



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Desarrollo de columnas monolíticas
quirales para HPLC capilar. Aplicación a la
determinación de contaminantes
emergentes***

Tesista: Ester Lubomirsky

Director: Mario Reta

Codirectora: Sonia Keunchkarian

Año: 2019

Agradecimientos

El presente trabajo de tesis no hubiera sido posible de no ser por la contribución de muchas personas a las que voy a estar eternamente agradecida.

En primer lugar, quiero reconocer a mis directores, Mario Reta y Sonia Keunchkarian, por sus aportes científicos, por su apoyo constante y todo el tiempo y paciencia que me dedicaron.

A Cecilia Castells, por abrirme las puertas del laboratorio.

A Fiorella, Romina, Carlina, Giselle, Agustín, Juan, Nicolás, Matías, Marcos, Damián, Emilia P., Leo, Lilian, Emilia F., Pampa, Simón, Pedro, Camila, Micaela, Sebastián, Gianina, Sol y Emilce, por hacer del LIDMA un grupo de amigos, por las incontables veces que me dieron una mano, por las charlas, consejos y risas.

A Darío Arrúa, por contribuir a mi formación y por hacer que en Australia me sintiera como en casa.

A Emily Hilder, por hacer posible que pueda realizar una estadía en Future Industries Institute, donde aprendí tanto. A Amin, Liang, Adam, Sarah, Neeraj, James, Giles y Ricardo, por hacerme sentir bienvenida y por su ayuda constante.

Y por último, pero no menos importante, a mi familia, que me apoyaron y acompañaron desde siempre, muchísimas gracias.

Índice

Glosario.....	1
1. Introducción general.....	2
1.1. Sistemas de HPLC tradicionales y miniaturizados: cromatografía rápida, eficiente y sustentable.....	3
1.2. Nuevos materiales para columnas rellenas en HPLC.....	5
1.2.1. Partículas sub-2 μ m.....	7
1.2.2. Partículas de núcleo sólido.....	8
1.2.3. Polímeros monolíticos.....	8
1.3. Quiralidad.....	12
1.4. Cromatografía quiral.....	13
1.4.1. Métodos indirectos.....	14
1.4.2. Métodos directos.....	14
1.4.2.1. Aditivos quirales en fase móvil.....	14
1.4.2.2. Fases estacionarias quirales.....	14
1.5. Contaminantes emergentes.....	17
1.6. Bibliografía.....	18
Objetivos.....	23
2. Monolito de sílice como soporte para columnas de cLC.....	25
2.1. Introducción.....	26
2.1.1. Hidrólisis.....	26
2.1.2. Formación del gel o gelificación.....	28
2.1.3. Envejecimiento o maduración.....	29

2.1.4. Secado.....	29
2.1.5. Calcinación.....	30
2.1.6. Modificación superficial.....	30
2.2. Parte experimental.....	34
2.2.1. Reactivos.....	34
2.2.2. Equipamiento.....	34
2.2.3. Síntesis de los monolitos de sílice.....	34
2.3. Resultados y discusión.....	37
2.3.1. Efecto del peso molecular del HPAA.....	37
2.3.2. Efecto de la cantidad de TEOS.....	38
2.3.3. Efecto de la cantidad de HPAA.....	39
2.3.4. Efecto de la adición de MTMS.....	40
2.3.5. Efecto de la temperatura de gelificación.....	42
2.3.6. Efecto del diámetro interno del capilar.....	46
2.4. Conclusiones parciales.....	46
2.5. Bibliografía.....	47
3. Monolito de poli(GMA-co-EDMA) como soporte para columnas de cLC.....	48
3.1. Introducción.....	49
3.1.1. Variables que afectan la estructura del monolito.....	50
3.1.2. Tratamientos para aumentar el área superficial.....	51
3.1.3. Post-funcionalización de monolitos fabricados con GMA.....	51
3.2. Parte experimental.....	54
3.2.1. Reactivos.....	54

3.2.2. Equipamiento.....	54
3.2.3. Síntesis del monolito de poli(GMA- <i>co</i> -EDMA).....	56
3.3. Resultados y discusión.....	59
3.3.1. Efecto de la composición de los solventes porogénicos.....	59
3.3.2. Efecto del tiempo de polimerización.....	61
3.3.3. Comparación de los monolitos desarrollados (orgánico vs. inorgánico).....	65
3.4. Conclusiones parciales.....	66
3.5. Bibliografía.....	67
4. Desarrollo de columnas monolíticas poliméricas quirales para cLC.....	69
4.1. Introducción.....	70
4.1.1. Estructura de la celulosa.....	70
4.1.2. Fases estacionarias de celulosa.....	71
4.2. Parte experimental.....	72
4.2.1. Reactivos.....	72
4.2.2. Equipamiento.....	73
4.2.3. Síntesis de bis-(3,5-dimetilfenil)carbamato de celulosa (bis-CDMPC).....	73
4.2.3.1. Purificación de los reactivos.....	73
4.2.3.2. Síntesis.....	74
4.2.4. Unión covalente de bis-CDMPC al monolito de poli(GMA- <i>co</i> -EDMA).....	75
4.2.5. Adsorción de bis-CDMPC al monolito de poli(GMA- <i>co</i> -EDMA).....	76
4.2.5.1. Modificación del monolito en medio básico con NH ₃	76
4.2.5.2. Modificación del monolito en medio ácido empleando H ₂ SO ₄	77
4.2.5.3. Depósito de bis-CDMPC.....	77

4.2.6. Pretratamiento de un comprimido comercial conteniendo propranolol....	78
4.2.7. Pretratamiento de las formulaciones comerciales conteniendo metalaxil.	78
4.3. Resultados y discusión.....	79
4.3.1. Caracterización de bis-CDMPC.....	79
4.3.2. Unión covalente de bis-CDMPC al monolito de poli(GMA- <i>co</i> -EDMA)..	82
4.3.3. Adsorción de bis-CDMPC sobre monolitos de poli(GMA- <i>co</i> -EDMA) modificados en medio ácido y básico.....	83
4.3.3.1. Modificación superficial del polímero monolítico empleando NH ₃	84
4.3.3.1.1. Influencia del uso de aditivos en la fase móvil y mecanismo de retención.....	85
4.3.3.2. Monolito modificado en medio ácido con H ₂ SO ₄	95
4.3.3.2.1. Influencia del uso de aditivos en la fase móvil.....	96
4.3.3.3. Efecto de memoria.....	97
4.3.3.4. Eficiencia.....	100
4.3.3.5. Reproducibilidad.....	102
4.3.3.6. Determinación de propranolol y metalaxil en muestras reales.....	105
4.4. Conclusiones parciales.....	107
4.5. Bibliografía.....	108
Conclusiones generales.....	111
Anexo: Técnicas de caracterización.....	113
A.1. Caracterización de materiales porosos.....	113
A.1.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	113
A.1.2. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno BET.....	115
A.1.3. Porosimetría de intrusión de mercurio (MIP).....	118

A.2. Caracterización de la fase estacionaria.....	119
A.2.1. Análisis elemental de CHNS.....	119
A.2.2. Espectometría infrarroja.....	120
A.3. Bibliografía.....	121

Glosario

BET: isoterma de Brunauer- Emmett- Teller

bis-CDMPC: bis-(3,5-dimetilfenil) carbamato de celulosa

cLC: cromatografía de líquidos capilar

CiOH: ciclohexanol

DDOH: dodecanol

DEA: dietilamina

DMAc: dimetilacetamida

EDMA: dimetacrilato de etilenglicol

FA: formamida

GMA: metacrilato de glicidilo

HAc: ácido acético

HCap: ácido caproico

hex: *n*-hexano

HFor: ácido fórmico

HPAA: ácido poliacrílico

HPLC: cromatografía de líquidos de alta performance

***i*-prOH:** isopropanol

LPO: peróxido de lauroilo

meOH: metanol

MIP: porosimetría de intrusión de mercurio

MTMS: metil(trimetoxi) silano

SEM: microscopía electrónica de barrido

TEOS: tetraetoxi silano

TFA: ácido trifluoroacético

tris-CDMPC: tris-(3,5-dimetilfenil) carbamato de celulosa

γ -MAPS: metacrilato de 3-(trimetoxisilil) propilo

1. Introducción general

1.1. Sistemas de HPLC tradicionales y miniaturizados: cromatografía rápida, eficiente y sustentable

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (o HPLC por las siglas en inglés) es una técnica ampliamente utilizada en química analítica tanto cuali- como cuantitativa. Como para cualquier técnica analítica, resulta un desafío constante optimizar la sensibilidad, eficiencia, robustez, resolución y tiempo de análisis para el desarrollo de métodos, debido a que existe una relación de compromiso entre dichos parámetros, por lo que en el transcurso del tiempo se han propuesto diferentes formas de abordar este desafío.

A fines de la década de 1960, Horvát y col.[1] desarrollaron columnas, denominadas “microbore”, de diámetros angostos (0,5mm), lo cual permitía tener una buena sensibilidad, ya que la dilución (D) que sufren los analitos en el proceso cromatográfico es proporcional al cuadrado del radio de la columna, como se observa en la **Ecuación 1.1**.

$$D = \frac{C_0}{C_{m\acute{a}x}} = \frac{\epsilon_t \pi r^2 (1+k) \sqrt{2\pi LH}}{v_{iny}} \quad (1.1)$$

En esta expresión, C_0 es la concentración inicial del analito, $C_{m\acute{a}x}$ la concentración en el máximo del pico cromatográfico, ϵ_t , r [cm] y L [cm], la porosidad total, el radio y largo de la columna, H [cm] la altura equivalente de plato teórico y v_{iny} [mL] el volumen de inyección.

Sin embargo, para lograr buenas eficiencias, las columnas microbore desarrolladas por Horvát y col. requerían una longitud de 1m, por lo que las condiciones operacionales quedaban restringidas a caudales muy bajos para que la presión del sistema no sea demasiado elevada, lo cual implicaba tiempos de análisis muy largos. La limitación más grande para este tipo de columnas, estaba dada por el equipamiento de esa época, el cual poseía volúmenes muertos grandes en relación al tamaño de la columna, generando una gran dispersión en los perfiles de distribución de los analitos.

A principios de la década de 1970, Majors y col.[1] desarrollaron columnas con un empaquetamiento eficiente de fases estacionarias microparticuladas, de dimensiones más apropiadas para los equipamientos de la época, dando lugar a las columnas

convencionales utilizadas hasta el día de hoy de 4,6mm de diámetro interno y 25cm de longitud.

A pesar de la gran versatilidad de las columnas particuladas, éstas poseen algunas limitaciones, el volumen muerto interpartícula, así como la fase móvil estanca en el interior de las partículas porosas aumentan la dispersión de los analitos, resultando en un ensanchamiento de los picos cromatográficos[2]. Por este motivo, han surgido nuevos materiales para soportes de columnas cromatográficas, tales como las partículas de diámetro menor a 2 μ m, las partículas de núcleo sólido y las columnas monolíticas. Una descripción más detallada de estos materiales se desarrolla en la Sección 1.2.

Las columnas monolíticas están formadas por lechos porosos continuos (monolitos) que han surgido para su uso en cromatografía de líquidos a fines de la década de 1980, cuando Hjertén y col. desarrollaron un monolito de poliacrilamida[3]. A principios de 1990, Svec y col. utilizaron una columna monolítica de polimetacrilato para cromatografía de líquidos en fase inversa[4] y en 1996, Tanaka y col. desarrollaron una columna monolítica de sílice, la cual también fue utilizada en HPLC en fase inversa[5].

Por otro lado, el desarrollo tecnológico de los equipos de HPLC ha dado lugar a nuevas alternativas al lograr miniaturizar los equipos comerciales[6], dando lugar a las escalas micro, capilar (cLC) y nano para cromatografía de líquidos, cuyas dimensiones, capacidad de carga de muestra y caudales típicos se muestran en la **Tabla 1.1**. De esta manera, no sólo se logran análisis sensibles, eficientes y rápidos, sino que se utilizan bajos volúmenes de solventes como fase móvil.

Tabla 1.1. Dimensiones, capacidad de carga y caudales típicos empleados en columnas para análisis de HPLC a escala micro, capilar y nano[6].

	Diámetro de la columna (mm)	Capacidad de carga (μg)	Caudal (μL/min)
micro-LC	2,1-0,5	50-500	10-300
cLC	0,5-0,15	1-50	1-15
nano-LC	< 0,15	< 1	< 1

La reducción de desechos nocivos para el ambiente es uno de los objetivos de la *Química verde*, término acuñado por Anastas y Warner en 1998[7]. El objetivo es

diseñar productos químicos y procesos más seguros, limpios y energéticamente eficientes que reduzcan o eliminen el uso o la generación de sustancias perjudiciales. La aplicación de la química verde (o química sustentable o eco-compatible) a la química analítica se puede definir como “el empleo de técnicas y metodologías analíticas que reducen o eliminan solventes, reactivos, conservantes y otros químicos que son peligrosos tanto para la salud humana como para el ambiente y que, por otro lado, generen análisis rápidos y eficientes sin comprometer el desempeño de los mismos”[8].

Así, una opción actual para cumplir con estos objetivos y que es el tema del presente trabajo de tesis, es el empleo de un sistema combinado de HPLC miniaturizado con columnas capilares monolíticas, que permita separaciones rápidas y eficientes tratando de cumplir los principios de la química verde.

1.2. Nuevos materiales para columnas rellenas en HPLC

En un proceso cromatográfico, los analitos sufren una serie de fenómenos que generan dispersión en sus perfiles de distribución, lo cual produce ensanchamiento o dispersión de los picos cromatográficos. El ancho de los picos en un cromatograma se debe principalmente a estos fenómenos de dispersión que ocurren dentro de la columna. En una columna rellena, existen tres factores que contribuyen a esta dispersión: la difusión de los analitos a lo largo de la columna (difusión longitudinal), la resistencia a la transferencia de masa tanto en la fase móvil como en la fase estacionaria y la multiplicidad de recorridos que puede atravesar el analito por la presencia de las partículas del relleno. El efecto de cada uno de estos fenómenos se encuentra reflejado en la ecuación de van Deemter[9]:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (1.2)$$

Donde H es la altura equivalente de plato teórico y los términos A , B y C reflejan la contribución por multiplicidad de recorridos, la difusión longitudinal y la resistencia a la transferencia de masa, respectivamente. Las expresiones matemáticas de los términos A , B y C de van Deemter se muestran en la **Tabla 1.2**. Como puede observarse, tanto partículas pequeñas como espesores de film delgados contribuirán a una mayor eficiencia en el análisis, dado que disminuirá H , que se relaciona con el ancho del pico cromatográfico de acuerdo a la **Ecuación 1.3**.

$$H = \frac{L}{5,54} \left(\frac{w_{1/2}}{t_r} \right)^2 \quad (1.3)$$

donde L es la longitud de la columna, t_r el tiempo de retención del analito y $w_{1/2}$ el ancho del pico a la mitad de su altura.

Tabla 1.2. Expresiones matemáticas de los términos de la ecuación de van Deemter.

Término	Origen	Expresión matemática
A	multiplicidad de recorridos	$A = 2\lambda d_p$
B	difusión longitudinal	$B = 2\gamma D_m + 2kD_s$
C	resistencia a la transferencia de masa	$C = \frac{2}{15} \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2}{D_s} + \frac{1+6k+11k^2}{24(1+k)^2} \frac{d_p^2}{D_m}$

d_p : diámetro de las partículas, λ : término relacionado con la homogeneidad del empaquetamiento, γ : constante que considera el flujo de la fase móvil fluye a través de un lecho particulado, k : factor de retención del analito, D_m y D_s : coeficientes de difusión del analito en la fase móvil y estacionaria respectivamente y d_f : espesor del film de la fase estacionaria.

Como se mencionó en la Sección 1.1, la optimización de las condiciones experimentales en un análisis cromatográfico siempre es un tema crítico a la hora de desarrollar un método separativo. Se busca lograr la mayor eficiencia posible en la separación (máximo número de platos teóricos, N , por unidad de longitud de la columna), para lo cual se debe trabajar en el mínimo de la curva de van Deemter donde la altura equivalente de plato teórico, H , es mínima. Sin embargo, en general esta condición de mayor eficiencia ocurre a una velocidad lineal baja, lo cual implica tiempos de análisis largos.

Por otro lado, tiempos de análisis cortos se logran en relación directamente proporcional a la pendiente de la curva de van Deemter en la sección en la que domina el término C , por lo que a medida que se acorta el tiempo de análisis, se pierde eficiencia. Ésta es una relación de compromiso presente al emplear las tradicionales partículas porosas de sílice de $5\mu\text{m}$, pero se ha intentado superar con el desarrollo de nuevos materiales que se utilizan como soportes de columnas de HPLC, entre los que se encuentran las partículas de diámetro menor a $2\mu\text{m}$ (sub- $2\mu\text{m}$), partículas de núcleo sólido y los materiales monolíticos.

1.2.1. Partículas sub-2 μm

El diámetro de las partículas afecta directamente a los términos A y C de la ecuación de van Deemter, por lo que en pos de aumentar la eficiencia de las columnas cromatográficas, se han utilizado partículas cada vez más pequeñas como relleno. Es así que han surgido columnas comerciales con partículas de diámetros menores a $2\mu\text{m}$. De esta manera, no sólo se logran mayores eficiencias respecto a las columnas convencionales, sino que además, aquellas no se ven comprometidas al trabajar a caudales altos. Sin embargo, de acuerdo a la ley de Darcy (**Ecuación 1.4**), la presión del sistema cromatográfico aumenta al reducir el tamaño de las partículas con una dependencia cuadrática[10].

$$\Delta P = \Phi \frac{\eta L u}{d_p^2} \quad (1.4)$$

La caída de presión (ΔP [Pa]) depende de la viscosidad (η [Pa.seg]) y velocidad lineal (u [cm/seg]) de la fase móvil, la longitud de la columna (L [cm]), el diámetro de las partículas (d_p [cm]) y un factor de resistencia Φ que es la relación entre el cuadrado del diámetro de partícula y la permeabilidad cromatográfica (B_0)(**Ecuación 1.5**)[11].

$$\Phi = \frac{d_p^2}{B_0} \quad (1.5)$$

Debido a que la presión que necesita aplicarse al sistema es muy elevada, se requieren equipos de cromatografía de líquidos de ultra alta presión (UHPLC según la sigla en inglés), capaces de trabajar en esas condiciones.

Existen ciertas limitaciones que hacen que la eficiencia hallada en la práctica sea menor a la predicha en forma teórica, como por ejemplo: 1) el calor generado por la fricción causada por las altas presiones desarrolladas, causa un gradiente de temperatura en la columna en sentido radial, provocando ensanchamiento de los picos[12], 2) la dificultad experimental de lograr un buen empaquetamiento de las partículas tan pequeñas al fabricar la columna y 3) que el cromatógrafo posea volúmenes extracolumna pequeños para no producir un ensanchamiento de los picos mayor al de la propia columna[13].

1.2.2. Partículas de núcleo sólido

Las partículas de núcleo sólido, llamadas también “fused core” o “core shell”, son partículas que contienen un núcleo no poroso y una capa externa porosa de espesor muy reducido (**Figura 1.1**). De esta manera, los analitos pueden difundir únicamente en la capa porosa externa de las partículas, por lo que no sólo disminuye el largo del camino que recorren, sino que lo hace también el volumen de fase móvil estanca que se encuentra dentro de los poros. Así, al ser más fácil el acceso de los analitos a los sitios activos de la fase estacionaria, disminuye el término C de la ecuación de van Deemter[14].

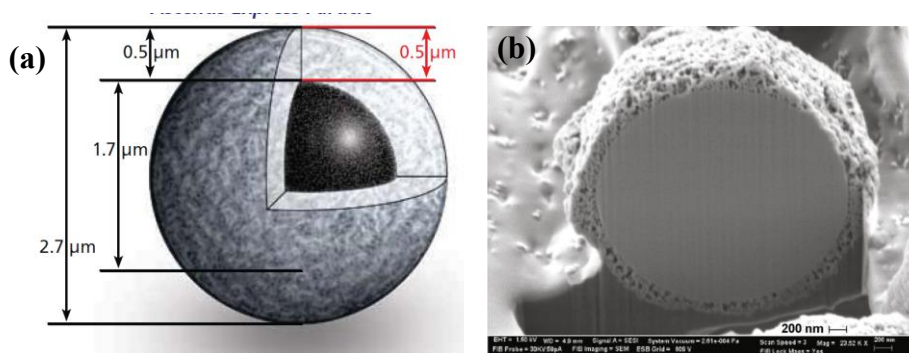


Figura 1.1. (a) Esquema[15] y (b) imagen SEM de la sección transversal de una partícula de núcleo sólido de $3,4\mu\text{m}$ de diámetro total y $0,2\mu\text{m}$ de capa porosa[16].

