso de un polímero menos polar da como resultado columnas con mayor capacidad de discriminación hacia los racematos polares.

# Anexos

---

## A.I- Lista de símbolos

$X$ ; soluto

$X_i$ ; enantiómero  $i$

$X^*$ ; sustancia de referencia

$a_{X(l)}$ ;  $a_{X(g)}$ ; actividad del soluto  $X$  en la fase líquida y la fase vapor, respectivamente

$a_{X_i(l)}$ ; actividad del enantiómero  $i$  en la fase líquida formada por el selector quiral disuelto en el solvente aquiral

$a_s$ ; actividad del selector en la fase estacionaria

$a_{sX_i(l)}$ ; actividad del complejo (1:1) formado entre el enantiómero  $X_i$  y el selector quiral  $S$

$C_l$  y  $C_g$ ; concentraciones del soluto  $X$  en la fase líquida y la fase vapor, respectivamente

$m_s$ ; concentración molal del selector quiral en el solvente

$n_{X,g}$  los moles de soluto en la fase vapor

$n_{X,l}$ ; moles de soluto en fase líquida

$N_l$ ; son los moles de fase estacionaria

$x_X$ ; fracción molar del soluto en la fase líquida

$V_g$ ; volumen de la fase vapor

$v_L$ ; volumen molar de la fase líquida

$v_{L+S}$ ; "volumen molar" de la fase líquida

$R$ ; constante general de los gases

$T$ ; temperatura absoluta

$T_{ISO}$ ; temperatura de isoelución

$P$ ; presión parcial del soluto en el equilibrio

$P_X^0$ ; presión de vapor del soluto puro a la temperatura de la columna

$\gamma_X^\infty$ ; coeficiente de actividad del soluto infinitamente diluido en el solvente sin selector quiral

$\gamma_s$ ; coeficiente de actividad del selector quiral

$\gamma_{X_i+S}^\infty$ ; coeficiente de actividad a dilución infinita para el enantiómero  $X_i$  en la mezcla líquida conteniendo el selector quiral

$R'$ ; incremento de retención

$R'_L$ ;  $R'_D$ ; incremento de retención del primer y segundo enantiómero respectivamente

$r$ ;  $r^0$ ; retención neta relativa de un soluto (enantiómero  $X_i$ ) respecto de una sustancia de referencia ( $X^*$ ), en una columna quiral y en una columna aquiral, respectivamente

$r_L$ ;  $r_D$ ; retención neta relativa a la sustancia de referencia ( $X^*$ ) de los enantiómeros ( $L$  y  $D$ ) respectivamente

$k$ ;  $k^0$ ; factor de retención del soluto en la columna quiral y la aquiral, respectivamente

$k^*$ ;  $k^{0*}$ ; factores de retención de la sustancia de referencia en la columna quiral y la aquiral, respectivamente

$k_D$ ;  $k_L$ ; factores de retención cromatográficos del primer y segundo enantiómero respectivamente

$k_D^e$ ;  $k_L^e$ ; contribución enantioselectiva al factor de retención del primer y segundo enantiómero respectivamente

$t_R'$ ;  $t_R'^*$ ; tiempo de retención ajustado del analito y del soluto de referencia  $X^*$  en la columna quiral, respectivamente

$t_R^0$ ;  $t_R^{0*}$  tiempo de retención ajustado del analito y de la sustancia de referencia en la columna aquiral, respectivamente

$\beta^0$ ; relación de fases de la columna de una columna conteniendo solvente puro (sin selector quiral)

$\beta$ ; relación de fases de la columna conteniendo el selector quiral S a la concentración  $m_s$

$K_L^0$ ; constante del equilibrio de partición del soluto X entre la fase líquida y vapor

$K_{L,x_i}^0$ ; constante de distribución del enantiómero  $X_i$  entre la fase vapor y la fase líquida

$K_L^{*,0}$ ; combinación entre  $K_L^0$  con la relación de los coeficientes de actividad del soluto en el solvente puro respecto del mismo en la solución selector quiral/solvente y la relación de los volúmenes molares

$K_{Sx_D}$ ;  $K_{Sx_L}$ ; constantes de asociación absolutas del complejo formado entre los enantiómeros (D y L) en el solvente aquiral.

$K_{ap,x_i}$ ; constante de equilibrio aparente del enantiómero  $x_i$  entre la fase líquida y vapor

$K_{ap}$ ; constante de equilibrio aparente para los n-alcanos

$\alpha_{D/L}$ ; factor de enantioselectividad absoluto

$\alpha_{D/L}^*$ ; factor de enantioselectividad absoluto según el modelo de incremento de retención

$\alpha_{ap}$  factor de enantioseparación aparente

$\Delta G_{Sx_i}^0$ ;  $\Delta G_{Sx_L}^0$ ;  $\Delta G_{Sx_D}^0$  cambio en la energía libre estándar de Gibbs para el proceso de formación del complejo entre enantiómero y selector quiral (los subíndices L y D corresponden al primer y segundo enantiómero, respectivamente)