Por otro lado, la reducción del volumen muerto de la columna debido a la presencia de los núcleos sólidos de las partículas, disminuye el volumen en que puede ocurrir la difusión longitudinal de los analitos, disminuyendo también el término B de van Deemter[17]. Además, este tipo de partículas se caracteriza por tener una distribución de tamaños muy angosta, lo cual también favorece la homogeneidad de su empaquetamiento. Ambos factores disminuyen el término A de van Deemter[13]. Existen columnas comerciales con partículas core shell de diferentes tamaños, algunas de diámetro menor a $2\mu\text{m}$ que requieren de equipos de UHPLC y otras de diámetros mayores, por lo que pueden ser utilizadas en equipos de HPLC convencionales.

1.2.3. Polímeros monolíticos

Los polímeros monolíticos, o monolitos, son sólidos porosos sintetizados en una única pieza que ocupa todo el volumen de la columna. Presentan una distribución bimodal de

poros formada por **macroporos** con diámetros mayores a 50nm y **mesoporos** con diámetros entre 2 y 50nm, muy abundantes en monolitos de sílice pero difíciles de obtener en monolitos poliméricos orgánicos[18–21]. En la **Figura 1.2** se observa esta distribución bimodal en un monolito de sílice.

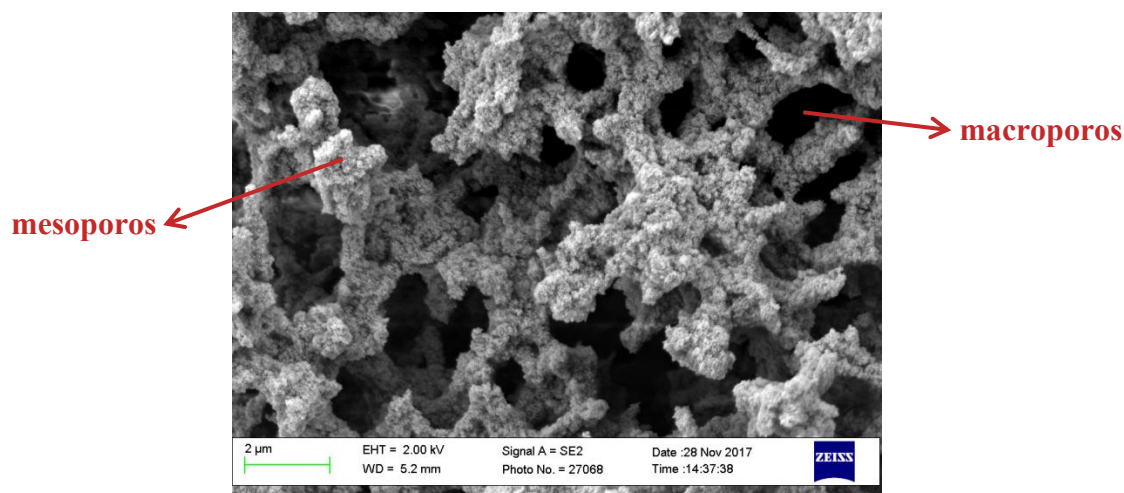


Figura 1.2. Imagen SEM de un monolito de sílice, donde se observan los macroporos y mesoporos.

Los **macroporos** otorgan una permeabilidad mucho mayor a la de las columnas particuladas y permiten un rápido acceso de los analitos a la fase estacionaria. Los **mesoporos** proporcionan los sitios de interacción con los analitos y es allí donde ocurren rápidos equilibrios de adsorción-desorción. Debido a la presencia de macroporos, el término C de van Deemter es pequeño o inexistente dado que la mayor parte del flujo es convectivo al no haber prácticamente fase móvil estanca, razón por la cual es posible trabajar a altos caudales sin desarrollar caídas de presión muy elevadas ni comprometer la eficiencia[17].

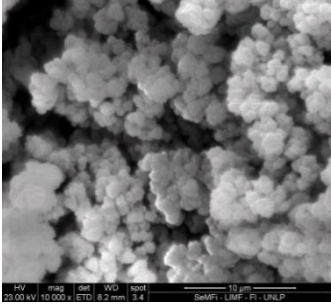
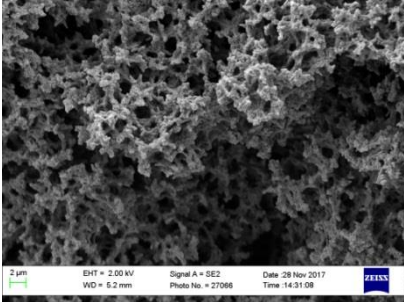
Los monolitos pueden sintetizarse en el interior de un molde de tamaño estándar para una columna de HPLC y, dado el encogimiento que sufren, se traspasa posteriormente el material poroso a la columna analítica definitiva del tamaño apropiado. También se los puede sintetizar directamente dentro de tubos capilares para ser utilizados como columnas de micro o nano-HPLC sin la necesidad de tapones de retención (“fritas”) terminales para retener el relleno como ocurre en columnas particuladas. Esto es una gran ventaja dado que estas fritas se pueden ocluir con muestras complejas con el consecuente aumento de la presión del sistema o la generación de picos “fantasma” en

los cromatogramas. Los monolitos son materiales muy versátiles, ya que pueden ser sintetizados en el laboratorio y modular sus propiedades químicas y estructurales al variar el tipo de monómero de partida y las condiciones experimentales de reacción. Sin embargo, se ha observado que la síntesis de estos materiales genera lechos con una distribución de poros asimétrica en sentido radial, con el consecuente ensanchamiento de los picos[22].

Químicamente, los monolitos pueden ser de naturaleza **orgánica** o **inorgánica**. Los típicos monolitos inorgánicos son los preparados a partir de sílice (SiO_2). Estos dos tipos de materiales presentan características diferentes. En la **Tabla 1.3** se mencionan las propiedades distintivas de ambos tipos de monolitos.

También se han sintetizado monolitos híbridos, que combinan las ventajas de ambos tipos de materiales, por ejemplo, monolitos orgánicos con distintos tipos de nanomateriales, logrando así aumentar significativamente el área superficial de las columnas[28]. Además, se han preparado monolitos de sílice en los que se reemplazó parte del precursor de silicio con un silano que posee una cadena orgánica, evitando así la funcionalización post-síntesis[29,30] y reduciendo el encogimiento que ocurre en la preparación de los mismos, típico del procedimiento de síntesis.

Tabla 1.3. Comparación de las características de los monolitos orgánicos e inorgánicos.

	Monolitos orgánicos	Monolitos de sílice
	Glóbulos interconectados que se hinchan al solvatare	Poros rígidos con dominios de fase pequeños
Estructura		
Distribución de poros	Bimodal con presencia predominante de macroporos (0,05-10 μm)[23], y en menor medida mesoporos (2-50nm)[24]	Bimodal con presencia de macroporos (0,05-10 μm)[25], y mesoporos (5-20nm)[26]
Área superficial	Generalmente del orden de 10m ² /gr[20]	En general del orden de 300m ² /gr[27]
Mecanismo de polimerización	Radicalaria	Sol-gel
Estabilidad con el pH	Desde fuertemente ácidos hasta fuertemente alcalinos. Depende de la estabilidad de los grupos funcionales pendientes, así como del material soporte en el que se sintetiza el monolito (en columnas capilares es muy frecuente utilizar capilares de sílice fundida)	Desde fuertemente ácidos hasta levemente alcalinos (pH=8)[14]
Modificación superficial	Gran cantidad de reacciones de modificación superficial según los grupos funcionales provenientes del monómero utilizado	Como reactivos derivatizantes se deben usar trialcosisilanos o triclorosilanos con el grupo funcional que se desea agregar al monolito

En la **Figura 1.3** se encuentran gráficas de van Deemter para columnas comerciales monolítica (Chromolith Fast Gradient), con partículas de núcleo sólido (Kinetex y Ascentis Express) y con partículas sub-2 μm (Aquitty BEH e Hypersil Gold).

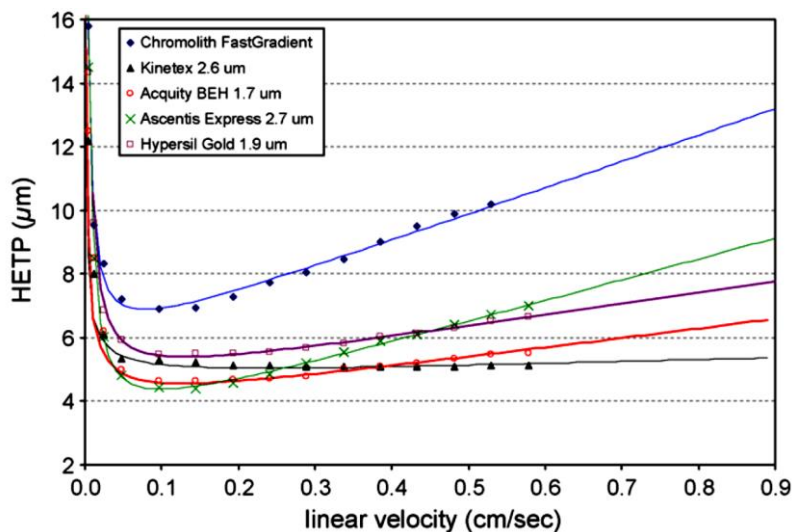


Figura 1.3. Curvas de van Deemter para estradiol en columnas conteniendo partículas de núcleo sólido de 2,6 y 2,7 μm (Kinetex y Ascentis Express respectivamente), partículas sub-2 μm totalmente porosas de 1,9 y 1,7 μm (Hypersil Gold y Acquity BEH respectivamente) y una columna monolítica de sílice (Chromolith Fast Gradient). Fase móvil: ACN/H₂O (48:52), $v_{\text{iny}}=0,5\mu\text{L}$, $\lambda=215\text{nm}$, $T=35^\circ\text{C}$ [31].

1.3. Quiralidad

Se denominan moléculas quirales a aquellas que poseen un elemento de asimetría (por ejemplo un centro, un eje o un plano, como se muestra en la **Figura 1.4**) y por lo tanto tienen la posibilidad de adoptar dos configuraciones espaciales diferentes, que constituyen isómeros ópticos[32]. Estos isómeros, también denominados enantiómeros, son imágenes especulares entre sí, no superponibles, que presentan exactamente las mismas propiedades físicas y químicas en un entorno no quiral.

Muchas macromoléculas naturales, tales como proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos, entre otras, están compuestas por unidades estructurales enantioméricas. En un entorno quiral como el de la naturaleza, los enantiómeros pueden presentar funciones biológicas diferentes[33]. Muchos fármacos, aditivos alimenticios y agroquímicos quirales presentan actividad diferencial para cada enantiómero[34], en particular, los

enantiómeros de contaminantes quirales pueden presentar diferentes toxicidades o velocidades de degradación.

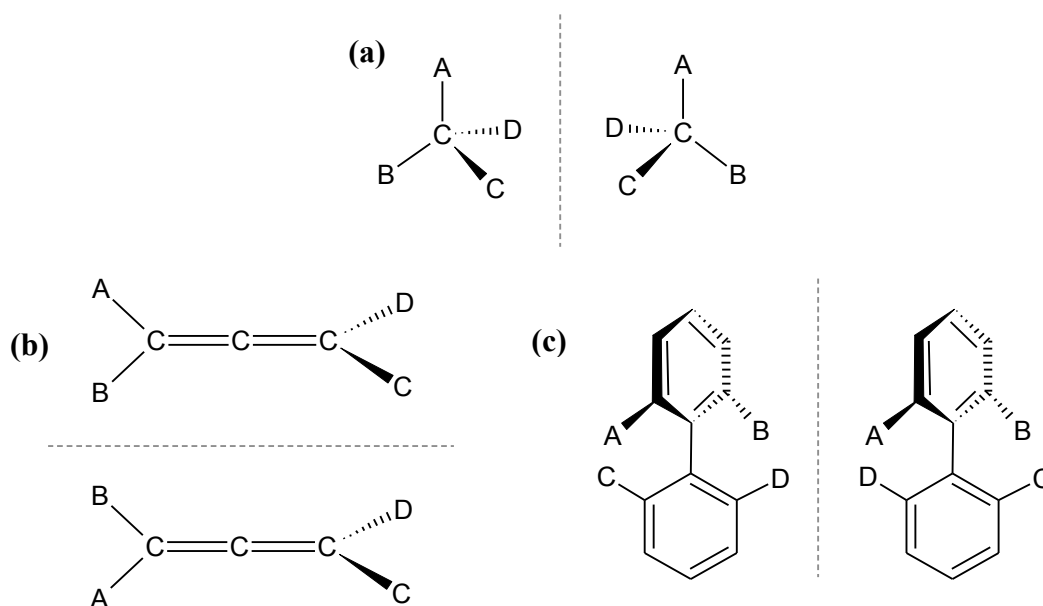


Figura 1.4. Moléculas quirales con un (a) centro, (b) eje y (c) plano de asimetría.

Es necesario, por lo tanto, que existan métodos que permitan separar quiralmente racematos, es decir mezclas que contienen una proporción 50:50 de cada enantiómero, para poder evaluar la presencia y/o abundancia relativa de uno o ambos enantiómeros, así como poder cuantificarlos individualmente. Sin embargo, debido a que los enantiómeros presentan iguales propiedades fisicoquímicas, es necesario someter al racemato a un entorno quiral para poder aprovechar alguna interacción enantioespecífica que genere diasterómeros, es decir isómeros en los que una de las conformaciones no es la imagen especular de la otra, con propiedades fisicoquímicas diferentes que puedan entonces separarse por los métodos cromatográficos no quirales convencionales.

1.4. Cromatografía quiral

Los métodos cromatográficos quirales permiten analizar tanto cuali- como cuantitativamente una mezcla racémica. Para ello, existen dos formas de abordar el análisis: mediante métodos indirectos o directos.

1.4.1. Métodos indirectos

Estos métodos consisten en la derivatización de los analitos quirales con un determinado derivatizante quiral para dar lugar a la formación de compuestos diastereoméricos en una reacción previa al análisis cromatográfico. De esta manera, se puede utilizar cualquier modo cromatográfico no quiral apropiado para separar los diastereómeros. Para poder utilizar un método indirecto, es necesario que los analitos posean grupos funcionales que permitan su reacción con el derivatizante. Además, es conveniente que el grupo funcional reactivo sea cercano al centro quiral para aumentar la diferencia en la conformación tridimensional de los diastereómeros formados[32].

La dificultad de este tipo de métodos radica en encontrar el agente derivatizante apropiado, que además debe estar disponible en un alto grado de pureza enantiomérica, así como una reacción de derivatización que posea un alto grado de conversión y buena reproducibilidad, lo que puede variar en las diferentes matrices donde se encuentre el analito.

1.4.2. Métodos directos

En los métodos directos, la enantioseparación se logra por la formación de complejos diastereoméricos reversibles entre los analitos y un compuesto enantioméricamente puro capaz de interactuar de forma enantioselectiva, o selector quiral, que se puede encontrar tanto en la fase móvil como en la fase estacionaria[34].

1.4.2.1. Aditivos quirales en fase móvil

Al aditivar la fase móvil con un selector quiral, se forman complejos diastereoméricos con los analitos. Estos complejos pueden poseer diferentes estabilidades termodinámicas y propiedades fisicoquímicas, por lo que pueden ser separados con una columna no quiral. La desventaja de este modo cromatográfico es la gran cantidad de selector quiral que se necesita para preparar la fase móvil[35–37].

1.4.2.2. Fases estacionarias quirales

Las columnas con fases estacionarias quirales se obtienen por la unión química (covalente) o física (adsorción) del selector quiral al soporte. Una forma de explicar la

capacidad de enantiorreconocimiento de este tipo de columnas es emplear el llamado *modelo de los tres puntos* (**Figura 1.5**). Según este modelo, debe haber por lo menos tres sitios de interacción entre el analito y el selector quiral, y por lo menos uno de ellos debe ser enantioespecífico, para que ocurra la separación de los enantiómeros.

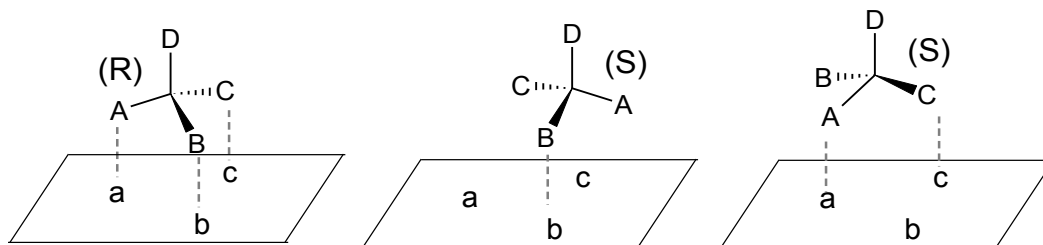


Figura 1.5. Modelo de tres puntos para el caso de un analito genérico en el que el enantiómero R presenta una mayor interacción con la fase estacionaria que el S.

Existen distintos tipos de factores que permiten el acomodamiento del analito en los sitios quirales de la fase estacionaria[38]:

- *Factores estéricos:* Tanto la forma como el tamaño del analito y del selector quiral deben ser complementarios para que haya interacción entre ambos.
- *Factores electrostáticos:* Debido a fuerzas intermoleculares tales como puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, entre electrones π o iónicas.
- *Factores dinámicos e inducidos:* Se ha estudiado en sistemas biológicos, pero también se observó para moléculas quirales pequeñas, que al interactuar dos moléculas complementarias puede haber un reacomodamiento posterior a la interacción inicial para maximizar los sitios de interacción[39].
- *Factores hidrofóbicos:* No sólo las interacciones dispersivas (van der Waals) contribuyen a la formación de complejos entre el analito y el selector quiral, sino que cuando la fase móvil es acuosa, las interacciones hidrofóbicas están entrópicamente favorecidas, ya que se liberan moléculas de agua adsorbidas sobre las superficies hidrófobas.

Es importante destacar que los factores anteriormente mencionados pueden contribuir tanto en forma positiva como negativa en el modelo de tres puntos para promover las diferencias en la retención de los enantiómeros[38].

Cuando el selector quiral se encuentra en la fase estacionaria, no sólo hay sitios de interacción quiral con el analito, sino que también hay sitios no enantioespecíficos. La retención, por lo tanto tendrá dos contribuciones, una enantioselectiva (k_R y k_S) y otra no enantioselectiva (k_{ne}) igual para ambos enantiómeros[40]. En consecuencia, la selectividad queda definida de acuerdo a la **Ecuación 1.6**.

$$\alpha = \frac{k_R + k_{ne}}{k_S + k_{ne}} \quad (1.6)$$

Para maximizar la selectividad no sólo es necesario que la diferencia entre k_R y k_S sea máxima, sino también que k_{ne} sea mínimo, por lo que siempre se busca tener un buen cubrimiento del selector quiral sobre el soporte para minimizar las interacciones de éste con los analitos.

Las fases estacionarias quirales se pueden clasificar de acuerdo a su naturaleza química en los siguientes grupos[38,41,42]:

- *Polisacáridos*: Tanto la celulosa como la amilosa han sido utilizadas como selectores quirales. Estos polisacáridos están conformados por unidades de glucosa (las cuales poseen varios centros quirales) ordenadas de forma regular, dando lugar a cavidades quirales con una estructura definida. Además, los polisacáridos poseen grupos hidroxilo que pueden ser derivatizados con diversos grupos funcionales posibilitando diferentes interacciones con los analitos.
- *Ciclodextrinas*: Son oligosacáridos cíclicos que forman una estructura de cono truncado con un interior hidrofóbico y un exterior hidrofílico. Al igual que en el caso de los polisacáridos, al estar compuestas por unidades de glucosa, las ciclodextrinas presentan cavidades con capacidad de reconocimiento quiral. También presentan hidroxilos derivatizables que permiten tanto modificar su solubilidad como potenciar diversas interacciones con los analitos.
- *Intercambio iónico*: Cuando tanto el selector quiral como los analitos tienen funciones químicas ionizables, se puede trabajar bajo el modo de intercambio iónico, en el cual se promueve la interacción entre ellos por atracción coulombica de largo alcance.

- *Tipo Pirkle (o donador/aceptor)*: Estos selectores quirales son moléculas neutras pequeñas que poseen grupos funcionales capaces de asociarse con los analitos por interacciones tipo dipolo-dipolo, puentes de hidrógeno o tipo π - π entre caras o cara-borde de anillos en los que uno es aceptor y el otro donador de electrones.
- *Intercambio de ligando*: En este tipo de fases el selector quiral se encuentra complejando a un metal de transición. Los analitos, que deben poseer grupos donadores de electrones, reemplazan al selector quiral en la coordinación del metal. Al poseer ambos enantiómeros diferentes energías de formación de complejos, éstos pueden ser separados.
- *Proteínas y glicoproteínas*: Por ser productos naturales compuestos por unidades quirales (aminoácidos e hidratos de carbono), presentan una alta capacidad de enantiorreconocimiento. Sin embargo, debido a que esta habilidad de reconocimiento quiral se debe en gran medida a la estructura tridimensional que adquiere el péptido, se deben utilizar condiciones suaves de reacción para anclar estos selectores quirales al soporte de la columna y utilizar fases móviles apropiadas para no afectar a la estructura de los mismos.
- *Antibióticos macrocíclicos*: Son selectores quirales muy versátiles ya que poseen una gran variedad de grupos funcionales así como sitios quirales.
- *Éteres corona*: Son compuestos macrocíclicos sintéticos que poseen grupos éter dispuestos hacia el interior de la molécula y diferentes funcionalidades (entre ellas grupos quirales) en el exterior.
- *Polímeros con moléculas impresas*: Son polímeros con cavidades específicas para un determinado enantiómero que se sintetizan por una reacción de polimerización entre un monómero, un entrecruzante, un iniciador radicalario y una molécula molde (generadora de la cavidad) del enantiómero de interés en presencia de un solvente apropiado. Las cavidades enantioespecíficas se generan al remover la molécula molde del material una vez finalizada la polimerización.

1.5. Contaminantes emergentes

Se definen como contaminantes emergentes a aquellas sustancias químicas que en la actualidad son liberadas al ambiente y poseen potenciales efectos tóxicos[43]. Cuando estos contaminantes son compuestos quirales, existe la posibilidad de que la toxicidad y la capacidad de degradación de cada enantiómero sean diferentes. De aquí, el especial

interés en la separación y determinación de contaminantes ambientales quirales mediante cromatografía de líquidos. En particular, en este trabajo de tesis se estudiaron tres grupos de compuestos: los **β -bloqueantes**, que son α -amino alcoholes muy utilizados como fármacos para el tratamiento de enfermedades cardíacas[44] (entre ellos propranolol, oxprenolol y metoprolol), **fungicidas** de la familia de las fenilamidas, que se utilizan en el cultivo de vegetales y granos para controlar enfermedades causadas por protistas del orden de los Peronosporales[45] (furalaxil y metalaxil) y un **precursor de compuestos farmacéuticos**, la benzoína.

Se ha demostrado que el efecto farmacológico de varios compuestos de la familia de los β -bloqueantes es diferencial para los diferentes enantiómeros. Por ejemplo, el S-propranolol es 100 veces más activo que el enantiómero R, mientras que el S-metoprolol es 35 veces más activo que el respectivo isómero óptico R[46]. Por otra parte, se ha encontrado que los estereoisómeros R de los β -bloqueantes se degradan preferencialmente por microorganismos[47].

Tanto el R-metalaxil como el R-furalaxil poseen actividad fungicida, mientras que los respectivos enantiómeros S no la tienen. Sin embargo, se ha observado que la degradación biológica del metalaxil es enantioselectiva, dependiendo tanto del microorganismo que lo degrada como del pH, el isómero óptico que se degrada con mayor facilidad[43]. Por su parte, se ha observado que en algunos organismos, el S-furalaxil se bioacumula selectivamente y presenta una mayor toxicidad[48].

1.6. Bibliografía

- [1] Scott, R. P. W., Microbore Columns in Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, 1980, 18, 49–54.
- [2] Oberacher, H., Premstaller, A., Huber, C. G., Characterization of Some Physical and Chromatographic Properties of Monolithic Poly(Styrene-co-Divinylbenzene) Columns. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1030, 201–208.
- [3] Hjertén, S., Liao, J.-L., Rong, Z., High-Performance Liquid Chromatography on Continuous Polymer Beds. *J. Chromatogr.*, 1989, 473, 273–275.
- [4] Svec, F., Fréchet, J. M. J., Continuous Rods of Macroporous Polymer as High-Performance Liquid Chromatography Separation Media. *Anal. Chem.*, 1992, 64, 820–822.
- [5] Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N., Tanaka, N., Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 1996, 68, 3498–3501.

- [6] Rapp, E., Tallarek, U., Liquid Flow in Capillary (Electro)Chromatography: Generation and Control of Micro- and Nanoliter Volumes. *J. Sep. Sci.*, 2003, 26, 453–470.
- [7] Anastas, P. T., Warner, J. C., Green Chemistry: Theory and Practice. Oxford University Press., Nueva York, 1998.
- [8] Vanhoenacker, G., Sandra, P., David, F., Sandra, K., Pereira, A., Green Chromatography (Part 1): Introduction and Liquid Chromatography. *LC-GC Eur.*, 2010, 23, 242–259.
- [9] Cazes, J., Scott, R. P. W., Chromatography Theory. Marcel Dekker, New York, 2002.
- [10] Ye, J., Cao, X., Cheng, Z., Qin, Y., Lu, Y., Rapid Determination of Parabens in Seafood Sauces by High-Performance Liquid Chromatography: A Practical Comparison of Core-Shell Particles and Sub-2 μm Fully Porous Particles. *J. Sep. Sci.*, 2015, 38, 3992–3999.
- [11] Cramers, C. A., Rijks, J. A., Schutjes, C. P. M., Factors Determining Flow Rate in Chromatographic Columns. *Chromatographia*, 1981, 14, 439–444.
- [12] Fekete, S., Oláh, E., Fekete, J., Fast Liquid Chromatography: The Domination of Core-Shell and Very Fine Particles. *J. Chromatogr. A*, 2012, 1228, 57–71.
- [13] Borges, E. M., Rostagno, M. A., Meireles, M. A. A., Sub-2 μm Fully Porous and Partially Porous (Core–Shell) Stationary Phases for Reversed Phase Liquid Chromatography. *RSC Adv.*, 2014, 4, 22875–22887.
- [14] Unger, K. K., Skudas, R., Schulte, M. M., Particle Packed Columns and Monolithic Columns in High-Performance Liquid Chromatography-Comparison and Critical Appraisal. *J. Chromatogr. A*, 2008, 1184, 393–415.
- [15] K. Way, W., Brandes, H., Campbell, W., Presentación de Ascentis® Express RP-Amide: Combinación de una fase estacionaria con grupos polares embebidos con partículas Fused-Core. *Reporter, Vol. 35*, 2009, 3–5.
- [16] Schuster, S. A., Wagner, B. M., Boyes, B. E., Kirkland, J. J., Optimized Superficially Porous Particles for Protein Separations. *J. Chromatogr. A*, 2013, 1315, 118–126.
- [17] Hayes, R., Ahmed, A., Edge, T., Zhang, H., Core-Shell Particles: Preparation, Fundamentals and Applications in High Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2014, 1357, 36–52.
- [18] Desire, C. T., Hilder, E. F., Arrua, R. D., Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley and Sons, Inc., 2017, pp. 1–37.
- [19] Kanamori, K., Nakanishi, K., Controlled Pore Formation in Organotrialkoxysilane-Derived Hybrids: from Aerogels to Hierarchically Porous Monoliths. *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 754–770.
- [20] Viklund, C., Svec, F., Fréchet, J. M. J., Monolithic, “Molded”, Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations, Catalysis, or Solid-Phase Chemistry: Control of Porous Properties during Polymerization. *Chem. Mater.*, 1996, 8, 744–750.
- [21] Legido-Quigley, C., Marlin, N. D., Melin, V., Manz, A., Smith, N. W., Advances in Capillary Electrochromatography and Micro-High Performance Liquid

- Chromatography Monolithic Columns for Separation Science. *Electrophoresis*, 2003, 24, 917–944.
- [22] Gritti, F., Guiochon, G., Mass Transfer Kinetics, Band Broadening and Column Efficiency. *J. Chromatogr. A*, 2012, 1221, 2–40.
- [23] Viklund, C., Svec, F., Fréchet, J. M. J., Monolithic, “Molded”, Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations, Catalysis, or Solid-Phase Chemistry: Control of Porous Properties During Polymerization. *Chem. Mater.*, 1996, 8, 744–750.
- [24] Tasfiyati, A. N., Iftitah, E. D., Sakti, S. P., Sabarudin, A., Evaluation of Glycidyl Methacrylate-Based Monolith Functionalized with Weak Anion Exchange Moiety Inside 0.5 mm i.d. Column for Liquid Chromatographic Separation of DNA. *Anal. Chem. Res.*, 2016, 7, 9–16.
- [25] Nakanishi, K., Pore Structure Control of Silica Gels Based on Phase Separation. *J. Porous Mater.*, 1997, 4, 67–112.
- [26] Nakanishi, K., Tanaka, N., Sol – Gel with Phase Separation . Hierarchically Porous Materials Optimized for High-Performance Liquid Chromatography Separations. *Acc. Chem. Res.*, 2007, 40, 863–873.
- [27] Galarneau, A., Calin, N., Iapichella, J., Barrande, M., Denoyel, R., Coasne, B., Fajula, F., Optimization of the Properties of Macroporous Chromatography Silica Supports through Surface Roughness Control. *Chem. Mater.*, 2009, 21, 1884–1892.
- [28] Hong, T., Yang, X., Xu, Y., Ji, Y., Recent Advances in the Preparation and Application of Monolithic Capillary Columns in Separation Science. *Anal. Chim. Acta*, 2016, 931, 1–24.
- [29] El-Debs, R., Cadoux, F., Bois, L., Bonhommé, A., Randon, J., Dugas, V., Demesmay, C., Synthesis and Surface Reactivity of Vinylized Macroporous Silica Monoliths: One-Pot Hybrid versus Postsynthesis Grafting Strategies. *Langmuir*, 2015, 31, 11649–11658.
- [30] Chen, M.-L., Zheng, M.-M., Feng, Y.-Q., Preparation of Organic-Inorganic Hybrid Silica Monolith with Octyl and Sulfonic Acid Groups for Capillary Electrochromatography and Application in Determination of Theophylline and Caffeine in Beverage. *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 3547–3556.
- [31] Oláh, E., Fekete, S., Fekete, J., Ganzler, K., Comparative Study of New Shell-Type, Sub-2 μm Fully Porous and Monolith Stationary Phases, Focusing on Mass-Transfer Resistance. *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 3642–3653.
- [32] Aboul-Enein, H. Y., Ali, I., Chiral Separations by Liquid Chromatography and Related Technologies. Marcel Dekker, New York, USA, 2003.
- [33] Berthod, A. (Ed.), Chiral Recognition in Separation Methods: Mechanisms and Applications. Springer, Heidelberg, Germany 2010.
- [34] Francotte, E., Linder, W. (Eds.), Chirality in Drug Research. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2006.
- [35] Kučerová, G., Procházková, H., Kalíková, K., Tesařová, E., Sulfobutylether- β -Cyclodextrin as a Chiral Selector for Separation of Amino Acids and Dipeptides in Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2016, 1467, 356–362.

- [36] Echevarría, R. N., Franca, C. a., Tascon, M., Castells, C. B., Keunchkarian, S., Chiral Ligand-Exchange Chromatography with Cinchona Alkaloids. Exploring Experimental Conditions for Enantioseparation of α -Amino Acids. *Microchem. J.*, 2016, 129, 104–110.
- [37] Keunchkarian, S., Franca, C. a., Gagliardi, L. G., Castells, C. B., Enantioseparation of α -Amino Acids by Means of Cinchona Alkaloids as Selectors in Chiral Ligand-Exchange Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2013, 1298, 103–108.
- [38] Healey, R., Ghanem, A., An Insight to Chiral Monolith for Enantioselective Nano and Micro HPLC: Preparation and Applications. *Chirality*, 2013, 25, 314–323.
- [39] Lingenfelder, M., Tomba, G., Costantini, G., Ciacchi, L. C., De Vita, A., Kern, K., Tracking the Chiral Recognition of Adsorbed Dipeptides at the Single-Molecule Level. *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2007, 46, 4492–4495.
- [40] Lubomirsky, E., Padró, J. M., Di Loreto, H., Castells, C. B., Chiral Separation of Aryloxyphenoxy-Propionate Herbicides in a Permethy- β -Cyclodextrin Based Column. Influence of Temperature and Mobile Phase Composition on Enantioselectivity. *Electrophoresis*, 2017, 38, 1948–1955.
- [41] Zhang, Z., Wu, R., Wu, M., Zou, H., Recent Progress of Chiral Monolithic Stationary Phases in CEC and Capillary LC. *Electrophoresis*, 2010, 31, 1457–1466.
- [42] Al-Othman, Z. A., Al-Warthan, A., Ali, I., Advances in Enantiomeric Resolution on Monolithic Chiral Stationary Phases in Liquid Chromatography and Electrochromatography. *J. Sep. Sci.*, 2014, 37, 1033–1057.
- [43] Wong, C. S., Environmental Fate Processes and Biochemical Transformations of Chiral Emerging Organic Pollutants. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 386, 544–558.
- [44] Jakubus, A., Gromelski, M., Jagiełło, K., Puzyn, T., Stepnowski, P., Paszkiewicz, M., Dispersive Solid-Phase Extraction Using Multi-Walled Carbon Nanotubes Combined with Liquid Chromatography–Mass Spectrometry for the Analysis of β -Blockers: Experimental and Theoretical Studies. *Microchem. J.*, 2018, 258–269.
- [45] Sheeja Mol, G. P., Aruldas, D., Hubert Joe, I., Balachandran, S., Experimental and Theoretical Spectroscopic Analysis, Chemical Reactivity and Fungicidal Activity Study on Benalaxyl Along with Quantum Chemical Computation on Metalaxyl and Furalaxyl. *Chem. Data Collect.*, 2018, 17-18, 370–393.
- [46] Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., A Review on Emerging Contaminants in Wastewaters and the Environment: Current Knowledge, Understudied Areas and Recommendations for Future Monitoring. *Water Res.*, 2014, 72, 3–27.
- [47] Xu, C., Lin, X., Yin, S., Zhao, L., Liu, Y., Liu, K., Li, F., Yang, F., Liu, W., Enantioselectivity in Biotransformation and Bioaccumulation Processes of Typical Chiral Contaminants. *Environ. Pollut.*, 2018, 243, 1274–1286.

- [48] Qin, F., Gao, Y., Guo, B., Xu, P., Li, J., Wang, H., Enantioselective Acute Toxicity Effects and Bioaccumulation of Furalaxyl in the Earthworm (*Eisenia foetida*). *Chirality*, 2014, 26, 307–312.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar y caracterizar columnas capilares monolíticas para separaciones quirales mediante cromatografía de líquidos. Para ello, se sintetizarán soportes monolíticos, tanto de naturaleza inorgánica como orgánica, y luego se incorporará una fase estacionaria basada en un selector quiral derivado de celulosa. Estas columnas capilares se emplearán en el desarrollo de métodos rápidos y robustos para la determinación de pureza enantiomérica de mezclas racémicas de compuestos de interés farmacéutico y ambiental. El objetivo de emplear columnas a escala miniaturizada (capilares) es disminuir sensiblemente tanto la cantidad de material empleado en la fase estacionaria, los solventes utilizados como fase móvil y la cantidad de muestra, para cumplir con los requerimientos de la química verde o sustentable, a la vez que se mantiene o aumenta la sensibilidad analítica como consecuencia de la menor dispersión de los picos cromatográficos.

Objetivos específicos

- Desarrollar columnas capilares para HPLC a escala miniaturizada (HPLC capilar o cLC) basadas en monolitos obtenidos de la polimerización controlada de metacrilato de glicidilo (GMA) y dimetacrilato de etilenglicol (EDMA).
- Desarrollar monolitos inorgánicos de sílice mediante la técnica de sol-gel a partir de tetraetoxi silano (TEOS) para utilizarlos en HPLC capilar.
- Caracterizar las propiedades físicas de los soportes monolíticos (mediante microscopía electrónica de barrido, isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno, porosimetría de intrusión de mercurio y estudios de permeabilidad cromatográfica) para evaluar su factibilidad como columnas de HPLC capilar.

- Sintetizar el selector quiral bis-(3,5-dimetilfenil)carbamato de celulosa (bis-CDMPC) a partir de celulosa microcristalina y caracterizar el derivado mediante espectroscopía IR y análisis elemental.
- Funcionalizar los monolitos con el selector quiral mediante dos métodos diferentes: *i.* unión covalente al soporte del fenilcarbamato de celulosa, o bien *ii.* adsorción física del selector quiral mediante depósito del mismo sobre la estructura monolítica.
- Estudiar la influencia del modo de funcionalización (adsorción vs. unión covalente) sobre la capacidad de discriminación quiral de la fase estacionaria resultante.
- Optimizar las condiciones cromatográficas para la enantioresolución de contaminantes emergentes ópticamente activos.

2. Monolito de sílice como soporte para columnas de cLC

2.1. Introducción

Los polímeros monolíticos inorgánicos, formados generalmente a partir de SiO₂ como monómero, se sintetizan a través de una técnica denominada *sol-gel*. Dicho nombre hace referencia al proceso de formación del sólido poroso, en el que primero se obtiene un *sol*, es decir una suspensión estable de partículas coloidales, y luego un *gel*, que consiste en una red sólida que contiene líquido en los poros[1]. En este proceso, un precursor de silicio, en general un tetra(alcoxi)silano, es hidrolizado, dando lugar a un silano que reacciona muy fácilmente con otros compuestos de sílice para formar enlaces siloxano Si-O-Si, según el esquema[2]:

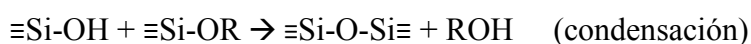


Figura 2.1. Reacciones de formación de sólidos por medio del mecanismo sol-gel.

La síntesis de monlitos de sílice cuenta con cinco etapas:

- Hidrólisis
- Formación del gel o gelificación
- Envejecimiento o maduración
- Secado
- Calcinación

2.1.1. Hidrólisis

En esta etapa se forman los grupos silanoles que reaccionarán más adelante para dar lugar al gel. Esto puede ocurrir en condiciones ácidas o alcalinas, y dado que los silanos reaccionan violentamente en agua, la hidrólisis debe llevarse a cabo en condiciones controladas. La mezcla de reacción consiste en:

- Un **precursor de sílice**, normalmente un tetra(alcoxi)silano.
- Una **solución acuosa de un ácido o una base** que permitirán la hidrólisis del tetra(alcoxi)silano.

- Un **polímero orgánico**, por ejemplo polietilenglicol, el cual permite estabilizar la suspensión del silano en las etapas iniciales de la síntesis, previniendo la formación de agregados grandes del mismo debido a su alta reactividad y luego, a medida que se va formando el gel, favorece la separación de fases.
- **Urea u otro precursor de NH₃**. Como se verá más adelante, es conveniente tener un medio alcalino en la etapa de envejecimiento para lograr un material con mesoporos y resistente mecánicamente. Muchas veces se utiliza urea, la cual se descompone al calentar y libera NH₃. También se puede lavar con mucho cuidado el gel formado con una solución de NH₄OH (muchas veces los geles obtenidos son muy blandos y pueden romperse al lavarlos).
- Un **aditivo químico de control de secado**. La ruptura de este tipo de materiales es un problema al momento del secado, por lo que se puede agregar un co-solvente orgánico de baja tensión superficial (por ejemplo formamida) para disminuir el estrés del material durante el secado y así preservar la integridad del mismo[3].

Al realizar la síntesis, el silano es el último reactivo que se agrega a la mezcla. Este agregado debe hacerse lentamente y en frío (en general en un baño de hielo) para que la hidrólisis ocurra lentamente y se genere una buena dispersión.

Se denomina *punto de carga cero* al pH al cual la carga neta del silano es nula. Esto ocurre a valores de pH entre 1,5 y 4,5. A medida que aumenta el grado de condensación, el punto de carga cero va disminuyendo debido al aumento en la acidez de los silanoles. El mecanismo de reacción en medio ácido (es decir, a un pH menor al punto de carga cero) se muestra en la **Figura 2.2**.

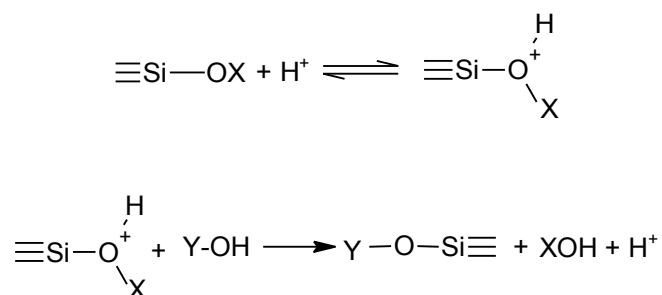


Figura 2.2. Mecanismo de polimerización en medio ácido, donde para la hidrólisis X=R (siendo R un grupo alquílico) e Y=H, mientras que para la condensación X=R o H e Y=Si.

Por otro lado, el mecanismo en medio alcalino se representa en la **Figura 2.3**.

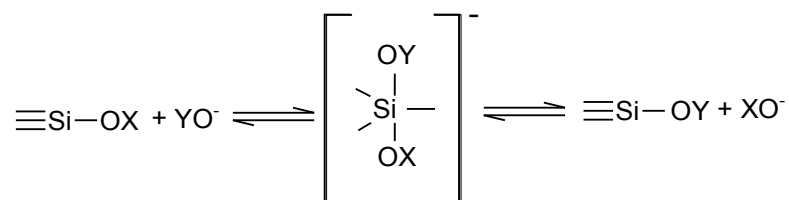
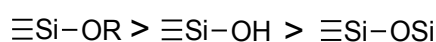


Figura 2.3. Mecanismo de polimerización en medio alcalino, donde X=R (donde R es una cadena alquílica) e Y=H en la hidrólisis y X=R o H e Y=Si para la condensación.