$\Delta H_{Sx_i}^0$ ;  $\Delta H_{Sx_L}^0$ ;  $\Delta H_{Sx_D}^0$ ; cambio de entalpía molares parciales debidos al proceso de asociación entre el enantiómero i y el selector quiral (los subíndices L y D corresponden al primer y segundo enantiómero, respectivamente)

$\Delta S_{Sx_i}^0$ ;  $\Delta S_{Sx_L}^0$ ;  $\Delta S_{Sx_D}^0$ ; cambio de entropía molares parciales debidos al proceso de asociación entre i y el selector quiral (los subíndices L y D corresponden al primer y segundo enantiómero, respectivamente)

$\Delta(\Delta H_{Sx_i}^0)$ ;  $\Delta(\Delta S_{Sx_i}^0)$ ;  $\Delta(\Delta G_{Sx_i}^0)$ ; diferencias en el cambio entalpía, entropía y energía libre de Gibbs, para la asociación de cada enantiómero con el selector quiral disueltos en el polisiloxano.

## A.II- Datos de la calibración del picnómetro utilizando n-tetradecano y n-hexadecano

Calibración con C14				Calibración con C16			
T(°C)	peso neto (g)	d (g/ml) C14	volumen (ml)	T(°C)	peso neto (g)	d (g/ml) C16	volumen (ml)
26	0.275	0.759	0.362	50.7	0.272	0.753	0.362
33.4	0.272	0.754	0.361	50.8	0.273	0.753	0.362
41.4	0.270	0.748	0.360	61	0.269	0.746	0.361
51.2	0.268	0.741	0.361	61	0.270	0.746	0.362
53.4	0.267	0.740	0.362	70.4	0.267	0.739	0.361
56.6	0.266	0.737	0.361	70.7	0.268	0.739	0.362
60.5	0.265	0.735	0.361	79.9	0.265	0.733	0.362
60.7	0.267	0.734	0.363	79.9	0.265	0.733	0.362
60.8	0.265	0.734	0.360	89.5	0.263	0.726	0.362
70.6	0.262	0.727	0.361	89.3	0.263	0.726	0.362
70.8	0.263	0.727	0.362	99.4	0.260	0.719	0.362
80.3	0.261	0.720	0.363	99.5	0.260	0.719	0.362
80.5	0.260	0.720	0.361	109.8	0.258	0.712	0.362
90.2	0.259	0.713	0.363	109.8	0.258	0.712	0.363
90.4	0.259	0.713	0.363	118	0.256	0.706	0.362
99.9	0.257	0.706	0.364	120	0.254	0.704	0.360
110.4	0.254	0.698	0.364	128.7	0.254	0.698	0.363
120.1	0.252	0.691	0.364	129.8	0.252	0.697	0.362
129.7	0.249	0.684	0.363	139.1	0.252	0.691	0.365
140	0.244	0.676	0.360				

**A.III- Factores de retención para el primer enantiómero eluído ( $k_L$ ), enantioselectividad aparente ( $\alpha_{ap}$ ) y factores de resolución ( $R_s$ ) para todos los derivados de aminoácidos en todas las columnas a las distintas temperaturas.**

	Alanina-O-Me-TFA												
	Columna 0	Columna 1			Columna 2			Columna 3			Columna 4		
T (°C)	k	$k_L$	$\alpha_{ap}$	$R_s$									
110	1.380	2.771	1.09	0.633				5.564	1.09	1.705	4.302	1.13	1.948
100	2.080	4.683	1.13	1.791	8.875	1.15	0.935	9.790	1.14	2.611	8.379	1.16	2.616
90	3.184	8.223	1.17	1.920	15.055	1.20	0.917	18.751	1.17	3.658	16.135	1.19	3.560
80	5.201	15.319	1.21	2.925	33.715	1.22	1.603	37.266	1.21	4.512	32.264	1.22	3.023
70	8.966	31.046	1.27	1.570	71.236	1.27	1.970	76.825	1.25	5.232	66.033	1.26	2.258

	Leucina-O-Me-TFA												
	Columna 0	Columna 1			Columna 2			Columna 3			Columna 4		
T (°C)	k	$k_L$	$\alpha_{ap}$	$R_s$									
110	4.543	6.483	1.06	1.331				9.259	1.14	0.362	6.028	1.21	3.993
100	7.474	10.904	1.10	2.131	17.918	1.28	2.417	16.306	1.19	3.807	11.469	1.28	5.487
90	12.494	19.164	1.14	2.635	32.115	1.18	1.496	30.673	1.26	5.026	21.716	1.37	7.517
80	22.471	35.531	1.20	2.931	65.409	1.26	2.269	60.142	1.34	6.355	43.997	1.47	8.129
70	42.382				135.932	1.34	2.934	121.877	1.45	7.254	94.388	1.60	10.036