La densidad electrónica del átomo de Si decrece de la siguiente manera:



Por lo tanto, en medio ácido será más reactivo el alcoxisilano, ya que el Si con mayor densidad de carga negativa estabilizará mejor al intermediario catiónico, mientras que en medio alcalino se verán favorecidas las reacciones de condensación ya que el intermediario aniónico estará mejor estabilizado con los enlaces Si-O-Si, de menor densidad electrónica[1].

2.1.2. Formación del gel o gelificación

Los silanoles formados pueden reaccionar con otros silanoles o con alcoxisilanos, dando lugar a una red tridimensional que forma un gel. En esta etapa hay dos procesos que ocurren en simultáneo, por un lado la *descomposición espinodal* y por el otro la formación de enlaces covalentes entre los silanos. Se denomina *descomposición espinodal* a la separación de fases en un sistema cuando el cambio de energía libre de Gibbs para una fase homogénea frente a un cambio en la concentración de las especies es positivo[4]. A diferencia de un proceso de *nucleación*, donde hay sitios puntuales en los que la composición de un sistema es diferente y la separación de fases ocurre alrededor de esos sitios, en la *descomposición espinodal* se observa la formación de una estructura co-continua en todo el volumen del sistema, es decir un sistema en el que coexisten dos fases continuas. Debido a que esta disposición de dos fases presenta una alta energía superficial, a medida que pasa el tiempo aumentan los dominios de ambas fases hasta que el sistema coalesce (**Figura 2.4**)[5]. Para que pueda formarse un gel con

macroporos pequeños, la formación de enlaces covalentes entre los silanos debe ocurrir en las etapas tempranas de la separación de fases, cuando todavía se observa la estructura co-continua de fases. De esta manera, la estructura con dominios de fase pequeños queda inmovilizada por la formación de la red sólida. En general, se utilizan temperaturas de entre 40 y 60°C para promover las reacciones de condensación.



Figura 2.4. Esquema de separación de fases por descomposición espinodal[6].

2.1.3. Envejecimiento o maduración

Al calentar el gel a temperaturas de entre 80 y 120°C, ocurren una serie de cambios en la estructura del material conocido como envejecimiento o maduración[7]. En esta etapa se utiliza un pH levemente alcalino, ya sea por descomposición de urea o por el lavado del gel con una solución alcalina y se forman los **mesoporos**. En esta etapa, los oligómeros que todavía están en solución reaccionan con la red del gel, engrosando las paredes del mismo y aportando rigidez a la estructura. Además, a pH alcalino existe un equilibrio dinámico entre los silanos en solución y los del sólido, en el cual los silanos que se encuentran en bordes de la estructura sólida se ven favorecidos termodinámicamente a disolverse, mientras que los que están en solución se ven favorecidos a depositarse en cavidades del sólido[8]. Por otro lado, los silanoles superficiales pueden reaccionar entre sí, generando una contracción de los poros y un encogimiento de la estructura en general[1]. Este encogimiento es un problema a la hora de fabricar columnas, ya que puede generar el desprendimiento del monolito del capilar que lo contiene.

2.1.4. Secado

Al evaporar el solvente, un problema muy frecuente es que el material se quiebre. Debido a la elevada tensión superficial del agua, se genera mucho estrés sobre las paredes del sólido formado a medida que ésta se evapora, lo cual puede generar fracturas. Para evitar esto, se puede agregar un co-solvente orgánico o aditivo químico

de control de secado, generalmente formamida, de menor tensión superficial que el agua[8].

2.1.5. Calcinación

En muchos procedimientos de síntesis hay una etapa final de calcinación en la que los monolitos se calientan a temperaturas mayores a 300°C para pirolizar el material orgánico que pudo haber quedado remanente[9]. Al someter al sólido a temperaturas altas, éste adquiere rigidez, sin embargo hay procedimientos en los que se evita este paso y se obtienen monolitos más flexibles[10]. El tratamiento térmico realizado en la calcinación no suele tener efecto en las propiedades porosas del material, pero dependiendo de la temperatura a la que se llegue y el tiempo de calentamiento, puede disminuir el número de mesoporos[6].

2.1.6. Modificación superficial

Para utilizar los monolitos de sílice como columnas de HPLC es necesario adicionar una fase estacionaria, la cual puede ser depositada por adsorción en el soporte monolítico o unida covalentemente a él. Existen diferentes metodologías para la unión química de la fase estacionaria en monolitos de sílice, algunas de ellas se describen a continuación:

Funcionalización post-síntesis

Una vez finalizada la síntesis del monolito, los silanoles de la superficie pueden reaccionar con un silano que puede tener uno, dos o tres grupos reactivos además del grupo funcional que se desea anclar. Las reacciones de silanización ocurren entre los silanoles del monolito y un reactivo derivatizante. Existen tres tipos de silanoles superficiales, como se muestra en la **Figura 2.5**, los denominados *silanoles libres*, pertenecientes a un átomo de silicio que posee tres enlaces hacia el seno del material, los *vecinales*, de átomos de silicio vecinos, por lo que forman puentes de hidrógeno entre ellos, y los *geminales*, unidos al mismo átomo de silicio. Estos silanoles presentan diferente acidez.

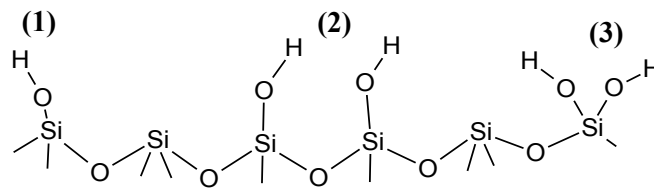


Figura 2.5. Clasificación de los grupos silanoles. Silanoles (1) libre, (2) vecinos y (3) geminales.

A temperaturas mayores a 800°C, los silanoles vecinales reaccionan dando lugar a un enlace siloxano (**Figura 2.6**). De esta manera, disminuye la cantidad de grupos reactivos en la superficie, pero en contacto con H₂O puede volver a hidroxilarse lentamente.

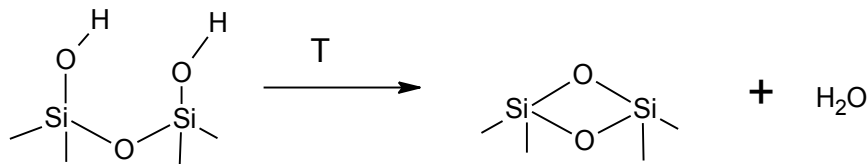


Figura 2.6. Reacción de desactivación térmica de la sílice.

La densidad de silanoles superficiales es uno de los parámetros más importantes que define la reactividad de ese tipo de sólidos. Se ha determinado que para sílice amorfa, la concentración superficial de silanoles es de entre 4,5 y 5 grupos/nm²[11].

Los reactivos derivatizantes más utilizados son alcóxisilanos o clorosilanos, aunque también se pueden utilizar aminosilanos o hidruros de silicio[6]. Estos silanos permiten incorporar grupos funcionales, o bien grupos reactivos para reacciones posteriores. En la **Figura 2.7** se presentan algunas reacciones que permiten la modificación superficial de la sílice.

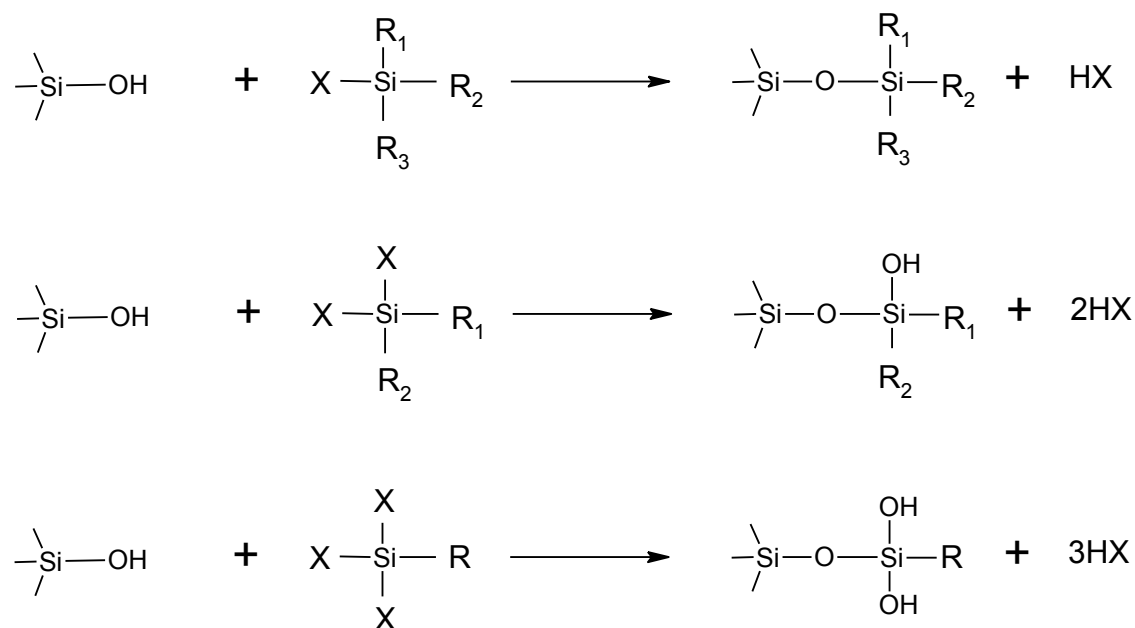


Figura 2.7. Reacciones de modificación superficial de la sílice (X=Cl, OR, NR₂ o H).

Más del 90% de las fases estacionarias comerciales se obtienen por reacción con alquil clorosilanos, muchos de los cuales son alquil dimetil clorosilanos[11].

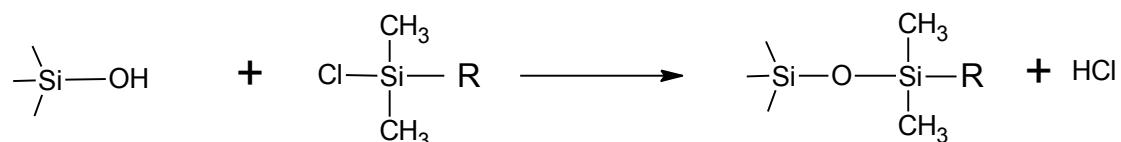


Figura 2.8. Reacción de modificación superficial de sílice con un trialquilclorosilano.

También se pueden usar di o triclorosilanos como derivatizantes. Los silanos monofuncionales disminuyen el número de silanoles superficiales en un 50%, los difuncionales en un 12% dado el impedimento estérico de las cadenas alquílicas, y los trifuncionales aumentan el número de silanoles ya que al hidrolizarse el derivatizante aporta nuevos grupos silanoles[11]. Debido a que los silanoles tienen propiedades ácidas, suelen interactuar con moléculas aceptoras de protones, por lo que cuando los analitos poseen un carácter básico, generan picos cromatográficos deformados con coleos. Por este motivo se suelen usar silanos monofuncionales para la fabricación de columnas de HPLC, ya que las cadenas laterales (los grupos alquilo (R) de la **Figura 2.8**) protegen a los analitos de la interacción con la superficie del soporte de sílice.

También se puede realizar una reacción para el recubrimiento final (“end-capping”) de los silanoles residuales. El end-capping es una segunda modificación en la que se busca desactivar la superficie de sílice por reacción con un silano de cadenas cortas (el más utilizado es el trimetil clorosilano).

Síntesis directa

Esta metodología consiste en la co-condensación del precursor de silicio con un organotrialkoxisilano (**Figura 2.9 (a)**). Esto se logra al adicionar ambos silanos a la mezcla inicial de reacción, lo cual da lugar a un monolito híbrido. En esta vía sintética, se deben evitar altas temperaturas en la etapa de calcinación al preparar el monolito, ya que esto degradaría las cadenas orgánicas de la estructura del mismo, aunque se pueden utilizar temperaturas moderadas para dar rigidez al material sin perjudicar la fase estacionaria.

Síntesis de organosílices mesoporosas periódicas

En este tipo de síntesis se utilizan precursores de silsesquioxano con un puente orgánico. Estos precursores poseen dos grupos trialkoxisilano unidos por un puente orgánico, del tipo $(RO)_3Si-R'-Si(RO)_3$, por lo que las cadenas orgánicas forman parte de las paredes del monolito en lugar de quedar como grupos pendientes como en el caso de los obtenidos por síntesis directa[12]. En la **Figura 2.9 (b)** se puede observar un esquema de la obtención de estos materiales.

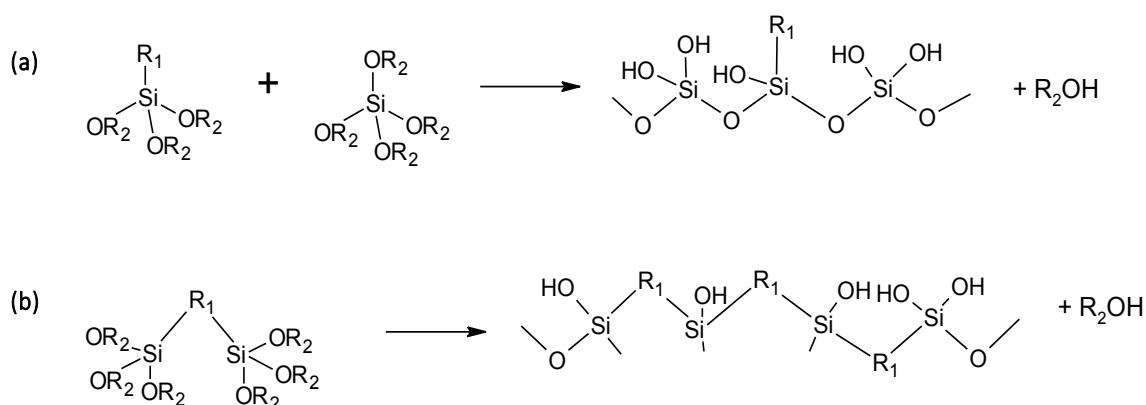


Figura 2.9. Esquema de la obtención de **(a)** organosílice por síntesis directa y **(b)** organosílices mesoporosas periódicas. (R_1 es la cadena hidrocarbonada que se desea incorporar y R_2 suele ser metilo o etilo).

2.2. Parte experimental

La sección experimental correspondiente a este capítulo se realizó en el transcurso de una estadía durante los meses de agosto de 2017 a febrero de 2018, en “Future Industries Institute”, University of South Australia.

2.2.1. Reactivos

La síntesis de monolitos inorgánicos, requirió: tetraetoxi silano (**TEOS**) (Fluka, 98%); HNO₃ (99,5%); ácido poliacrílico (**HPAA**) 250.000gr/mol (35%p/p) 100.000gr/mol (35%p/p) y 1.800gr/mol (98%), formamida (**FA**) (99,5%); metil(trimetoxi)silano (**MTMS**) (97%) de Sigma Aldrich, urea (Univar, 99%), metanol (Tedia, 99,9%), NaOH (Mallinckrodt, 97%) y HCl (Anedra, 37%p/p). La síntesis se ensayó en capilares de diámetro interno de entre 50 y 100µm de sílice fundida con recubrimiento de poliimida (Trajan).

2.2.2. Equipamiento

Para la síntesis de los monolitos de sílice se utilizaron sonicador (Soniclean), estufa (Thermoline Scientific LVO-30), horno de cromatografía de gases (Agilent 6890) y bomba de infusión a jeringa (Harvard PHD 22/2000).

Para las medidas de permeabilidad se utilizó un equipo HPLC (Agilent 1260 Infinity), equipado con una bomba capilar que incluye un desgasificador de alta performance, un micro-autoinyector, un termostatizador de columnas (modelo 1290) y un detector de arreglo de diodos.

Las caracterizaciones estructurales se realizaron con un microscopio SEM (Carl Zeiss Microscopy Merlin con GEMINI II- Oxford Instruments X-MaxN) y un equipo para medir isothermas de adsorción de N₂ tipo BET (Micrometics ASAP 2420).

2.2.3. Síntesis de los monolitos de sílice

En el presente trabajo, el precursor de silicio utilizado es TEOS, el catalizador ácido es HNO₃, HPAA el polímero orgánico para promover la separación de fases, FA el agente químico de control de secado y urea el inductor de mesoporos.

Para la síntesis del monolito de sílice, se siguió el procedimiento empleado por Morisato y col.[13]. En un vial, se disolvió HPAA en HNO₃ 4M, H₂O y FA. Una vez obtenida una solución homogénea, la misma se colocó en un baño de hielo y se agregó TEOS gota a gota y en agitación magnética. Al agregar el precursor de silicio se observaron dos fases incoloras inmiscibles, pero al hidrolizarse el silano se obtuvo una fase homogénea. La mezcla se sonicó 5 minutos en un baño de hielo para desgasificar y luego se llenaron los tubos capilares (previamente activados) mediante el uso de una jeringa, y se sellaron los extremos con septum de goma. Los capilares se colocaron en una estufa por 14 horas para la gelificación. El gel obtenido se lavó con H₂O a un caudal de 0,1µL/min en el equipo de nano-HPLC hasta observar una disminución en la presión del sistema que corresponde al lavado del HPAA, luego se pasó una solución de urea 1,5M a 10µL/h en una bomba jeringa y se sellaron los extremos con septum de goma. Con ésta última solución, el gel se calentó en un horno de cromatografía de gases para permitir la formación de los mesoporos. El programa de temperatura utilizado fue un gradiente de 1°C/min desde 26°C hasta 110°C, luego 4 horas a 110°C y finalmente se empleó un nuevo gradiente de 1°C/min desde 110°C a 26°C. Finalmente, el monolito obtenido se lavó con metanol.

Se decidió no realizar la etapa final de calcinación debido a que la temperatura de descomposición del HPAA es cercana a 400°C[14] y a esa temperatura, la poliimida que recubre el capilar también se descompondría.

Las cantidades experimentales de los reactivos utilizados en la fabricación de las columnas monolíticas de sílice, se encuentran detallados en la **Tabla 2.1**.

Tabla 2.1. Condiciones experimentales utilizadas en la síntesis de monolitos de sílice (tiempo de gelificación de 14 horas y lavado del gel con urea 1,5M). Peso molecular del HPAA es de 100.000gr/mol (salvo indicación).

Efecto estudiado	m_{HPAA} (gr)	V_{HNO3 4M} (μL)	V_{H2O} (μL)	V_{FA} (μL)	V_{TEOS} (μL)	T_{gelificación} (°C)	d.i.* (μm)
Peso molecular de HPAA	1,4548 (PM=1.800gr/mol)	625	625	360	2500	40	100
	1,5053 (PM=100.000gr/mol)	625	550	360	2500	40	100
	1,5014 (PM=250.000gr/mol)	625	550	360	2500	40	100
Cantidad de TEOS	1,4985	625	550	360	2000	40	100
	1,5053	625	550	360	2500	40	100
	1,4904	625	550	360	3500	40	100
Cantidad de HPAA	1,5146	625	550	360	2500	40	100
	1,2985	625	550	360	2500	40	100
	1,1139	625	550	360	2500	40	100
	0,9053	625	550	360	2500	40	100
	0,7155	625	550	360	2500	40	100
Agregado de MTMS** (en combinación con cantidad de HPAA)	1,4998	625	550	360	2000	40	100
	1,3142	625	550	360	2000	40	100
	1,1134	625	550	360	2000	40	100
	0,9127	625	550	360	2000	40	100
	0,6866	625	550	360	2000	40	100
T_{gelificación}	1,1172	625	550	360	2500	40	100
	1,1212	625	550	360	2500	55	100
	1,0875	625	550	360	2500	60	100
	1,0967	625	550	360	2500	65	100
	0,7148	625	550	360	2500	40	100
	0,6954	625	550	360	2500	45	100
	0,6930	625	550	360	2500	50	100
d.i. del capilar	0,7363	625	550	360	2500	45	50 y 75

*d.i.=diámetro interno del capilar **las mezclas tienen un agregado de 500μL MTMS

Pretratamiento de capilar

Para activar la superficie interna del capilar y permitir el anclaje del monolito, se llenó el mismo con una solución de NaOH 1M y se calentó el capilar a 40°C por 3 horas. Se lavó el capilar con H₂O hasta pH neutro, luego con HCl 1M y se volvió a calentar a 40°C por 1 hora. Se lavó nuevamente con H₂O hasta pH neutro, luego con acetona y finalmente se secó con N₂.

Medidas de permeabilidad

La permeabilidad cromatográfica se midió utilizando H₂O como solvente y midiendo la presión del sistema con y sin columna, utilizando la Ley de Darcy.

$$B_0 = \frac{F\eta L}{\pi r^2 \Delta P} \quad (2.1)$$

En esta ecuación B_0 [m²] es la permeabilidad cromatográfica, F [m³/seg] y η [Pa.seg] son el caudal y la viscosidad de la fase móvil, ΔP [Pa] la caída de presión a lo largo de la columna y L [m] y r [m] son la longitud y el radio de la columna, respectivamente.

2.3. Resultados y discusión

En la presente sección del capítulo se muestran los resultados obtenidos para el desarrollo de monolitos inorgánicos de sílice mediante la técnica de sol-gel a partir de TEOS. También se detalla la caracterización de las propiedades físicas de estos soportes: tamaño de poros, área superficial y permeabilidad cromatográfica para evaluar su potencial como columnas de HPLC capilar.

2.3.1. Efecto del peso molecular del HPAA

Para estudiar la dependencia de la distribución de los macroporos con el peso molecular del polímero orgánico utilizado en la mezcla de reacción, se prepararon mezclas de polimerización con igual cantidad de HPAA y de diferentes pesos moleculares. En la **Figura 2.10** se muestran las imágenes SEM de los monolitos obtenidos utilizando HPAA de peso molecular 1.800, 100.000 y 250.000gr/mol.

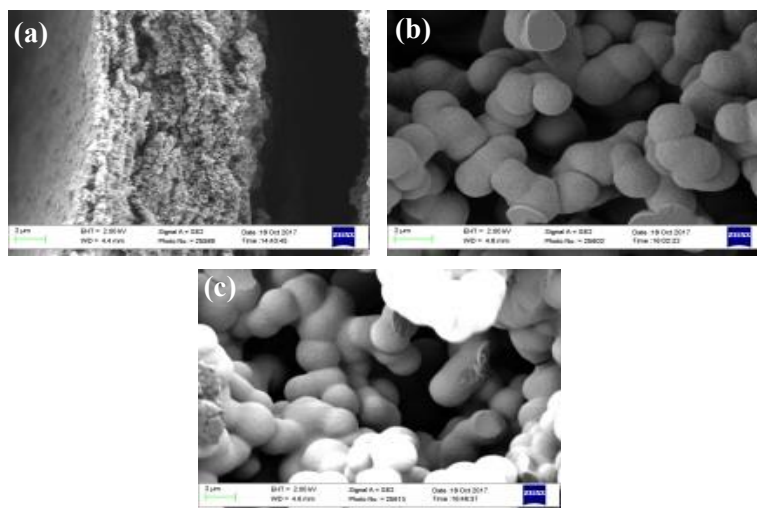


Figura 2.10. Imágenes SEM (utilizando el mismo aumento) de los monolitos preparados a partir de: 1,5gr HPAA **(a)** 1.800gr/mol, **(b)** 100.000gr/mol, **(c)** 250.000gr/mol; 625µL HNO₃ (4M); 625µL H₂O (para el HPAA sólido) o 550µL (para las soluciones de HPAA); 360µL FA; 2,5mL TEOS; T_{gelificación}=40°C; capilares de 100µm d.i.

Se puede observar que a medida que aumenta el peso molecular del HPAA, aumenta el tamaño de los macroporos. Esto se interpreta por la formación de dominios de fases más grandes durante la descomposición espinodal cuando el polímero es de mayor peso molecular. Lamentablemente, no se encuentra HPAA comercialmente disponible de peso molecular entre 1.800gr/mol y 100.000gr/mol, por lo que los poros del monolito son muy pequeños o muy grandes. Debido a que el uso de HPAA 1.800gr/mol daría como resultado una columna muy poco permeable, se decidió usar HPAA 100.000gr/mol.

2.3.2. Efecto de la cantidad de TEOS

Con la idea de reducir el tamaño de los macroporos, se evaluó la influencia de la cantidad del precursor de silicio. Se observó que al aumentar la cantidad de TEOS aumentaba la dureza del gel obtenido en las primeras etapas de la síntesis, pero eso no mostró diferencias apreciables en la estructura del monolito resultante. En la **Figura 2.11** se muestran las imágenes SEM de los monolitos obtenidos con 1,5; 2,5 y 3,5mL de TEOS. En todos los casos, se realizaron las mezclas de reacción con 1,5gr de HPAA (100.000gr/mol), 625µL de HNO₃ (4M) 550µL H₂O y 360µL FA, se utilizó una temperatura de gelificación de 40°C y se prepararon las columnas en capilares de 100µm de diámetro interno.

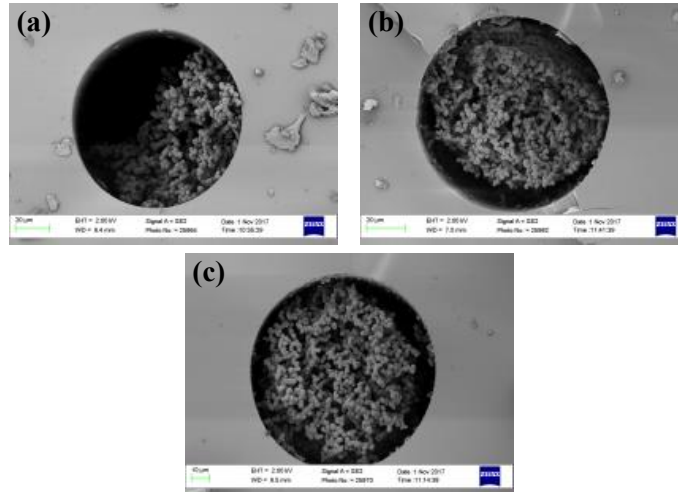


Figura 2.11. Imágenes SEM de los monolitos con (a) 1,5mL, (b) 2,5mL, (c) 3,5mL TEOS. (1,5gr HPAA (100.000gr/mol); 625 μ L HNO₃ (4M); 550 μ L H₂O; 360 μ L FA; urea 1,5M; T_{gelificación}=40°C; d.i.=100 μ m) (El aumento en las imágenes es el mismo).

2.3.3. Efecto de la cantidad de HPAA

Otra estrategia al buscar reducir el tamaño de los macroporos es evaluar el efecto de la cantidad de polímero orgánico. En la **Figura 2.12** se muestran imágenes SEM de los monolitos obtenidos con un volumen constante de TEOS (2,5mL) y cantidades variables de HPAA (entre 0,7 y 1,5gr). En todos los casos, se utilizaron 625 μ L de HNO₃, 550 μ L de H₂O y 360 μ L de FA.

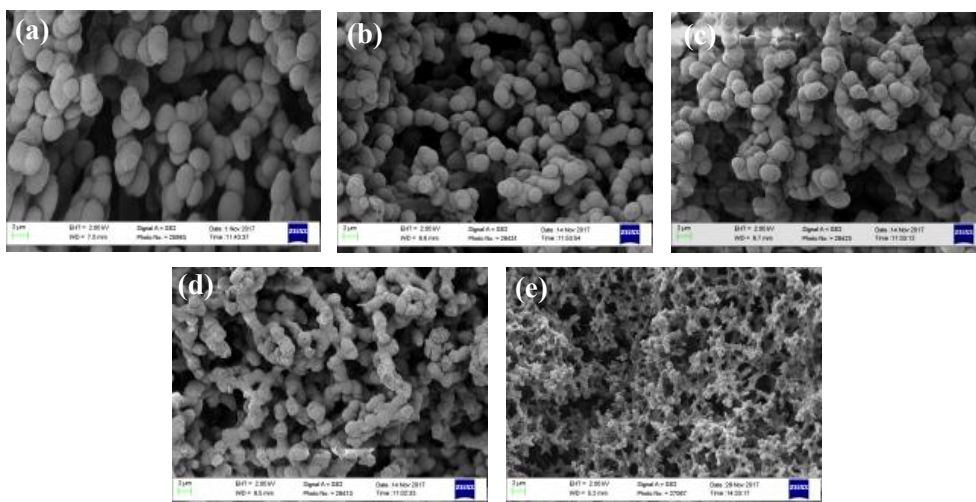


Figura 2.12. (a) 1,5gr, (b) 1,3gr, (c) 1,1gr, (d) 0,9gr, (e) 0,7gr HPAA; 625 μ L HNO₃ (4M); 550 μ L H₂O; 360 μ L FA; 2,5mL TEOS; 1,5M urea; T_{gelificación}=40°C; d.i.=100 μ m.

Se observó que a medida que disminuye la cantidad de HPAA, disminuye el tamaño de los macroporos. Esta tendencia se puede explicar por la formación de dominios de fases más chicos a medida que la cantidad de polímero decrece. En estos experimentos se observaron dos casos interesantes. El primero fue el monolito obtenido al utilizar 1,1gr de HPAA, ya que por primera vez se observó un monolito completamente adherido a la pared del capilar (**Figura 2.13 (a)**). Lamentablemente, al repetir esta condición, el monolito se encogió durante la síntesis y en consecuencia se observaron zonas del monolito despegado del capilar. En el segundo caso, cuando se utilizó 0,7gr de HPAA se observó un material homogéneo con macroporos pequeños, pero levemente despegado del capilar (**Figura 2.13 (b)**).

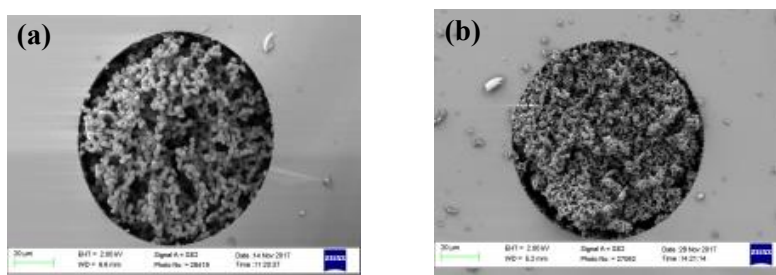


Figura 2.13. (a) 1,1gr, (b) 0,7gr HPAA; 625 μ L HNO₃ (4M); 550 μ L H₂O; 360 μ L FA; 2,5mL TEOS; 1,5M urea; T_{gelificación}=40°C; d.i.=100 μ m.

2.3.4. Efecto de la adición de MTMS

Con el fin de evitar el encogimiento, se puede reemplazar parte del precursor de silicio por MTMS. De esta manera, se obtienen menos silanoles expuestos en la superficie para reaccionar entre sí durante el envejecimiento del monolito, por lo que el fenómeno de contracción del material es mucho menor. Se ensayaron mezclas en las que se reemplazó un 20%v/v de TEOS con MTMS para diferentes composiciones de HPAA. Para la fabricación de estos monolitos, se mantuvieron constantes las cantidades de HNO₃ (625 μ L), H₂O (550 μ L) y FA (360 μ L) y se repitieron las masas ensayadas anteriormente de HPAA (0,7; 0,9; 1,1; 1,3 y 1,5gr). Para cada una de estas mezclas, se hicieron duplicados, uno de los cuales contenía 2,5mL de TEOS y el otro con una mezcla de 2,0mL de TEOS y 0,5mL de MTMS. Las imágenes SEM de los monolitos obtenidos para cada una de las mezclas estudiadas se muestran en la **Figura 2.14**.

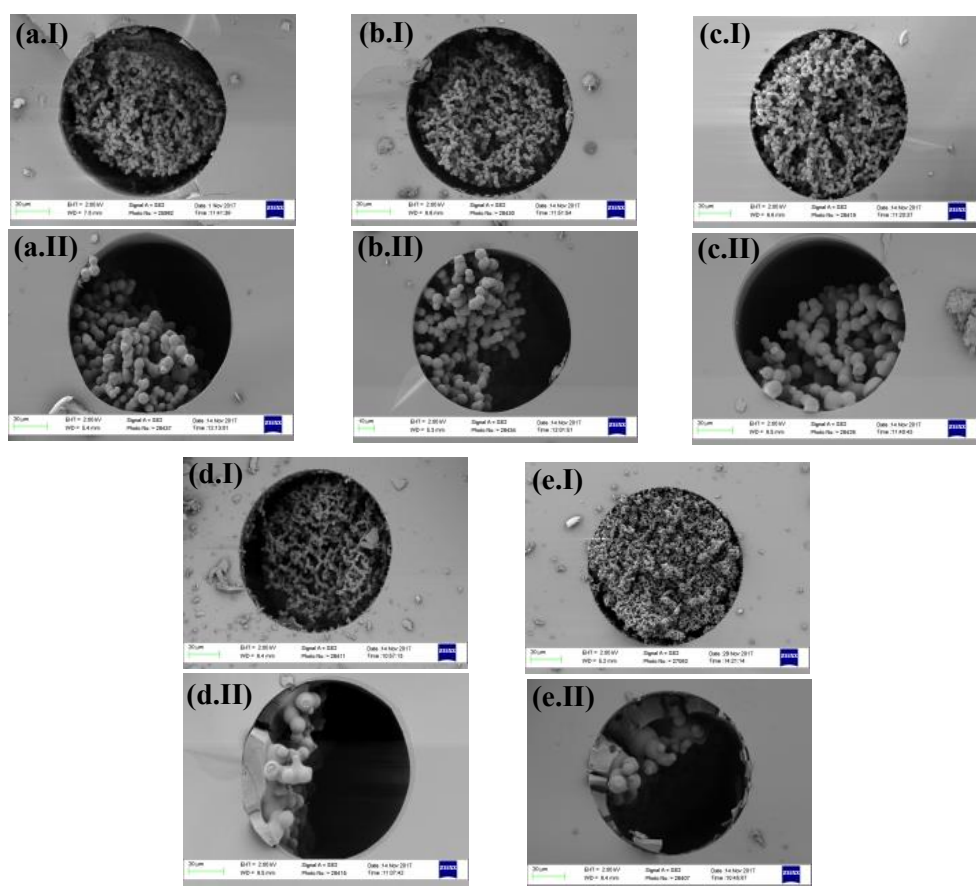


Figura 2.14. Imágenes SEM de los monolitos obtenidos con (a) 1,5gr, (b) 1,3gr, (c) 1,1gr, (d) 0,9gr, (e) 0,7gr HPAAs; 625 μ L HNO₃ (4M); 550 μ L H₂O; 360 μ L FA; (I) 2,5mL TEOS, (II) 2mL TEOS y 0,5mL MTMS; 1,5M urea; T_{gelificación}=40°C; d.i.=100 μ m.

En las imágenes de la **Figura 2.14** se puede observar que no sólo la adición de MTMS no mejoró la adhesión del monolito al capilar, sino que empeoró su estructura. Esto puede deberse a dos factores. Por un lado, se conoce que la hidrólisis del MTMS es más rápida que la del TEOS[15], por lo que esta diferencia en las cinéticas de reacción pudo haber ocasionado dos etapas en las reacciones de condensación, la primera entre silanoles provenientes del MTMS y una segunda etapa entre los silanoles del TEOS remanente. Se intentó evitar este fenómeno al agregar el MTMS en un momento posterior a la hidrólisis y disolución total del TEOS, pero a pesar de esto no se obtuvieron resultados positivos. Se desconoce si las diferencias de reactividad entre el MTMS y TEOS pudieron haber jugado un papel importante en las reacciones posteriores. Por otro lado, el TEOS genera etanol como producto de hidrólisis, mientras que el MTMS da lugar a la formación de metanol, por lo que la polaridad de la mezcla

resultante en cada caso es diferente y es probable que la estabilidad del gel se vea afectada de diferente manera.

2.3.5. Efecto de la temperatura de gelificación

Un aumento en la temperatura de gelificación retrasa la descomposición espinodal debido a que aumenta la miscibilidad de las fases. Además, un incremento de la temperatura favorece las reacciones de condensación, por lo que el gel se forma más rápidamente. Estos dos factores promueven la formación de macroporos más pequeños. Se evaluaron diferentes temperaturas de gelificación para las dos mejores composiciones obtenidas en el estudio anterior, es decir 0,7 y 1,1gr de HPAA. Se estudiaron temperaturas de gelificación de entre 40 y 65°C. Las imágenes SEM de los monolitos resultantes, se muestran en la **Figura 2.15**.

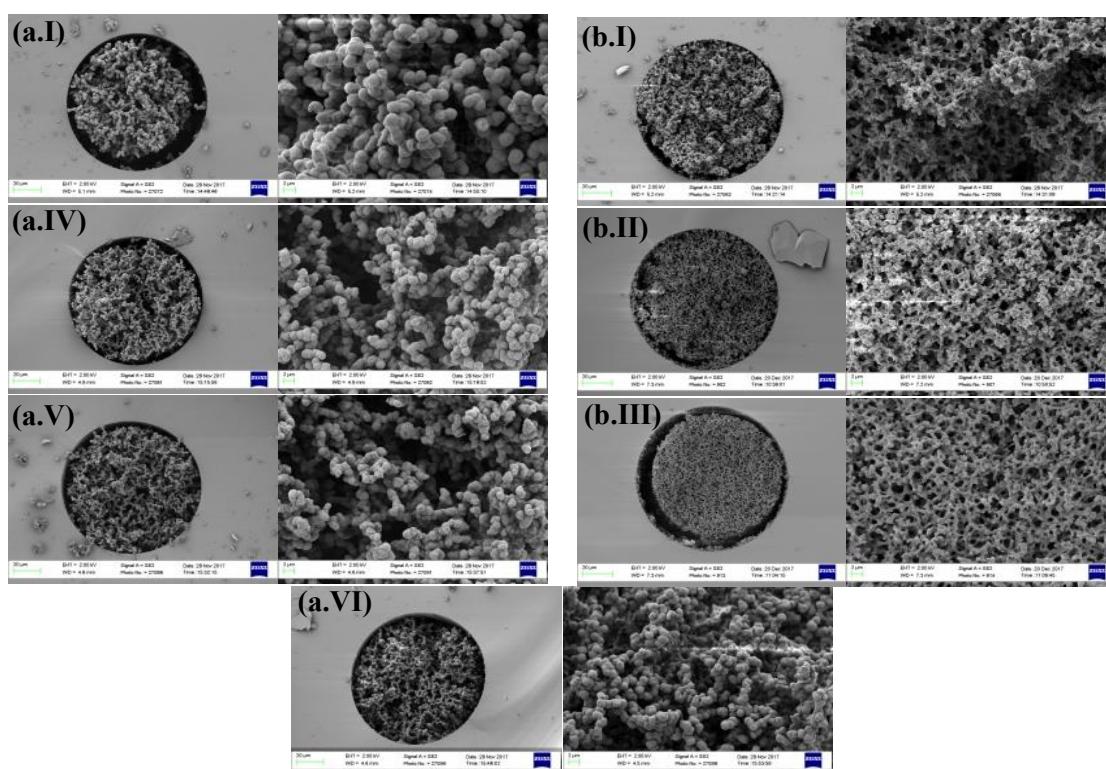


Figura 2.15. Imágenes SEM de los monolitos conteniendo (a) 1,1gr, (b) 0,7gr HPAA; 625 μ L HNO₃ (4M); 550 μ L H₂O; 360 μ L FA; 2,5mL TEOS; 1,5M urea; T_{gelificación}= (I) 40°C, (II) 45°C, (III) 50°C, (IV) 55°C, (V) 60°C, (VI) 65°C; d.i.=100 μ m.

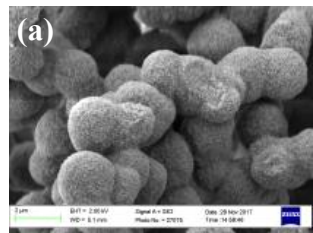
Hay tres condiciones interesantes en esta serie de experimentos. En primer lugar, cuando se utilizó 1,1gr de HPAA y 60°C de temperatura de gelificación, se observó un monolito completamente adherido a la pared del capilar, situación que se repitió al

realizar un duplicado del experimento. Sin embargo, al utilizar este monolito como columna cromatográfica, se empezó a romper incluso a bajas presiones, mostrando una elevada fragilidad. En segundo lugar, el monolito sintetizado con 1,1gr de HPAA y gelificado a 65°C también mostró una adhesión total al capilar, sin embargo, cuando se repitió esta condición, el gel obtenido resultó tan duro que no se pudo lavar con H₂O para continuar con la síntesis, por lo que resultó experimentalmente inviable. El tercer caso, al utilizar 0,7gr de HPAA y 45°C como temperatura de gelificación, se observó un monolito con buena distribución de poros y resistencia mecánica, aunque no completamente adherido a la pared del capilar.

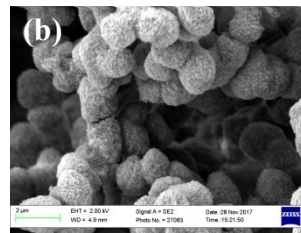
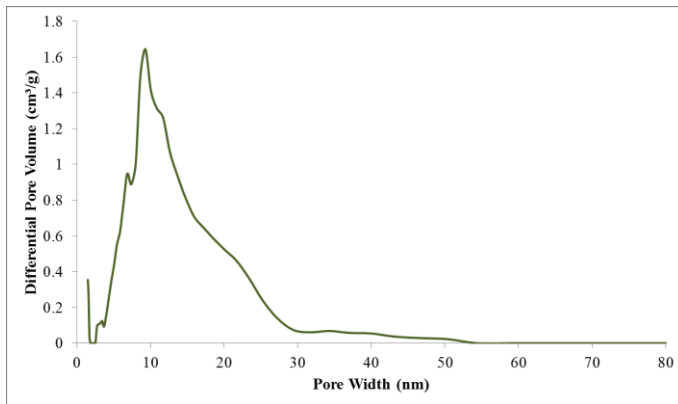
Para tener un mayor conocimiento de la morfología de estos monolitos se midió la permeabilidad para aquellos que estaban adheridos a la pared del capilar. Se utilizaron muestras preparadas en viales de 10mL (síntesis en “bulk”) para realizar las medidas de área superficial mediante isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno (BET). Los resultados obtenidos de los distintos estudios se muestran en las **Figuras 2.16 y 2.17**.