	Aminobutírico-O-Me-TFA												
	Columna 0	Columna 1			Columna 2			Columna 3			Columna 4		
T (°C)	k	$k_L$	$\alpha_{ap}$	$R_s$									
130								2.225	1.06	0.597	1.721	1.07	0.872
120								3.685	1.07	1.070	2.642	1.09	1.302
110	3.616	3.423	1.06	0.781	5.514	1.30	1.717	6.035	1.09	1.705	4.404	1.11	2.084
100	5.755	5.703	1.08	0.991	11.465	1.22	1.426	10.785	1.11	2.355	8.444	1.13	2.225
90	9.271	9.747	1.11	1.115	21.649	1.19	1.244	20.739	1.13	2.646	16.135	1.15	2.649
80	15.923	17.940	1.14	1.160	42.370	1.16	1.048	41.117	1.15	3.121	33.219	1.17	2.884
70	29.515	36.095	1.17	1.245	89.134	1.14	0.901	84.727	1.18	3.448	70.887	1.19	3.014

	Isoleucina-O-Me-TFA												
	Columna 0	Columna 1			Columna 2			Columna 3			Columna 4		
T (°C)	k	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>
120								4.755	1.20	2.673	3.120	1.28	3.789
110	3.779	5.251	1.16	3.286	5.327	1.64	5.162	7.620	1.26	4.187	5.125	1.38	6.465
100	6.035	8.804	1.22	4.214	10.543	1.71	5.119	13.347	1.34	5.115	9.848	1.48	8.785
90	9.780	15.216	1.30	4.631	19.512	1.81	6.558	25.068	1.45	6.230	18.673	1.62	11.401
80	16.870	28.026	1.41	4.801	37.251	1.96	7.940	49.100	1.59	6.955	38.768	1.78	13.618
70	31.436	56.156	1.56	5.116	76.784	2.15	9.562	100.655	1.75	7.278	85.099	1.97	15.628

	Valina-O-Me-TFA												
	Columna 0	Columna 1			Columna 2			Columna 3			Columna 4		
T (°C)	k	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>
130	1.081	1.468	1.05	0.397				2.172	1.10	1.156	1.657	1.14	1.074
120	1.518	2.225	1.07	1.177				3.541	1.14	1.839	2.455	1.18	1.648
110	2.252	3.499	1.11	1.740	4.847	1.13	0.819	5.643	1.18	3.038	3.972	1.24	3.845
100	3.535	5.877	1.14	1.816	9.479	1.17	1.247	9.931	1.24	3.922	7.613	1.31	5.203
90	5.559	10.158	1.20	2.681	16.992	1.22	1.598	18.720	1.31	5.224	14.061	1.39	6.086

	Prolina-O-Me-TFA												
	Columna 0	Columna 1			Columna 2			Columna 3			Columna 4		
T (°C)	k	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>
130	3.708	5.526	1.14	4.121	8.686	1.17	1.451	9.358	1.24	4.485	7.394	1.33	5.811
120	5.495	9.302	1.21	3.885	14.550	1.26	2.243	16.634	1.33	5.914	12.505	1.44	7.270
110	8.487	15.685	1.30	3.611	22.554	1.35	2.556	29.192	1.45	6.999	22.881	1.58	8.999
100	13.894	28.393	1.42	3.556	47.598	1.48	3.491	56.331	1.59	8.050	48.004	1.73	9.407
90	22.673	54.314	1.58	4.194	92.060	1.64	3.926	117.625	1.77	9.847	99.189	1.92	10.114

	Norleucina-O-Me-TFA												
	Columna 0	Columna 1			Columna 2			Columna 3			Columna 4		
T (°C)	k	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>
120	3.406	4.793	1.04	0.860				6.926	1.09	1.633	4.390	1.13	1.724
110	5.508	7.735	1.07	1.694				11.260	1.12	2.563	7.240	1.18	3.532
100	14.938	13.426	1.10	2.462	21.747	1.12	1.103	20.038	1.16	3.410	13.990	1.23	4.690
90	15.322	23.774	1.12	2.523	40.789	1.16	1.601	38.115	1.21	4.369	25.904	1.29	5.990
80	27.012	45.376	1.18	3.738	78.392	1.21	1.897	75.227	1.28	5.616	54.570	1.38	7.928
70	52.453	91.883	1.25	4.007	163.224	1.27	2.300	154.280	1.35	6.419	115.775	1.47	8.521

	tert-leucina-O-Me-TFA												
	Columna 0	Columna 1			Columna 2			Columna 3			Columna 4		
T (°C)	k	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>
120	2.346							3.262	1.17	2.373	2.143	1.24	1.954
110	3.397							5.088	1.25	3.758	3.377	1.35	4.474
100	5.235	5.761	1.20	4.207	8.806	1.25	1.785	8.765	1.33	5.660	6.406	1.44	6.575
90	8.330				15.767	1.34	2.535	16.202	1.43	7.883	11.726	1.57	9.939
80	13.990	17.842	1.39	7.004	28.981	1.46	3.255	30.862	1.57	9.981	23.557	1.73	12.849
70	24.490	34.644	1.54	8.043	57.693	1.59	4.141	61.440	1.72	11.963	49.041	1.91	14.874

	Treonina-O-Me-TFA												
	Columna 0	Columna 1			Columna 2			Columna 3			Columna 4		
T (°C)	k	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>
130		4.330	1.13	1.732	7.482	1.14	0.702	9.114	1.15	1.526	8.765	1.15	2.507
120	2.076	8.698	1.17	1.514	15.188	1.18	0.962	20.583	1.18	2.025	18.913	1.17	3.201
110	3.198	18.448	1.21	13.376	29.784	1.22	0.278	47.903	1.20	0.866	43.861	1.19	3.190
100	5.271	45.056	1.24	1.498	82.582	1.24	1.564	124.077	1.22	3.597	115.525	1.20	2.852

	Aspártico-O-Me-TFA												
	Columna 0	Columna 1			Columna 2			Columna 3			Columna 4		
T (°C)	k	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>
130		8.657	1.25	3.364	14.792	1.27	2.025	15.458	1.33	1.847	14.634	1.40	4.257
120	6.447	16.121	1.32	2.467	28.165	1.36	2.390	33.109	1.40	2.330	30.564	1.47	5.812
110	10.232	31.903	1.40	1.948	52.668	1.44	2.440	75.201	1.48	3.316	68.482	1.53	5.278
100	17.665	74.103	1.46	2.242	138.255	1.51	2.896	194.218	1.53	5.799	174.828	1.59	4.811

	Serina-O-Me-TFA												
	Columna 0	Columna 1			Columna 2			Columna 3			Columna 4		
T (°C)	k	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>
130	5.646	6.511	1.30	2.261	12.483	1.44	2.567	14.238	1.53	7.418	11.101	1.58	3.568
120	8.787	12.932	1.44	5.780	25.659	1.54	3.632	31.840	1.62	9.854	24.303	1.66	7.463
110	14.412	27.592	1.55	4.082				64.692	1.72	4.668	54.835	1.75	7.353
100	25.688		1.65	3.568				159.491	1.78	3.609	141.429	1.82	6.723

	Metionina-O-Me-TFA												
	Columna 0	Columna 1			Columna 2			Columna 3			Columna 4		
T (°C)	k	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>
130	10.637	12.592	1.55	4.082	27.524	1.08	0.762	27.007	1.13	1.821	19.389	1.17	1.635
120	16.898	29.335	1.11	1.842	50.520	1.11	1.144	55.369	1.17	3.646	37.826	1.22	3.336
110	28.098	54.803	1.16	1.544				101.168	1.23	1.980	76.435	1.27	3.485
100	50.624							218.641	1.28	1.935	183.901	1.34	5.082

	Asparagina-O-Me-TFA												
	Columna 0	Columna 1			Columna 2			Columna 3			Columna 4		
T (°C)	k	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>
130		8.354	1.21	2.178	15.028	1.25	2.090	17.434	1.34	4.798	13.863	1.43	3.608
120	7.886	15.973	1.30	2.293	28.836	1.31	2.475	37.256	1.41	5.514	26.444	1.52	2.964
110	13.212	34.518	1.37	2.922	56.059	1.39	3.106	81.902	1.48	5.956	58.824	1.58	4.029
100	22.740	70.598	1.43	1.741	142.492	1.46	3.316	191.058	1.54	3.659	158.040	1.63	5.620

	Glutámico-O-Me-TFA												
	Columna 0	Columna 1			Columna 2			Columna 3			Columna 4		
T (°C)	k	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>	k <sub>L</sub>	α <sub>ap</sub>	R <sub>s</sub>
130	34.247				26.184	1.17	1.607	26.654	1.28	4.672	19.430	1.39	7.026
120	17.834	26.020	1.11	1.077	47.898	1.25	2.072	51.928	1.40	4.456	36.890	1.55	8.670
110	29.352	47.357	1.22	2.650	86.127	1.37	3.122	97.386	1.53	3.152	72.305	1.65	11.244
100	54.171	93.192	1.40	9.055	201.447	1.50	3.022	160.998	1.59	1.262	188.635	1.97	11.058

**A. IV- Resultados de la regresión de Kap versus concentración molar del selector, constantes de asociación enantioméricas estimadas  $K_{SXL}$  y  $K_{SXD}$  y factores de enantioselectividad absoluto  $\alpha_{D/L}$ .**

Alanina-O-Me-TFA										
T (°C)	$(K^0_L \pm s(K^0_L)) \times 10^2$	Primer enantiómero eluido				Segundo enantiómero eluido				$\alpha_{D/L}$
		Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXL} \pm s(K_{SXL})$	Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXD} \pm s(K_{SXD})$	
110	$3.95 \pm 0.03$	$7.8 \pm 0.6$	$5 \pm 1$	0.98	$20 \pm 2$	$9.0 \pm 0.6$	$5 \pm 1$	0.98	$23 \pm 2$	1.150
100	$6.01 \pm 0.04$	$15.8 \pm 0.9$	$8 \pm 1$	0.99	$26 \pm 2$	$18 \pm 1$	$9 \pm 2$	0.99	$31 \pm 2$	1.192
90	$9.28 \pm 0.06$	$32 \pm 2$	$13 \pm 3$	0.99	$34 \pm 2$	$38 \pm 2$	$15 \pm 3$	0.99	$41 \pm 2$	1.206
80	$15.3 \pm 0.1$	$64 \pm 5$	$26 \pm 7$	0.99	$42 \pm 3$	$79 \pm 6$	$31 \pm 9$	0.98	$52 \pm 4$	1.238
70	$26.6 \pm 0.2$	$133 \pm 11$	$54 \pm 17$	0.98	$50 \pm 4$	$169 \pm 15$	$65 \pm 23$	0.98	$64 \pm 6$	1.280