Se puede observar que los valores de área superficial (S_g) obtenidos experimentalmente superan los 200m²/gr, lo cual da una idea del potencial de estos materiales para su uso como columnas cromatográficas. Otras observaciones interesantes de estos análisis son:

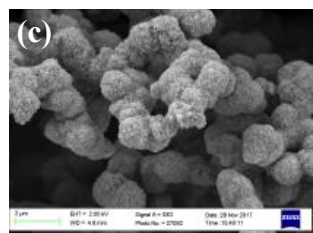
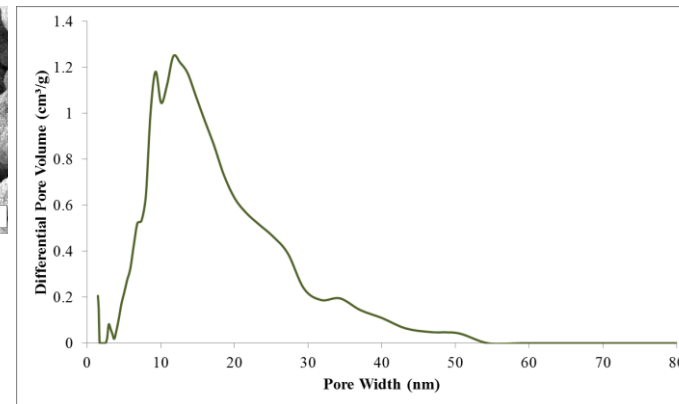
- i.* que el tamaño de los mesoporos es siempre el mismo (entre 10 y 20nm), lo cual podría deberse a que la concentración de urea utilizada en todos los casos es la misma, y
- ii.* que a medida que aumenta la temperatura de gelificación, el área superficial disminuye, lo que puede atribuirse a que se obtienen geles más duros, por lo que la penetración de la solución de urea en estos materiales puede ser menor y por lo tanto se formaría una menor cantidad de mesoporos.



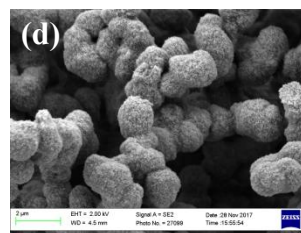
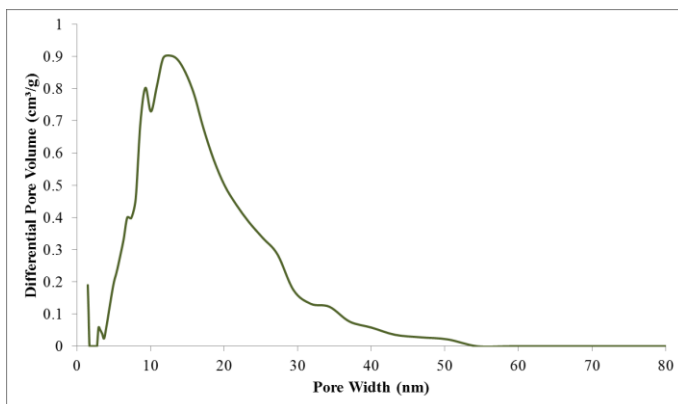
$S_g=349\text{m}^2/\text{gr}$
 $B_0=2,1 \times 10^{-12}\text{m}^2$



$S_g=257\text{m}^2/\text{gr}$



$S_g=205\text{m}^2/\text{gr}$
 $B_0=6,8 \times 10^{-13}\text{m}^2$



$S_g=212\text{m}^2/\text{gr}$

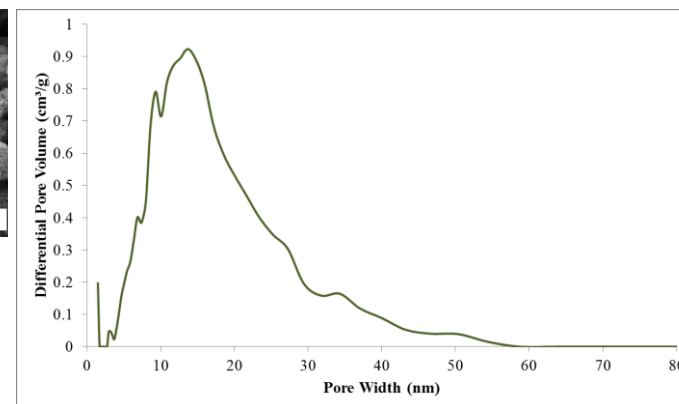
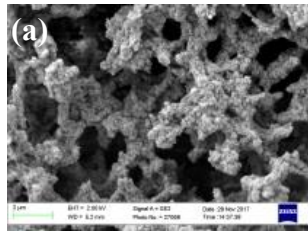
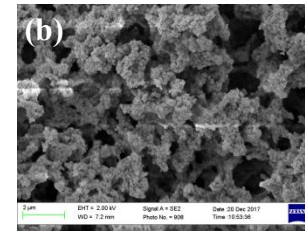
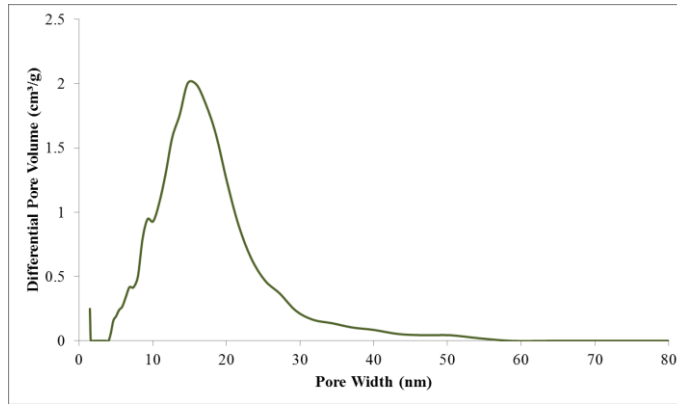


Figura 2.16. Propiedades morfológicas de los monolitos con 1,1gr de HPAA a temperaturas de gelificación de (a) 40°C, (b) 55°C, (c) 60°C y (d) 65°C.

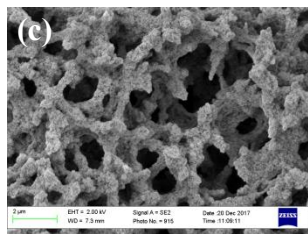
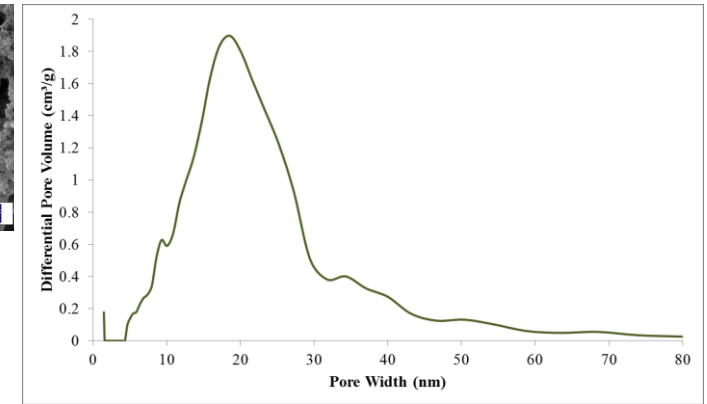


$$S_g = 296 \text{ m}^2/\text{gr}$$



$$S_g = 266 \text{ m}^2/\text{gr}$$

$$B_0 = 4,7 \times 10^{-14} \text{ m}^2$$



$$S_g = 247 \text{ m}^2/\text{gr}$$

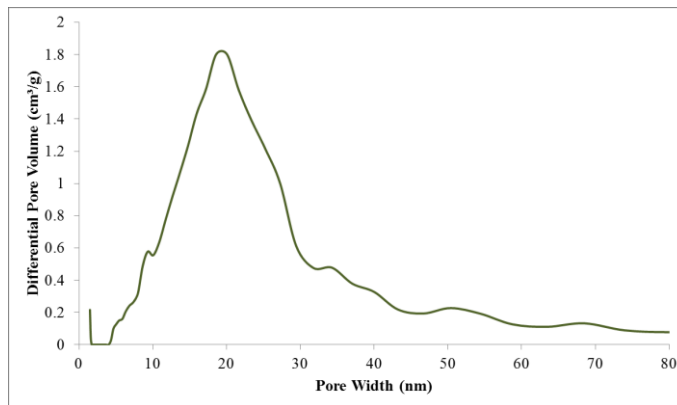


Figura 2.17. Propiedades morfológicas de los monolitos con 0,7gr de HPAa a temperaturas de gelificación de (a) 40°C, (b) 45°C y (c) 50°C.

2.3.6. Efecto del diámetro interno del capilar

Se conoce que el encogimiento del monolito es mayor a medida que aumenta el diámetro interno del capilar en el que se realiza la síntesis[16]. Para verificar este comportamiento, se ensayó la mezcla de 0,7gr de HPAA, 625 μ L de HNO₃, 550 μ L de H₂O, 360 μ L de FA, 2,5mL de TEOS y 45°C de temperatura de gelificación en capilares de diferentes diámetros internos. En la **Figura 2.18** se muestran los resultados.

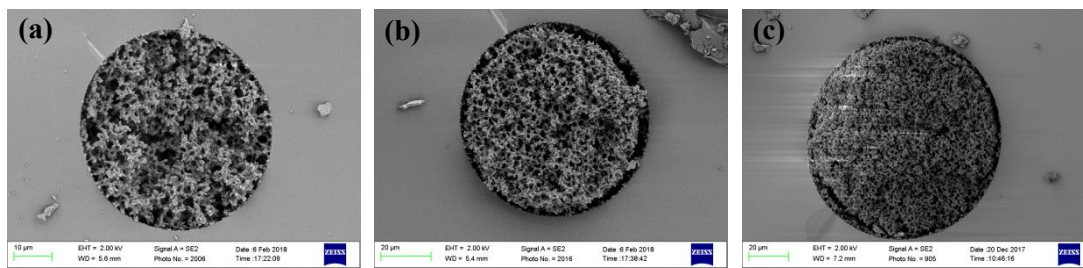


Figura 2.18. Imágenes SEM de los monolitos sintetizados a partir de 0,7gr HPAA; 625 μ L HNO₃ (4M); 550 μ L H₂O; 360 μ L FA; 2,5mL TEOS; 1,5M urea; T_{gelificación}=45°C; d.i.= (a) 50 μ m; (b) 75 μ m; (c) 100 μ m. El aumento es diferente en todos los casos.

Se observa que el único caso en que el monolito está totalmente adherido a la pared es cuando la síntesis se realizó en tubos capilares de 50 μ m de diámetro interno.

2.4. Conclusiones parciales

- Se fabricaron materiales monolíticos de sílice, evaluando la influencia de diversas variables que afectan su estructura: peso molecular y cantidad del polímero orgánico, cantidad del precursor de silicio, presencia de un organotrioxisilano, temperatura de gelificación y diámetro interno del tubo capilar.
- Se logró obtener un monolito adherido a la pared del capilar en capilares de 50 μ m de diámetro interno a partir de 0,7gr de HPAA, 625 μ L de HNO₃ (4M), 550 μ L de H₂O, 360 μ L de FA y 2,5mL de TEOS.
- El monolito preparado presentó muy buena resistencia mecánica, alta área superficial (266m²/gr) y buena permeabilidad (4,7x10⁻¹⁴m²), propiedades que lo hacen adecuado para ser empleado como soporte para columnas de HPLC capilar.

2.5. Bibliografía

- [1] Levi, David; Zayat, M. (Ed.), *The Sol-Gel Handbook*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2015.
- [2] Nakanishi, K., Pore Structure Control of Silica Gels Based on Phase Separation. *J. Porous Mater.*, 1997, 4, 67–112.
- [3] Adachi, T., Sakka, S., The Role of N,N-Dimethylformamide, a DCCA, in the Formation of Silica Gel Monoliths by Sol-Gel Method. *J. Non-Crystalline Solids*, 1988, 99, 118–128.
- [4] Feke, G. T., Prins, W., Spinodal Phase Separation in a Macromolecular Sol-Gel Transition. *Macromolecules*, 1974, 7, 527–530.
- [5] Nakanishi, K., Tanaka, N., Sol – Gel with Phase Separation . Hierarchically Porous Materials Optimized for High-Performance Liquid Chromatography Separations. *Acc. Chem. Res.*, 2007, 40, 863–873.
- [6] Unger, K. K., Tanaka, N., Machtejevas, E. (Eds.), *Monolithic Silicas in Separation Sciences*. Wiley-VCH, Singapore, 2011.
- [7] Desire, C. T., Hilder, E. F., Arrua, R. D., *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons, Inc., 2017, pp. 1–37.
- [8] Hench, L. L., Wang, S. H., The Sol-Gel Glass Transformation of Silica. *Phase Transitions*, 2006, 24-26, 37–41.
- [9] Núñez, O., Nakanishi, K., Tanaka, N., Preparation of Monolithic Silica Columns for High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2008, 1191, 231–252.
- [10] Ikegami, T., Tanaka, N., Recent Progress in Monolithic Silica Columns for High-Speed and High-Selectivity Separations. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 2016, 9, 317–342.
- [11] Kazakevich, Y., LoBrutto, R. (Eds.), *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Wiley, Hoboken, NJ, USA, 2007.
- [12] Lebeau, B., Gaslain, F., Fernandez-Martin, C., Babonneau, F., in: Valtchev, V., Mintova, S., Tsapatsis, M. (Eds.), *Ordered Porous Solids*. Elsevier B.V., 2009, pp. 283–308.
- [13] Morisato, K., Miyazaki, S., Ohira, M., Furuno, M., Nyudo, M., Terashima, H., Nakanishi, K., Semi-Micro-Monolithic Columns Using Macroporous Silica Rods with Improved Performance. *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 7384–7387.
- [14] McNeill, I. C., Sadeghi, S. M. T., Thermal Stability and Degradation Mechanisms of Poly(Acrylic Acid) and its Salts: Part 1-Poly(Acrylic Acid). *Polym. Degrad. Stab.*, 1990, 29, 233–246.
- [15] Kanamori, K., Nakanishi, K., Controlled Pore Formation in Organotrialkoxysilane-Derived Hybrids: from Aerogels to Hierarchically Porous Monoliths. *Chem. Soc. Rev.*, 2011, 40, 754–770.
- [16] Hara, T., Kobayashi, H., Ikegami, T., Nakanishi, K., Tanaka, N., Performance of Monolithic Silica Capillary Columns with Increased Phase Ratios and Small-Sized Domains. *Anal. Chem.*, 2006, 78, 7632–7642.

3. Monolito de poli(GMA-*co*-EDMA) como soporte para columnas de cLC

3.1. Introducción

Los polímeros monolíticos (o monolitos) orgánicos se sintetizan por polimerización radicalaria en solución de un **monómero funcional**, que aportará los grupos funcionales que determinarán la química superficial del soporte y un **agente entrecruzante**, que permitirá formar la estructura tridimensional con la rigidez necesaria para soportar el pasaje de la fase móvil. La polimerización se realiza en presencia de una mezcla de solventes que se denominan **solventes porogénicos**, que son los formadores de poros de la estructura y tienen la propiedad de disolver a los monómeros pero no al polímero. En un momento determinado de la reacción, las cadenas en crecimiento precipitan y se forma una estructura globular en forma de “clusters” o racimos, característica de este tipo de materiales. Para comenzar la reacción es necesario un **iniciador radicalario**, el cual se descompone por iniciación térmica o por radiación e inicia la reacción en cadena. El monolito resultante posee glóbulos interconectados, entre los cuales hay canales (**macroporos**) que dan a la columna una alta permeabilidad para el pasaje de fase móvil y un fácil acceso de los analitos a la fase estacionaria mediante el flujo convectivo.

La **Figura 3.1** muestra la estructura química de los monómeros y entrecruzantes frecuentemente utilizados en la síntesis de monolitos orgánicos[1].

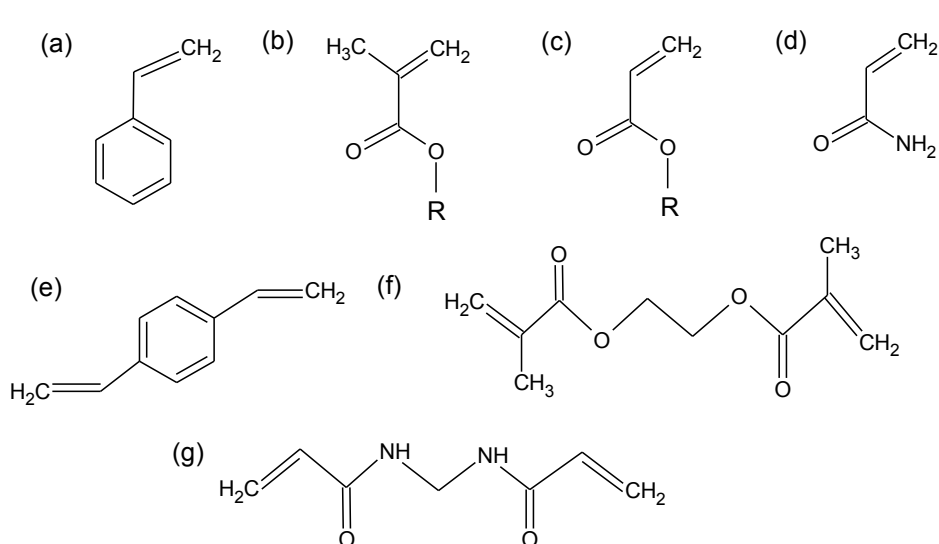


Figura 3.1. Estructura química de algunos monómeros ((a)-(d)) y entrecruzantes ((e)-(g)) frecuentemente utilizados en la síntesis de monolitos orgánicos. (a) Estireno, (b) metacrilato, (c) acrilato, (d) acrilamida, (e) divinilbenceno, (f) dimetacrilato de etilenglicol y (g) N,N'-metilenbis(acrilamida). R es un resto alquílico.

3.1.1. Variables que afectan la estructura del monolito

Efecto de la composición de los solventes porogénicos

En general como solvente formador de la estructura macroporosa durante la síntesis del monolito se emplea una mezcla de solventes de diferente polaridad. Esta mezcla debe disolver a los monómeros pero no al polímero, por lo que, cuando la mezcla llega al punto de saturación, se produce una separación de fases. Si la separación de fases es temprana, es decir que los solventes porogénicos disuelven bien a los monómeros pero no al polímero, las pocas cadenas entrecruzadas que precipitaron quedan solvatadas preferencialmente por los monómeros aún en solución. De esta manera siguen creciendo en tamaño y la estructura resultante es de glóbulos grandes y con poros grandes. Por el contrario, si la separación de fases es tardía, lo cual ocurre con una mezcla de solventes que solvate bien al polímero, éste crece en solución y forma un monolito más compacto, con glóbulos más pequeños y poros más chicos, lo que resulta en un monolito menos permeable al pasaje de solvente.

Efecto de la cantidad de entrecruzante

Al aumentar la cantidad de agente entrecruzante, el polímero precipita más temprano en la síntesis, dado que se genera un polímero más compacto y por lo tanto difícil de solvatar. Al tener un mayor grado de entrecruzamiento, la cantidad de grupos funcionales provenientes del monómero es menor, por lo que los monómeros no solvatan muy bien al polímero precipitado y los glóbulos permanecen pequeños. Esto da lugar a un material con un mayor número de macroporos, pero más pequeños[2].

Efecto de la temperatura de polimerización

Al incrementar la temperatura de reacción, hay dos efectos que ocurren en simultáneo. Por un lado, se generan más núcleos de polimerización debido a una mayor rapidez de descomposición del iniciador radicalario, lo cual da lugar a un mayor número de glóbulos pequeños y por lo tanto un material menos permeable[2]. Por otro lado, al incrementar la temperatura aumenta la solubilidad del polímero en los solventes porogénicos, lo cual retrasa la separación de fases. Cuanto mayor es el grado de avance de la polimerización en solución, más compacta es la estructura final y por lo tanto

menor el tamaño de los macroporos[3]. Ambos factores promueven la formación de un monolito de menor permeabilidad.

3.1.2. Tratamientos para aumentar el área superficial

Los monolitos orgánicos suelen tener áreas superficiales muy bajas, del orden de los $10\text{m}^2/\text{gr}$ [4], por lo que se han propuesto algunas estrategias para mejorar este parámetro y por lo tanto la performance de las columnas cromatográficas[5], entre ellas:

- *Finalización de la reacción antes de alcanzar una conversión total:* Cuando se finaliza la polimerización a tiempos cortos de reacción, no sólo se logra un monolito con glóbulos más pequeños, sino que muchas veces éstos poseen el exterior mesoporoso. Esta estructura mesoporosa se debe a que a bajas conversiones, el polímero en crecimiento tiene un alto grado de entrecruzamiento[6], y cuando ocurre la separación de fases, la reacción continúa preferencialmente con los monómeros, ya que éstos solvatan mejor al polímero en fase sólida. Este gradiente de entrecruzamiento puede generar una capa exterior de tipo gel mesoporosa[5].
- *Modificación de la superficie con nanomateriales:* Una vez finalizada la polimerización, se puede funcionalizar la superficie con algún material de alta área superficial, tal como nanopartículas, nanotubos de carbono o estructuras organometálicas (MOF).
- *Hiper-entrecruzamiento:* Luego de la obtención del monolito, se pueden hacer reaccionar los grupos funcionales del monómero con un reactivo bifuncional apropiado que actúe como puente para obtener una estructura rica en meso o microporos superficiales.

3.1.3. Post-funcionalización de monolitos fabricados con GMA

Un monómero muy utilizado en la síntesis de monolitos es el metacrilato de glicidilo (GMA), debido a que posee un grupo epóxido, el cual es susceptible a una gran variedad de reacciones mediante la apertura del anillo, inestable por la gran tensión que soporta. Son muchos los nucleófilos capaces de reaccionar con el epóxido del GMA, permitiendo así unir covalentemente diversos grupos funcionales al monolito. Estas reacciones se pueden realizar sobre el monómero y luego polimerizar el GMA funcionalizado o se puede sintetizar el monolito primero y luego funcionalizar los

grupos epóxido superficiales. Las reacciones sobre el monómero requieren un control estricto de las condiciones experimentales, ya que éste se descompone muy fácilmente, por lo que resulta más sencillo funcionalizar el monolito ya sintetizado. Por otro lado, al optimizar en primer lugar la síntesis del monolito de GMA, se obtiene un soporte que actúa como precursor de columnas cromatográficas con una variedad tan amplia de fases estacionarias como reacciones de funcionalización se puedan realizar.

En la **Figura 3.2** se encuentran algunos ejemplos de reacciones de apertura del anillo que se realizaron en monolitos de poli(GMA-*co*-EDMA) (metacrilato de glicidilo-*co*-dimetacrilato de etilenglicol) para la adición de diversos grupos funcionales para la síntesis de columnas cromatográficas[7].

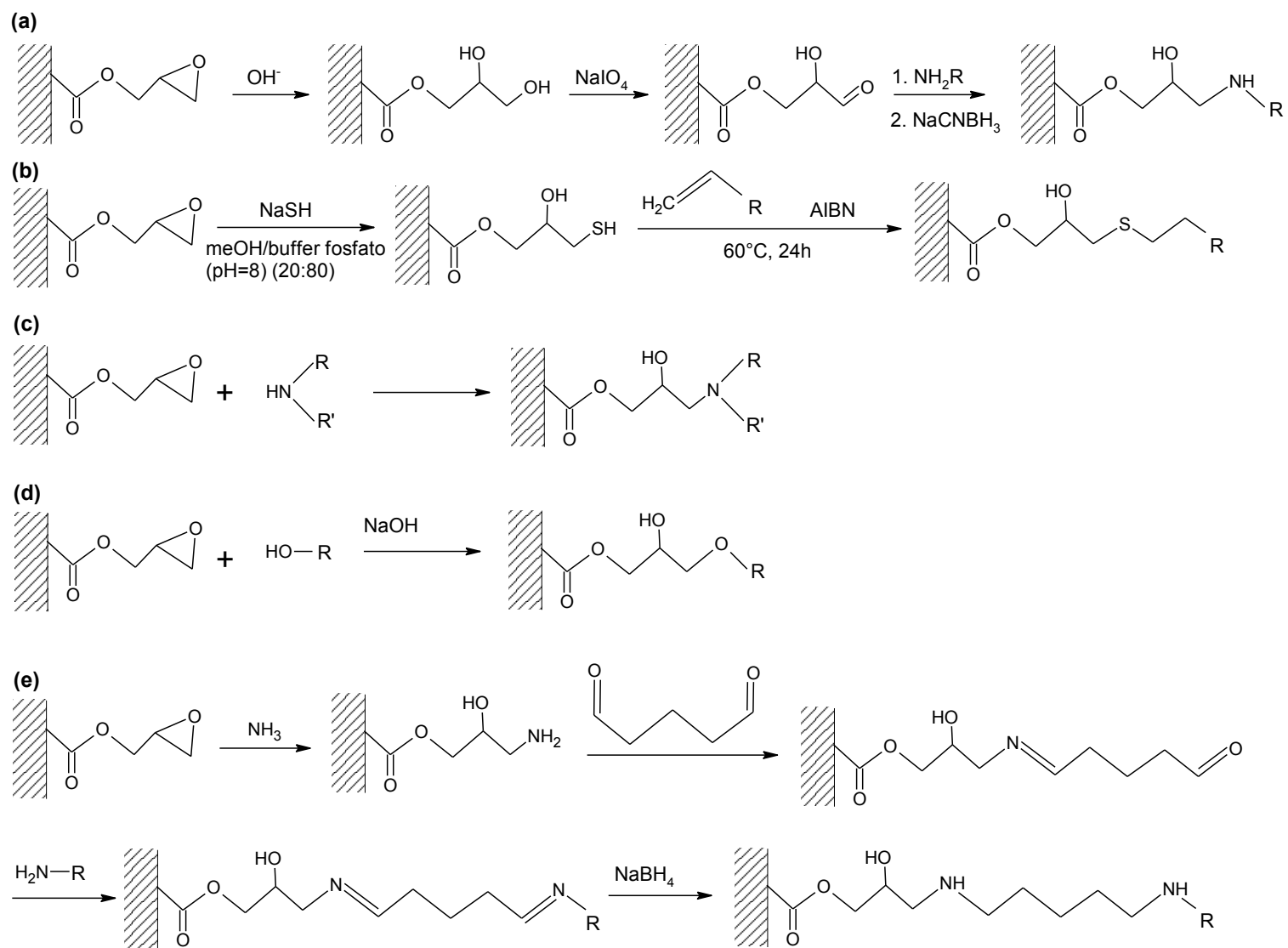


Figura 3.2. Reacciones de apertura del anillo del grupo epóxido con diferentes reactivos.

3.2. Parte experimental

3.2.1. Reactivos

Para la síntesis de monolitos orgánicos, se utilizaron los siguientes reactivos: metacrilato de glicidilo (**GMA**) (97,0%), dimetacrilato de etilenglicol (**EDMA**) (98%), peróxido de lauroilo (**LPO**) (97%), dodecanol (**DDOH**) (98%) y metacrilato de 3-(trimetoxisilil) propilo (**γ -MAPS**) (98%) de Sigma Aldrich, ciclohexanol (**CiOH**) (Carlo Erba, 99%), acetona (Tedia, 99.9%), NaOH (Mallinckrodt, 97%), HCl (Anedra, 37%p/p), etanol absoluto (ApliChem Panreac, 99,9%), ácido acético (HAc) (Merck, 99,8%), y metanol (meOH) (Tedia, 99.9%).

Estos monolitos se sintetizaron en capilares de sílice fundida de 400 μ m de diámetro interno recubiertos con poliimida (Polymicro Technologies).

3.2.2. Equipamiento

Para la síntesis de los monolitos orgánicos se utilizaron los siguientes equipos: sonicador (Bransonic 5), estufa (Fisher) y bomba de infusión a jeringa (Razel A-99).

Las medidas de permeabilidad se realizaron en un equipo de HPLC (Hewlett Packard 1100) con desgasificador, bomba binaria y detector UV-Vis de longitud de onda variable, adaptado a escala miniaturizada. Dado que el caudal mínimo suministrado por la bomba es de 0,05mL/min, muy elevado para tubos capilares, fue necesario disminuir el caudal en un orden de 10 veces. Para ello se empleó un divisor de flujo modelo P470 (Upchurch, Chromtech, EEUU) que permite emplear caudales del orden de los 5 μ L/min. Para el sistema de inyección, se empleó una válvula de seis vías MXT Series II (Rheodyne, IDEX, EEUU) y un loop de inyección de 0,1 μ L realizado con un capilar de sílice fundida (**Figura 3.3**). Todas las conexiones se realizaron con capilares de 50 μ m de d.i. (**Figura 3.4**) y acoples (end-fittings) para tuberías de diámetros a escala micro, como se muestra en la **Figura 3.3**. También se utilizó un filtro “in-line” de PEEK con poros de 0,5 μ m (Upchurch, IDEX, EEUU) para evitar la presencia de burbujas en los solventes de la fase móvil en el sistema capilar.

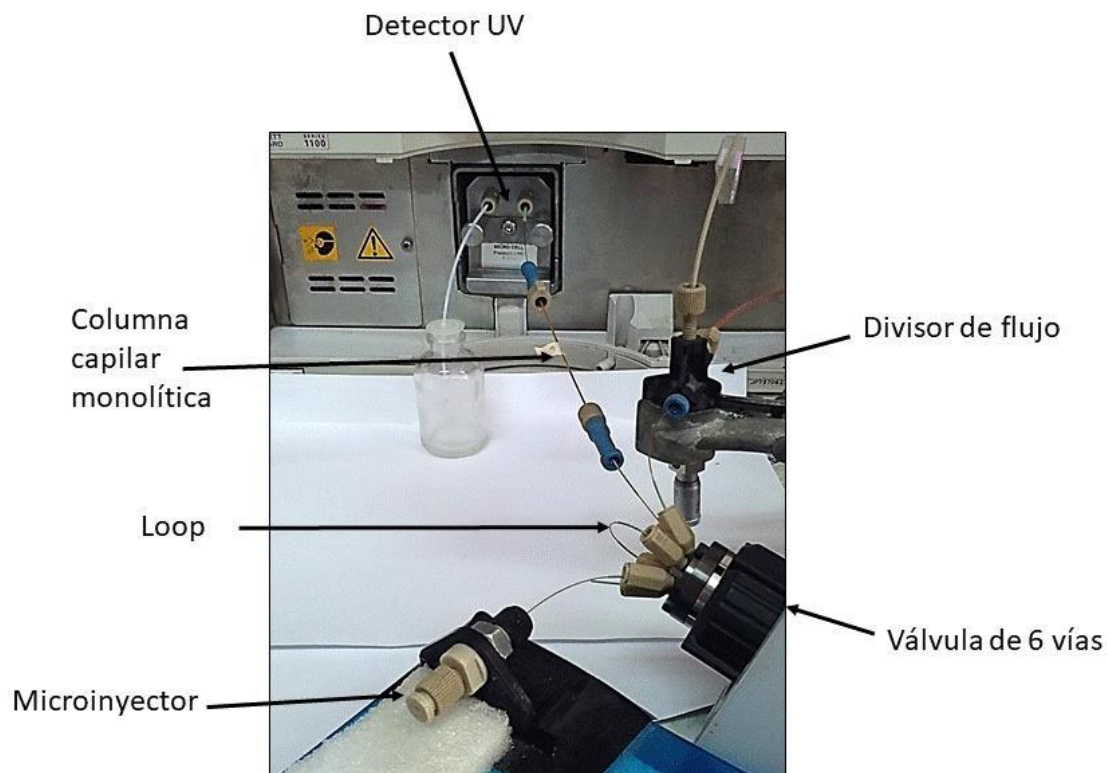


Figura 3.3. Fotografía del sistema de escala micro acoplado al equipo de HPLC.

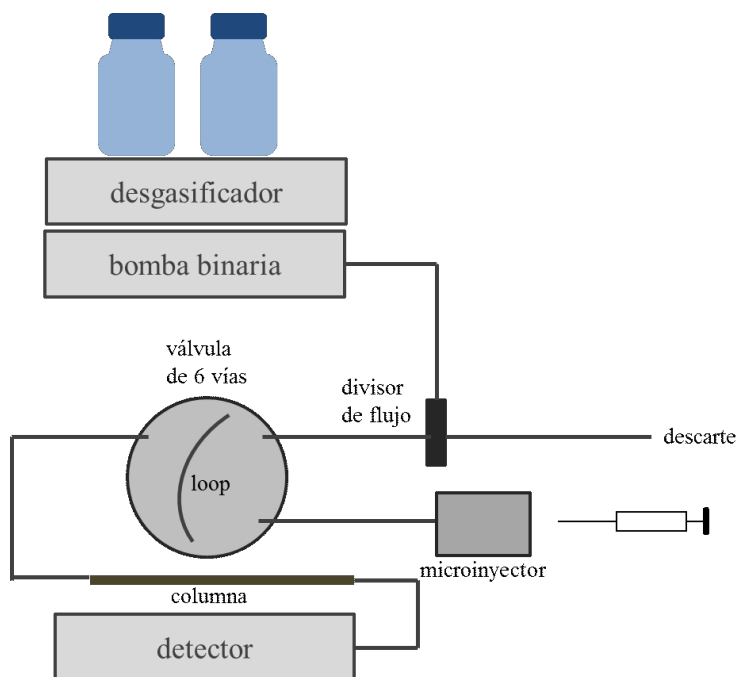


Figura 3.4. Esquema del equipo de HPLC utilizado para los ensayos a escala micro.

Para la caracterización de estos materiales se utilizó un equipo para medir isothermas de adsorción de N_2 tipo BET (Micrometetics ASAP 2020), un porosímetro de intrusión de

Hg (Micrometics, Autopore III 9410) y un microscopio electrónico de barrido (FEI Quanta 200).

3.2.3. Síntesis del monolito de poli(GMA-co-EDMA)

Para la síntesis del monolito orgánico, se utilizó metacrilato de glicidilo (GMA) como monómero funcional (**Figura 3.1 (b)**), donde R corresponde a un glicidilo), dimetacrilato de etilenglicol (EDMA) como entrecruzante (**Figura 3.1 (f)**), dodecanol/ciclohexanol (DDOH/CiOH) como mezcla porogénica, y peróxido de lauroilo (LPO) como iniciador radicalario.

En primer lugar se preparó la mezcla de reacción pesando los reactivos: LPO (1%p/p respecto a los monómeros), GMA, EDMA (30%p/p en conjunto respecto a la mezcla total) y los solventes porogénicos (70%p/p). La mezcla obtenida se sonicó para favorecer la disolución del iniciador, lo cual se realizó en baño de hielo para evitar el inicio de la reacción de polimerización y luego se burbujeó con N₂ para remover el O₂ presente, ya que éste inhibe la propagación de los radicales. Se llenaron los capilares previamente tratados y se taparon los extremos con septum de goma. Se colocaron las columnas en una estufa a 60°C durante 20hs y finalmente se lavaron con metanol para remover los monómeros que no reaccionaron así como los solventes de la reacción. En la **Figura 3.5** se muestran fotografías comparativas de un capilar vacío y una columna monolítica, donde se puede observar que el lecho relleno es macroscópicamente homogéneo.



Figura 3.5. Fotografías de un capilar vacío (arriba) y relleno con un monolito de poli(GMA-co-EDMA) (abajo), sin aumento (izquierda) y con aumento de 60x (derecha).

Estudio del efecto de la composición de los solventes porogénicos

Considerando la distribución de poros reportada en la bibliografía para monolitos de metacrilatos[8], se eligió una mezcla que suministre un volumen de poros elevado y que

a la vez ofrezca una buena resistencia mecánica. Ésta es una relación de compromiso dado que ambas propiedades son inversamente proporcionales. La misma consistió de 30%p/p de monómeros (20%p/p de GMA y 10%p/p de EDMA), 1%p/p de LPO (respecto a los monómeros) y 70%p/p de los solventes porogénicos DDOH/CiOH. Se varió la relación de porógenos para evaluar el efecto de la polaridad de la mezcla en las propiedades porosas del material resultante. En la **Tabla 3.1** se pueden observar las masas empleadas experimentalmente para la fabricación de los monolitos. Se realizaron triplicados de las columnas para evaluar también la reproducibilidad en la fabricación de las mismas

Tabla 3.1. Masas (mg) de los reactivos empleados en las mezclas de polimerización utilizadas en el estudio del *efecto de la composición de porógenos* (20 horas de polimerización a 60°C).

%p/p	DDOH	LPO	GMA	EDMA	DDOH	CiOH
0		2,9	201,7	99,5	-	701,9
5		2,9	199,4	100,9	49,3	651,4
10		3,2	202,8	104,6	103,4	606,7
15		2,9	201,4	99,1	149,6	551,9
20		3,1	199,3	99,4	200,7	502,0
25		2,9	198,8	103,2	251,7	451,0
30		3,1	199,9	104,0	295,1	398,0
35		3,1	201,1	102,7	345,0	356,2

Efecto del tiempo de polimerización

Para evaluar el efecto del tiempo de polimerización en la estructura del monolito, se ensayaron monolitos de 10 y 15%p/p DDOH. Las composiciones se muestran en la **Tabla 3.2**. En este caso, las columnas se fabricaron por polimerización a 60°C pero tiempo de reacción variable entre 2 y 20 horas. Para finalizar la reacción de polimerización, las columnas se lavaron con metanol inmediatamente después de sacarlas de la estufa para remover los monómeros que quedaron sin reaccionar. Las columnas se prepararon en tubos capilares de 8cm de longitud, realizando un único

replicado por tiempo de polimerización, excepto para las columnas de tiempos de reacción de 6, 8 y 14 horas, para las cuales se realizó un duplicado, pero de 20cm de longitud para evaluar la resistencia mecánica del monolito.

Para la caracterización morfológica, se realizaron ensayos de porosimetría de intrusión de mercurio (MIP) e isothermas de adsorción tipo BET (Brunauer-Emmett-Teller). Los polímeros monolíticos para estos análisis se obtuvieron dentro de capilares sin pre-tratar para desprenderlos fácilmente de la pared del capilar y expulsarlos, empleando una bomba de infusión, con solución de NaOH 0,1M. De esta manera, el material de las columnas fue caracterizado directamente, sin necesidad de realizar la polimerización en tubos eppendorf para su posterior estudio, como se realiza habitualmente en la literatura. Las composiciones empleadas de cada reactivo para realizar las muestras, figuran en la **Tabla 3.2**.

Tabla 3.2. Masas (mg) de los diferentes reactivos empleados para preparar las mezclas de polimerización para evaluar el *tiempo de polimerización* (2-20horas). En todos los casos T=60°C.

%p/p	DDOH	LPO	GMA	EDMA	DDOH	CiOH
	columnas*					
10	4,5	300,0	152,3	150,2	898,3	
15	4,5	299,8	149,2	226,4	836,7	
	muestras**					
10	12,0	800,1	401,6	400,0	2403,9	
15	12,0	801,1	402,7	600,9	2208,5	

* mezclas para las medidas de permeabilidad **mezclas para la caracterización morfológica

Pre-tratamiento del capilar

Para que el monolito quede adherido a la pared del capilar, ésta debe ser modificada para adicionar grupos vinilo que se entecruzarán con las cadenas del polímero en formación. El pre-tratamiento del capilar se realizó mediante sucesivos lavados con diferentes soluciones. En primer lugar, se lavó el capilar con acetona, luego con H₂O y después con NaOH 0,2M por 30 minutos para activar la superficie. Se volvió a lavar

con H₂O hasta pH neutro y luego con HCl 0,2M por 30 minutos para protonar los silanoles de la pared de sílice (-SiOH). Se lavó nuevamente con H₂O hasta pH neutro, luego con etanol a pH=5 (se llevó a pH con ácido acético), y se hizo circular una solución de metacrilato de 3-(trimetoxisilil) propilo (γ -MAPS) 30%v/v en etanol a pH=5 por 1 hora. En esta etapa, el silano reacciona con la pared del capilar, proporcionando los grupos vinilo sobre los cuales se anclará el monolito, como se muestra en la **Figura 3.6**. Finalmente, se lavó el capilar con etanol a pH=5 y se secó bajo corriente de N₂.

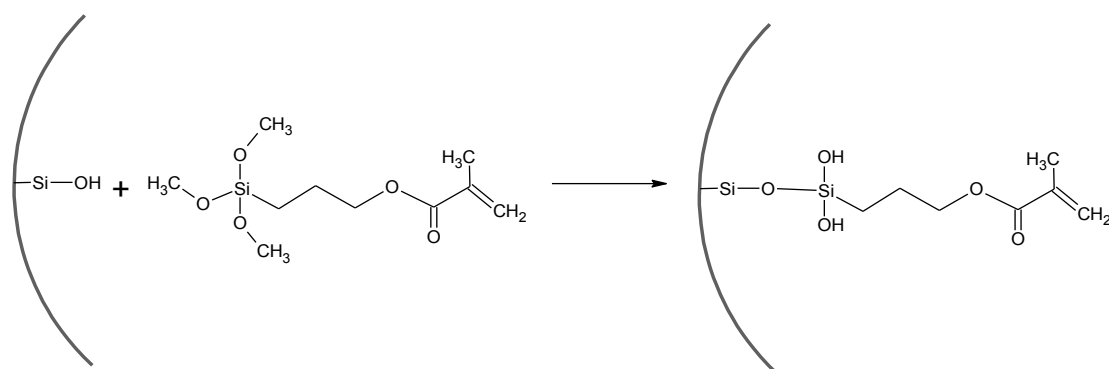


Figura 3.6. Esquema de reacción del metacrilato de 3-(trimetoxisilil) propilo (γ -MAPS) con la pared del tubo capilar.