Leucina-O-Me-TFA										
T (°C)	$(K^0_L \pm s(K^0_L)) \times 10^2$	Primer enantiómero eluido				Segundo enantiómero eluido				$\alpha_{D/L}$
		Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXL} \pm s(K_{SXL})$	Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXD} \pm s(K_{SXD})$	
110	$13.02 \pm 0.09$	$8.3 \pm 0.9$	$16 \pm 1$	0.96	$6.4 \pm 0.7$	$11 \pm 1$	$16 \pm 2$	0.97	$8.4 \pm 0.8$	1.313
100	$21.6 \pm 0.2$	$17 \pm 2$	$27 \pm 3$	0.96	$7.8 \pm 0.9$	$23 \pm 2$	$28 \pm 3$	0.98	$11 \pm 1$	1.410
90	$36.4 \pm 0.3$	$34 \pm 4$	$47 \pm 6$	0.97	$9 \pm 1$	$51 \pm 4$	$48 \pm 6$	0.98	$14 \pm 1$	1.556
80	$66.0 \pm 0.5$	$72 \pm 8$	$88 \pm 13$	0.96	$11 \pm 1$	$116 \pm 10$	$93 \pm 16$	0.98	$18 \pm 2$	1.636
70	$125.6 \pm 0.9$	$159 \pm 18$	$173 \pm 27$	0.96	$13 \pm 1$	$281 \pm 22$	$186 \pm 35$	0.98	$22 \pm 2$	1.692

Aminobutírico-O-Me-TFA										
T (°C)	$(K^0_L \pm s(K^0_L)) \times 10^2$	Primer enantiómero eluido				Segundo enantiómero eluido				$\alpha_{D/L}$
		Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXL} \pm s(K_{SXL})$	Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXD} \pm s(K_{SXD})$	
110	$10.36 \pm 0.07$	$6.5 \pm 0.5$	$9.4 \pm 0.8$	0.98	$6.3 \pm 0.5$	$7.3 \pm 0.7$	$10 \pm 1$	0.98	$7.2 \pm 0.6$	1.143
100	$16.6 \pm 0.1$	$13 \pm 1$	$16 \pm 2$	0.98	$8.1 \pm 0.6$	$15 \pm 2$	$17 \pm 3$	0.99	$9 \pm 1$	1.111
90	$27.0 \pm 0.2$	$27 \pm 2$	$27 \pm 4$	0.98	$10.1 \pm 0.9$	$32 \pm 3$	$30 \pm 5$	0.99	$12 \pm 1$	1.188
80	$46.8 \pm 0.3$	$59 \pm 5$	$49 \pm 8$	0.98	$13 \pm 1$	$70 \pm 6$	$52 \pm 10$	0.99	$15 \pm 1$	1.154
70	$87.4 \pm 0.6$	$129 \pm 11$	$95 \pm 17$	0.98	$15 \pm 1$	$158 \pm 12$	$101 \pm 19$	0.99	$18 \pm 1$	1.2

Isoleucina-O-Me-TFA										
T (°C)	$(K^0_L \pm s(K^0_L)) \times 10^2$	Primer enantiómero eluído				Segundo enantiómero eluído				$\alpha_{D/L}$
		Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXL} \pm s(K_{SXL})$	Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXD} \pm s(K_{SXD})$	
110	10.83 ± 0.08	7 ± 1	11 ± 2	0.92	7 ± 1	11 ± 0.9	13 ± 1	0.98	10.3 ± 0.8	1.471
100	17.4 ± 0.1	15 ± 1	19 ± 2	0.97	8.6 ± 0.8	25 ± 2	22 ± 2	0.99	14.2 ± 0.9	1.651
90	28.5 ± 0.2	31 ± 3	32 ± 4	0.98	10.6 ± 0.9	55 ± 4	39 ± 6	0.99	19 ± 1	1.792
80	49.6 ± 0.4	68 ± 5	55 ± 8	0.98	13 ± 1	131 ± 7	70 ± 10	0.99	26 ± 1	2.000
70	93.1 ± 0.7	157 ± 9	101 ± 15	0.99	16 ± 1	330 ± 14	136 ± 21	0.99	35 ± 1	2.188

Valina-O-Me-TFA										
T (°C)	$K^0_L \pm s(K^0_L) \times 10^2$	Primer enantiómero eluído				Segundo enantiómero eluído				$\alpha_{D/L}$
		Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXL} \pm s(K_{SXL})$	Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXD} \pm s(K_{SXD})$	
130	3.05 ± 0.02	2.4 ± 0.1	3.4 ± 0.2	0.99	8.0 ± 0.4	3.0 ± 0.1	3.3 ± 0.2	1.00	9.7 ± 0.4	1.213
120	4.31 ± 0.03	3.7 ± 0.3	5.1 ± 0.5	0.98	8.6 ± 0.8	4.6 ± 0.4	5.3 ± 0.6	0.98	10.7 ± 0.9	1.244
110	6.46 ± 0.05	6.3 ± 0.6	7.7 ± 0.9	0.97	9.7 ± 0.9	8.2 ± 0.7	8 ± 1	0.98	13 ± 1	1.340
100	10.22 ± 0.07	12.7 ± 0.9	13 ± 1	0.99	12.4 ± 0.9	18 ± 1	13 ± 2	0.99	17 ± 1	1.371
90	16.2 ± 0.1	25 ± 2	22 ± 3	0.98	15 ± 1	36 ± 3	23 ± 4	0.98	22 ± 2	1.467

Prolina-O-Me-TFA										
T (°C)	$K^0_L \pm s(K^0_L) \times 10^2$	Primer enantiómero eluído				Segundo enantiómero eluído				$\alpha_{D/L}$
		Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXL} \pm s(K_{SXL})$	Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXD} \pm s(K_{SXD})$	
130	10.45 ± 0.07	12 ± 0.5	11.7 ± 0.8	0.99	11.5 ± 0.5	17 ± 0.6	12 ± 1	1.00	16.4 ± 0.6	1.426
120	15.6 ± 0.1	21 ± 2	19 ± 3	0.98	13 ± 1	33 ± 2	20 ± 3	0.99	21 ± 1	1.615
110	24.3 ± 0.2	41 ± 3	29 ± 5	0.98	17 ± 1	68 ± 4	31 ± 7	0.99	28 ± 2	1.647
100	40.2 ± 0.3	89 ± 4	50 ± 7	0.99	22 ± 1	164 ± 6	54 ± 9	1.00	41 ± 2	1.864
90	66.1 ± 0.5	191 ± 11	90 ± 18	0.99	29 ± 2	388 ± 19	102 ± 29	0.99	59 ± 3	2.034

Norleucina-O-Me-TFA										
T (°C)	$K^0_L \pm s(K^0_L) \times 10^2$	Primer enantiómero eluido				Segundo enantiómero eluido				$\alpha_{D/L}$
		Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXL} \pm s(K_{SXL})$	Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXD} \pm s(K_{SXD})$	
120	10.25 ± 0.07	6.1 ± 0.7	11 ± 1	0.96	5.9 ± 0.7	7.3 ± 0.8	11 ± 1	0.96	7.2 ± 0.8	1.220
110	15.8 ± 0.1	10 ± 1	17 ± 2	0.96	6.6 ± 0.8	13 ± 1	17 ± 2	0.97	8.4 ± 0.9	1.273
100	26.0 ± 0.2	21 ± 2	33 ± 4	0.96	7.9 ± 0.9	27 ± 3	34 ± 4	0.97	10 ± 1	1.266
90	44.7 ± 0.3	41 ± 5	59 ± 8	0.95	9 ± 1	58 ± 6	61 ± 9	0.97	13 ± 1	1.444
80	81.9 ± 0.6	89 ± 10	109 ± 15	0.97	11 ± 1	133 ± 11	115 ± 18	0.98	16 ± 1	1.455
70	155 ± 1	195 ± 21	215 ± 33	0.97	13 ± 1	311 ± 26	232 ± 40	0.98	20 ± 2	1.538

Treonina-O-Me-TFA										
T (°C)	$K^0_L \pm s(K^0_L) \times 10^2$	Primer enantiómero eluido				Segundo enantiómero eluido				$\alpha_{D/L}$
		Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXL} \pm s(K_{SXL})$	Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXD} \pm s(K_{SXD})$	
130	3.69 ± 0.03	16.9 ± 0.6	5.3 ± 0.9	1.00	46 ± 2	19.6 ± 0.7	6 ± 1	1.00	53 ± 2	1.152
120	5.90 ± 0.04	38 ± 2	10 ± 3	0.99	64 ± 3	44 ± 2	11 ± 4	0.99	75 ± 4	1.172
110	9.17 ± 0.06	90 ± 6	16 ± 9	0.99	98 ± 6	107 ± 7	29 ± 11	0.99	117 ± 8	1.194
100	15.2 ± 0.1	242 ± 13	37 ± 21	0.99	159 ± 9	289 ± 17	49 ± 27	0.99	190 ± 11	1.195

<i>tert</i> -leucina-O-Me-TFA										
T (°C)	$K^0_L \pm s(K^0_L) \times 10^2$	Primer enantiómero eluido				Segundo enantiómero eluido				$\alpha_{D/L}$
		Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXL} \pm s(K_{SXL})$	Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXD} \pm s(K_{SXD})$	
120	6.67 ± 0.05	2.40 ± 0.06	6.78 ± 0.09	1.00	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1	6.9 ± 0.2	1.00	5.2 ± 0.2	1.444
110	9.74 ± 0.07	4.1 ± 0.2	10.1 ± 0.3	1.00	4.2 ± 0.2	6.6 ± 0.3	10.3 ± 0.5	0.99	6.7 ± 0.3	1.595
100	15.1 ± 0.1	9.0 ± 0.2	15.3 ± 0.3	1.00	5.9 ± 0.1	15.0 ± 0.4	16.0 ± 0.7	1.00	9.9 ± 0.3	1.678
90	24.3 ± 0.2	17.5 ± 0.8	26 ± 1	0.99	7.2 ± 0.3	32 ± 2	28 ± 2	0.99	13.1 ± 0.6	1.819
80	41.1 ± 0.3	38 ± 2	44 ± 2	0.99	9.3 ± 0.4	75 ± 3	48 ± 5	0.99	18.3 ± 0.8	1.968
70	72.6 ± 0.6	84 ± 3	80 ± 5	1.00	11.6 ± 0.5	181 ± 7	89 ± 11	1.00	25 ± 1	2.155

Aspártico-O-Me-TFA										
T (°C)	$K^0_L \pm s(K^0_L) \times 10^2$	Primer enantiómero eluido				Segundo enantiómero eluido				$\alpha_{D/L}$
		Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXL} \pm s(K_{SXL})$	Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXD} \pm s(K_{SXD})$	
120	11.44 ± 0.08	26.4 ± 0.9	14 ± 1	1.00	23.1 ± 0.8	39 ± 1	15 ± 2	1.00	34 ± 1	1.472
110	18.3 ± 0.1	58 ± 2	24 ± 3	1.00	32 ± 1	88 ± 3	26 ± 4	1.00	48 ± 1	1.500
100	29.3 ± 0.2	136 ± 7	39 ± 11	0.99	46 ± 2	212 ± 10	44 ± 16	0.99	72 ± 4	1.565
90	51.1 ± 0.4	357 ± 20	86 ± 31	0.99	70 ± 4	579 ± 28	101 ± 44	0.99	113 ± 6	1.614

Serina-O-Me-TFA										
T (°C)	$K^0_L \pm s(K^0_L) \times 10^2$	Primer enantiómero eluido				Segundo enantiómero eluido				$\alpha_{D/L}$
		Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXL} \pm s(K_{SXL})$	Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXD} \pm s(K_{SXD})$	
120	15.9 ± 0.1	19 ± 1	16 ± 2	0.99	11.8 ± 0.8	32 ± 2	19 ± 3	0.99	20 ± 1	1.695
110	25.0 ± 0.2	44 ± 4	28 ± 6	0.98	18 ± 2	77 ± 7	36 ± 11	0.98	31 ± 3	1.722
100	41.3 ± 0.3	104 ± 5	50 ± 8	0.99	25 ± 1	189 ± 11	66 ± 18	0.99	46 ± 3	1.840
90	74.2 ± 0.5	278 ± 13	101 ± 20	0.99	38 ± 2	526 ± 27	129 ± 42	0.99	71 ± 4	1.868

Metionina-O-Me-TFA										
T (°C)	$K^0_L \pm s(K^0_L) \times 10^2$	Primer enantiómero eluido				Segundo enantiómero eluido				$\alpha_{D/L}$
		Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXL} \pm s(K_{SXL})$	Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXD} \pm s(K_{SXD})$	
130	30.0 ± 0.2	31 ± 4	34 ± 6	0.96	10 ± 1	36 ± 3	41 ± 5	0.97	12 ± 1	1.200
120	48.0 ± 0.3	62 ± 8	68 ± 12	0.95	13 ± 2	79 ± 9	70 ± 15	0.96	17 ± 2	1.308
110	80.5 ± 0.6	144 ± 17	76 ± 26	0.96	18 ± 2	190 ± 20	77 ± 31	0.97	24 ± 2	1.333
100	146 ± 1	366 ± 32	123 ± 50	0.98	25 ± 2	503 ± 40	119 ± 62	0.98	34 ± 3	1.360

Asparagina-O-Me-TFA										
T (°C)	$K^0_L \pm s(K^0_L) \times 10^2$	Primer enantiómero eluido				Segundo enantiómero eluido				$\alpha_{D/L}$
		Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXL} \pm s(K_{SXL})$	Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXD} \pm s(K_{SXD})$	
130	21.7 ± 0.2	23 ± 1	20 ± 2	0.99	10.6 ± 0.6	36 ± 2	20 ± 3	0.99	16.4 ± 0.8	1.547
120	37.1 ± 0.3	45 ± 5	39 ± 8	0.97	12 ± 1	74 ± 7	42 ± 11	0.98	20 ± 2	1.667
110	63.4 ± 0.4	107 ± 12	72 ± 19	0.96	17 ± 2	179 ± 18	81 ± 29	0.97	28 ± 3	1.647
100	104.9 ± 0.7	309 ± 21	125 ± 33	0.99	29 ± 2	522 ± 32	138 ± 49	0.99	50 ± 3	1.724

Glutámico-O-Me-TFA										
T (°C)	$K^0_L \pm s(K^0_L) \times 10^2$	Primer enantiómero eluido				Segundo enantiómero eluido				$\alpha_{D/L}$
		Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXL} \pm s(K_{SXL})$	Pendiente ( $\times 10^3$ )	Ordenada ( $\times 10^2$ )	R <sup>2</sup>	$K_{SXD} \pm s(K_{SXD})$	
130	$31.1 \pm 0.2$	$29 \pm 3$	$39 \pm 4$	0.98	$9.4 \pm 0.9$	$46 \pm 3$	$39 \pm 5$	0.99	$14.6 \pm 0.9$	1.553
120	$50.7 \pm 0.4$	$61 \pm 6$	$62 \pm 10$	0.97	$12 \pm 1$	$106 \pm 8$	$60 \pm 13$	0.98	$21 \pm 2$	1.750
110	$84.1 \pm 0.6$	$126 \pm 11$	$106 \pm 17$	0.98	$15 \pm 1$	$228 \pm 18$	$110 \pm 28$	0.98	$27 \pm 2$	1.800
100	$157 \pm 1$	$350 \pm 29$	$156 \pm 46$	0.98	$22 \pm 2$	$744 \pm 64$	$98 \pm 100$	0.98	$48 \pm 4$	2.182

## A.V- Unidades originales de las variables en el diseño 2<sup>k</sup>

N°	Factor			
	composición (MeOH:H <sub>2</sub> O)	Tiempo (min)	Potencia (W)	pH
1	70:30	10	720	2
2	70:30	10	720	7
3	70:30	10	1500	2
4	70:30	10	1500	7
5	70:30	60	720	2
6	70:30	60	720	7
7	70:30	60	1500	2
8	70:30	60	1500	7
9	50:50	10	720	2
10	50:50	10	720	7
11	50:50	10	1500	2
12	50:50	10	1500	7
13	50:50	60	720	2
14	50:50	60	720	7
15	50:50	60	1500	2
16	50:50	60	1500	7

### A.VI- Matriz del diseño codificado para los efectos principales y las interacciones dobles y las respuestas obtenidas

N°	Efecto principal				Interacción						Respuesta	
	Composición (MeOH:H <sub>2</sub> O)	Tiempo (min)	Potencia (W)	pH	Solvente x Tiempo	Solvente x Potencia	Solvente x pH	Tiempo x Potencia	Tiempo x pH	Potencia x pH	Área metalaxil ácido	Área metalaxil
1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	8313	16596
2	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	8397	32192
3	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	7874	17786
4	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	3736	27150
5	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	12164	34355
6	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	5202	50441
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	7200	23861
8	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	1022	31913
9	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	2449	18736
10	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	3441	38976
11	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	3751	20708
12	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	2903	23797
13	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	880	13076
14	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	1776	17417
15	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	874	10616
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	2650	29652

**A.VII- Tabla de ANAVA para el metalaxil ácido.**

Fuente de variación	Efectos	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F calculada	F crítico
<b>Efecto principal</b>						
Solvente	-4398	77369616	1	77369616	27.74	6.61
Tiempo	-1137	5171076	1	5171076	1.85	6.61
Potencia	-1577	9941409	1	9941409	3.56	6.61
pH	-1797	12920430	1	12920430	4.63	6.61
<b>Interacción de dos factores</b>						
Solvente x Tiempo	-454	824464	1	824464	0.30	6.61
Solvente x Potencia	1985	15752961	1	15752961	5.65	6.61
solvente x pH	2501	25025006	1	25025006	8.97	6.61
tiempo x Potencia	-493	970225	1	970225	0.35	6.61
tiempo x pH	-820	2687960	1	2687960	0.96	6.61
potencia x pH	-550	1208900	1	1208900	0.43	6.61
Error		13946766	5	2789353		
Total		165818814	15			

### A.VIII- Tabla de ANAVA para el metalaxil

Fuente de variación	Efectos	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F calculada	F crítico
<b>Efecto principal</b>						
Solvente	-7665	234978241	1	234978241	4.18	6.61
Tiempo	1924	14803256	1	14803256.3	0.26	6.61
Potencia	-4538	82382852	1	82382852.3	1.47	6.61
pH	11976	573650401	1	573650401	10.21	6.61
<b>Interacción de dos factores</b>						
Solvente x Tiempo	-9788	383200200	1	383200200	6.82	6.61
Solvente x Potencia	3680	54176960	1	54176960.3	0.96	6.61
Solvente x pH	-299	357604	1	357604	0.01	6.61
Tiempo x Potencia	-274	299209	1	299209	0.01	6.61
Tiempo x pH	-97	37442	1	37442.25	0.00	6.61
Potencia x pH	-2090	17476580	1	17476580.3	0.31	6.61
Error		280854872	5	56170974.3		
Total		1642217618	15			