3.3. Resultados y discusión

En esta sección se muestran los resultados obtenidos del desarrollo de columnas capilares basadas en monolitos orgánicos sintetizados por la polimerización controlada de metacrilato de glicidilo (GMA) y dimetacrilato de etilenglicol (EDMA). También se presenta la caracterización realizada para evaluar las propiedades físicas de estos soportes, como tamaño de poros, área superficial y permeabilidad cromatográfica para determinar su factibilidad de uso como columnas de HPLC capilar.

3.3.1. Efecto de la composición de los solventes porogénicos

La porosidad del lecho monolítico se evaluó empleando la ley de Darcy (**Ecuación 2.1**) para medir la permeabilidad cromatográfica, B_0 . El caudal de la fase móvil se determinó por pesada del solvente recogido en un determinado intervalo de tiempo.

Como fase móvil para la determinación se utilizó una mezcla metanol/H₂O (80:20), cuya viscosidad es conocida[9]. Se sabe que los monolitos orgánicos se solvatan con la fase móvil y esto cambia el tamaño de sus poros. En particular, para un monolito de poli(GMA-co-EDMA), se determinó que en contacto con H₂O el material absorbe hasta un 48% en peso del solvente[10], por lo que el presente estudio de la permeabilidad sólo pretende hacer una evaluación comparativa de la permeabilidad de las columnas y no una determinación de su valor absoluto. En la **Figura 3.7** se muestran los resultados obtenidos en la determinación de B_0 en función del contenido de DDOH en la mezcla de polimerización.

Para las mezclas conteniendo hasta 5%p/p DDOH o más del 20%, se observó una muy baja repetibilidad de las columnas fabricadas. Además, los monolitos fabricados con porcentaje de DDOH mayor al 20%p/p resultaron frágiles, lo que se puso de manifiesto al quebrarse con el pasaje de fase móvil. Es probable que dicha fragilidad sea la causante de la dispersión observada en las medidas de permeabilidad. Las columnas fabricadas con 10 y 15%p/p de DDOH presentaron buena resistencia mecánica y a la vez mostraron reproducibilidad aceptable, por lo que se continuó trabajando con estas dos composiciones.

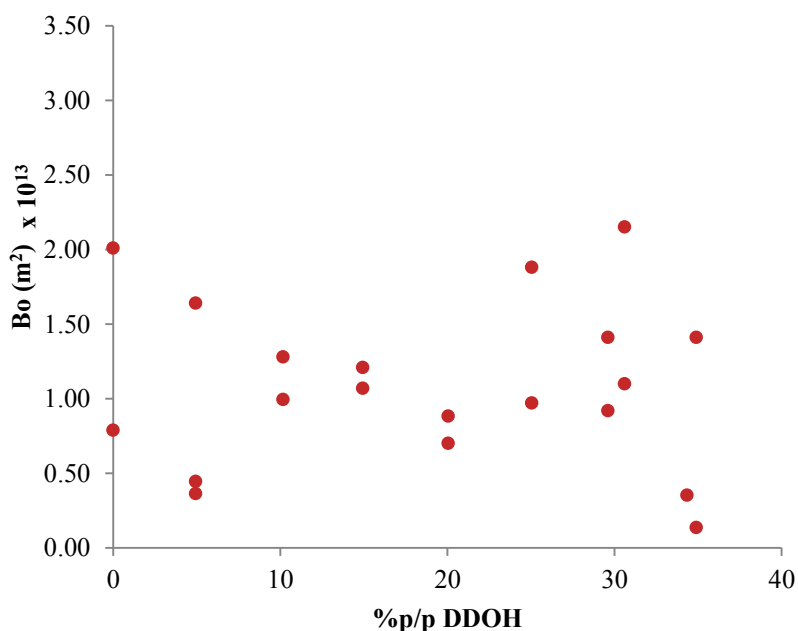


Figura 3.7. Permeabilidad cromatográfica (B_0) vs. %p/p DDOH de la mezcla de reacción para monolitos conteniendo 20%p/p de GMA, 10%p/p de EDMA, 70%p/p de porógenos y 1%p/p de LPO. Fase móvil: meOH/H₂O (80:20).

3.3.2. Efecto del tiempo de polimerización

Cuando el grado de conversión en la polimerización del monolito no es completo, el área superficial del material poroso es mayor, debido a que los glóbulos formados son más pequeños y puede haber una superficie de tipo gel mesoporoso, como se describió en la Sección 3.1.2. Esto genera una mayor eficiencia en la columna y mayores factores de retención para los analitos, aunque da lugar también a un material más frágil[11,12].

Con las composiciones elegidas anteriormente (10 y 15%p/p de DDOH), se realizaron columnas, polimerizando la mezcla a 60°C a tiempo variable entre 2 y 20 horas. La variación de la permeabilidad cromatográfica como parámetro para evaluar la porosidad de los monolitos en función del tiempo de polimerización se representa en la **Figura 3.8**.

Empleando una lupa, se observó que las columnas que polimerizaron 2 horas presentaron un aspecto de gel y se desprendieron de los capilares al lavarlas. Las columnas que polimerizaron 4 y 6 horas no se desprendieron del capilar pero fueron frágiles frente al pasaje de solvente al realizar las medidas de permeabilidad. A partir de las 8 horas de polimerización, las columnas presentaron buena resistencia mecánica para ambas composiciones estudiadas. Puede observarse en la **Figura 3.8** que todas las columnas presentan una alta permeabilidad y que no hay una tendencia clara de este parámetro en función del tiempo de polimerización. Cabe destacar además, que debido a las dimensiones de las columnas utilizadas, los valores de las caídas de presión de las mismas fueron del orden de 1 a 5 bares, los cuales están cercanos a la precisión que tiene el equipo para la medida de la presión, por lo tanto es probable que la dispersión de los datos se deba también a la incertidumbre en las medidas este parámetro.

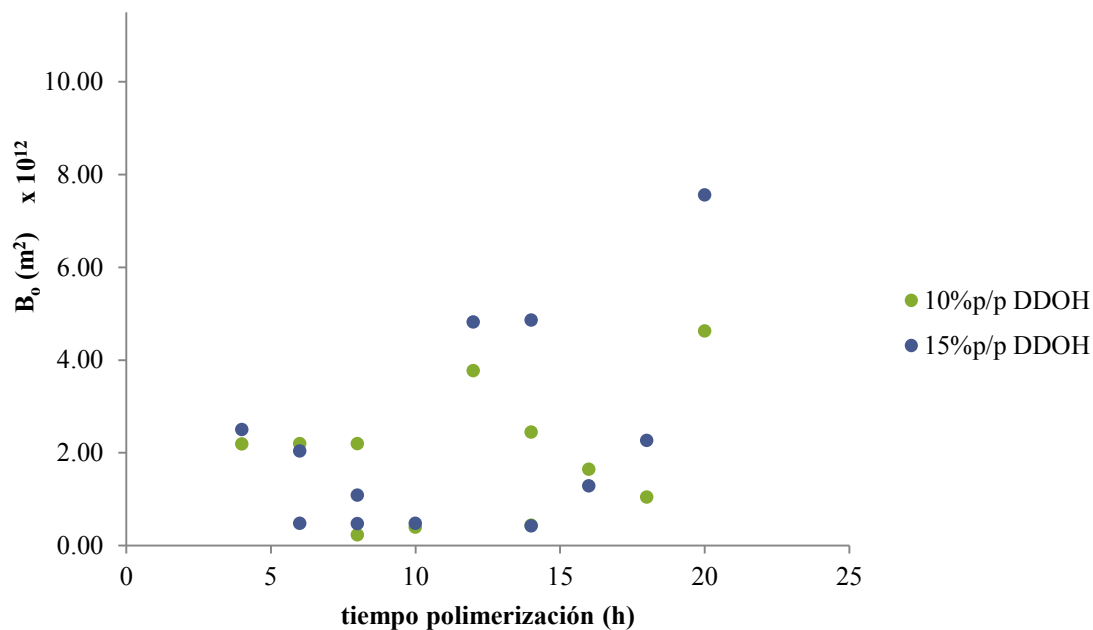


Figura 3.8. Permeabilidad cromatográfica en función del tiempo de polimerización para mezclas de reacción con 10 y 15%p/p de DDOH.

Con el fin de estudiar la distribución de poros de los monolitos sintetizados, se realizaron medidas de Porosimetría de Intrusión de Mercurio (MIP) para las muestras obtenidas con el menor y el mayor tiempo de polimerización (8 y 20 horas) y que tuvieron resistencia mecánica aceptable, es decir, que resistieron las pruebas de permeabilidad. De esta manera, se pretendía evaluar no sólo la distribución de los poros, sino también su tamaño. En la **Figura 3.9** se presenta la distribución de poros obtenida para los monolitos mencionados.

Se puede observar que la forma de las cuatro curvas es muy similar, por lo que todos los monolitos presentan poros de igual tamaño y abundancia, lo cual demostraría que la síntesis de estos monolitos es robusta tanto frente a la composición de los solventes porogénicos como a los tiempos de polimerización en las condiciones empleadas. Cabe destacar que este análisis se realiza con la muestra seca, por lo que es esperable que el tamaño de los poros cambie cuando el monolito esté en contacto con la fase móvil y se solvate. Pero se espera que el cambio ocurra de la misma manera y en la misma extensión para todos los monolitos. El análisis de MIP, también permite conocer propiedades del sólido tales como la densidad y volumen total de poros, como figura en la **Tabla 3.3**.

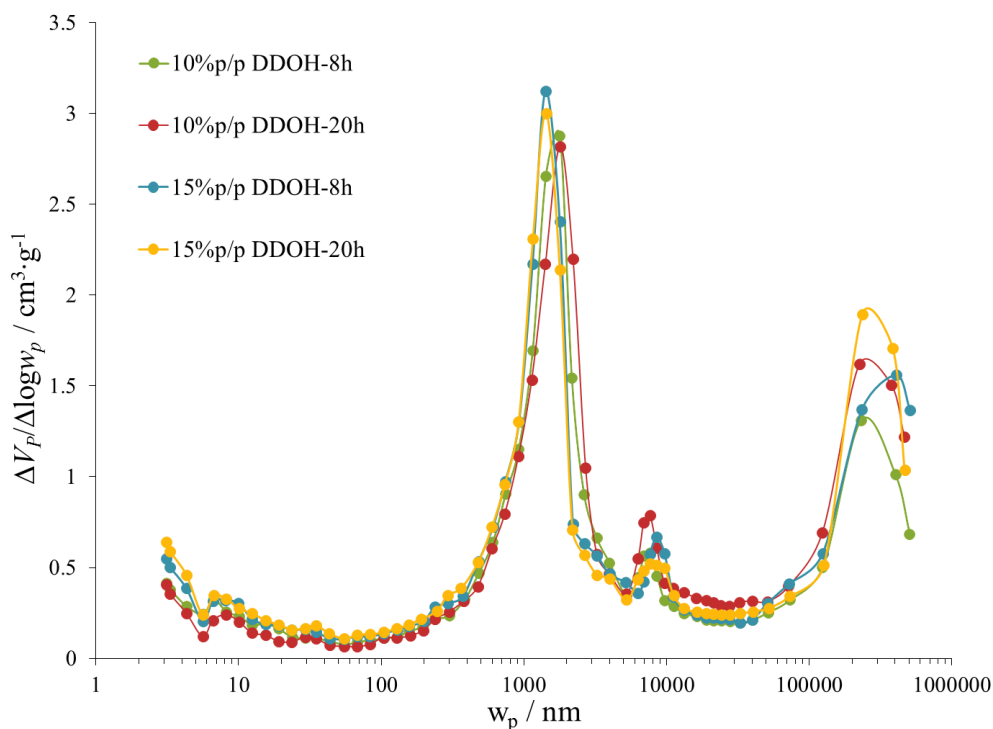


Figura 3.9. Distribución de poros para los monolitos de 10 y 15% de DDOH polymerizados durante 8 y 20 horas.

Debido a que no existen diferencias significativas en la distribución de poros en las muestras estudiadas, se decidió trabajar con tiempos de polimerización de 20 horas, ya que el material obtenido es más resistente mecánicamente.

Tabla 3.3. Propiedades texturales de los monolitos obtenidas a partir del análisis de MIP.

%p/p DDOH	10	10	15	15
t (horas)	8	20	8	20
Volumen total de intrusión (cm³/g)	2,934	3,216	3,226	3,395
Densidad total (g/cm³)	0,258	0,233	0,232	0,232
Densidad aparente (g/cm³)	1,062	0,931	0,926	1,171
Porosidad (%v/v)	76	75	75	78

Para evaluar si la forma del molde afecta la transferencia de calor en la reacción de polimerización, se prepararon muestras tanto en tubos capilares como en eppendorf

(polimerización en “bulk”). Cabe destacar que la polimerización en “bulk” es la que se emplea habitualmente en la literatura para los estudios de caracterización. Sorpresivamente, se observó que la morfología de ambos monolitos es radicalmente diferente en ambos casos (**Figura 3.10**), tanto en el tamaño como en la abundancia relativa de los poros.

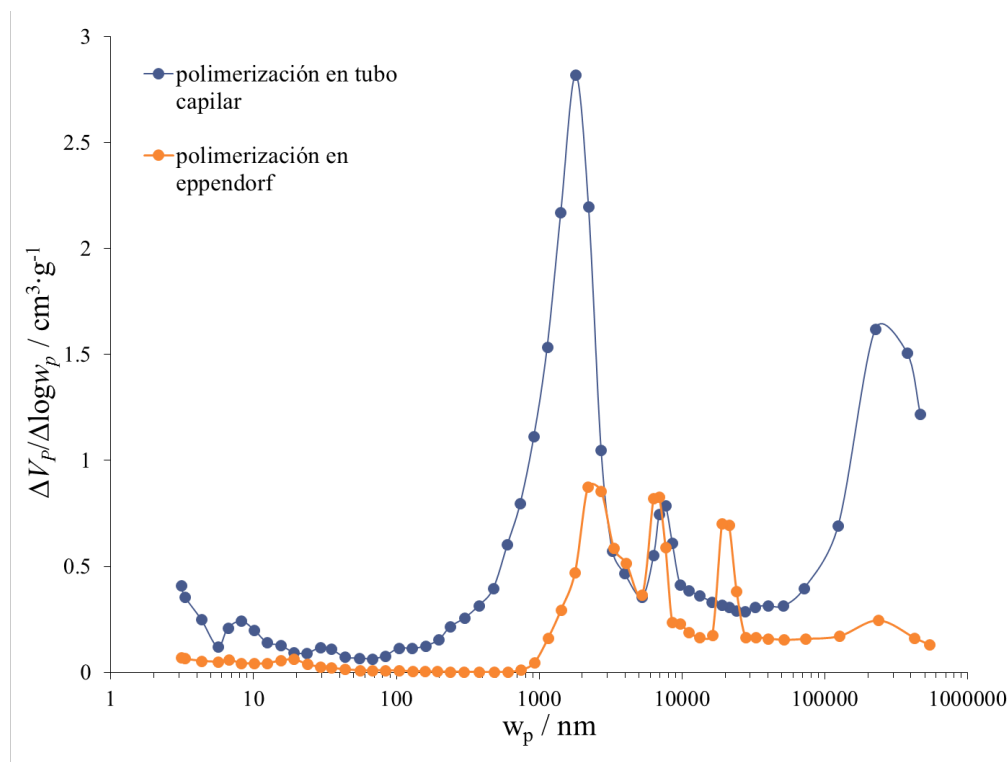


Figura 3.10. Distribución de poros para un monolito sintetizado en un tubo capilar y otro sintetizado en eppendorf o “bulk” (condiciones de polimerización: 10%p/p DDOH, 20 horas).

También se realizaron isothermas de adsorción de N₂ tipo BET para determinar el área superficial de los monolitos. Las muestras se prepararon para ambas composiciones (10 y 15%p/p DDOH, 20 horas de polimerización) en tubos capilares. Las áreas superficiales fueron de 9,14m²/gr para el monolito con 10%p/p de DDOH y 10,72m²/gr para la de 15%p/p de DDOH. Si bien estos valores son muy bajos para una columna cromatográfica, son valores típicos que se encuentran en bibliografía para este tipo de polímeros[4,13].

Debido a que ninguna de las propiedades estructurales mostró diferencias significativas entre las mezclas preparadas con 10 y 15%p/p de dodecanol, se decidió arbitrariamente continuar trabajando con la primera mezcla.

Se tomaron imágenes de Microscopía de Barrido Electrónico (SEM) para el monolito de poli(GMA-*co*-EDMA) que se empleará como columna cromatográfica. Las imágenes SEM de la **Figura 3.11** muestran la estructura globular típica de los monolitos orgánicos. También puede apreciarse que el material obtenido está adherido a la pared del capilar, cubre toda el área transversal del mismo y tiene aspecto homogéneo.

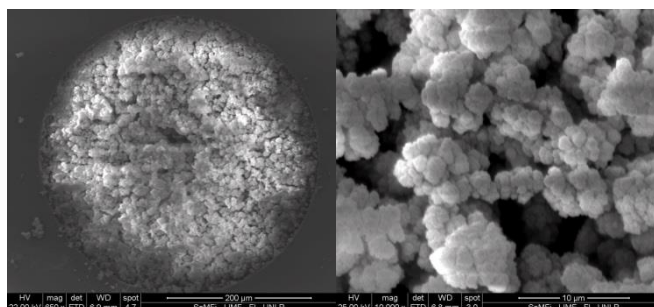


Figura 3.11. Imágenes SEM del monolito de poli(GMA-*co*-EDMA) con 10%p/p de DDOH y 20 horas de polimerización a 60°C.

3.3.3. Comparación de los monolitos desarrollados (orgánico vs. inorgánico)

A modo de resumen, en la **Tabla 3.4** se muestran las propiedades estructurales de los monolitos preparados. Se comparan las propiedades del monolito de sílice logrado en el capítulo 2 con las del monolito de poli(GMA-*co*-EDMA) del presente capítulo.

Tabla 3.4. Comparación de las propiedades de los monolitos orgánico e inorgánico desarrollados para columnas cromatográficas capilares.

	Monolito de poli(GMA-<i>co</i>-EDMA)	Monolito de sílice
Permeabilidad	$4,6 \times 10^{-12} \text{m}^2$	$4,7 \times 10^{-14} \text{m}^2$
Área superficial	$9 \text{m}^2/\text{gr}$	$266 \text{m}^2/\text{gr}$
Diámetro del capilar	$400 \mu\text{m}$	$50 \mu\text{m}$
Resistencia mecánica	$P < 60 \text{bar}$	$P > 300 \text{bar}$

Se puede concluir que el monolito de poli(GMA-*co*-EDMA) es muy permeable (las columnas particuladas suelen presentar permeabilidades del orden de 10^{-13} o 10^{-14}m^2) y se puede anclar fácilmente a la pared interna del capilar, incluso cuando éste es de diámetro grande ($400 \mu\text{m}$). Si bien su estructura es relativamente frágil y posee una baja

área superficial, posee otras cualidades que podrían resultar útiles para su uso como columna de cromatografía de líquidos. Por un lado, la presencia de grupos epóxido lábiles en la superficie de este monolito ofrece una gran variedad de reacciones que permitirían el anclaje covalente de un selector quiral como fase estacionaria, y además, el gran tamaño de los macroporos permitiría la libre difusión en el interior de los mismos de selectores quirales voluminosos, como polisacáridos, para la obtención de fases estacionarias quirales adsorbidas sobre el soporte. Si bien el área superficial de los monolitos poliméricos puede aumentarse siguiendo diversas estrategias (como el agregado de nanoestructuras), en este caso podría resultar inviable dado que posteriormente el monolito se recubrirá con un selector quiral voluminoso, por lo que la alternativa del agregado de nanoestructuras fue descartada.

El monolito de sílice posee una elevada área superficial, es muy resistente mecánicamente y posee una permeabilidad comparable a las columnas particuladas convencionales. Sin embargo, la síntesis es más complicada y difícil de controlar respecto a la de los monolitos orgánicos. Además, para que el monolito permanezca anclado al interior del tubo capilar fue necesario sintetizarlo en capilares de 50 μ m. Columnas tan pequeñas requieren el uso de equipos con un volumen extracolumna (volumen de la celda del detector, tuberías de conexión, inyección) muy pequeño para que la eficiencia no se vea afectada por dispersión extracolumna. Por otro lado, la superficie de sílice presenta grupos reactivos con capacidad para incorporar la fase estacionaria deseada. Con un área superficial de más de 250m²/gr son esperables buenas eficiencias, pero será necesario el uso de selectores quirales pequeños (debido al tamaño de los poros en estos materiales) para hacer uso de esta superficie.

3.4. Conclusiones parciales

- Se sintetizó en forma robusta un monolito orgánico polimérico de poli(GMA-co-EDMA) cuya composición final fue 20%p/p de GMA, 10%p/p de EDMA, 70%p/p de porógenos (este porcentaje está formado por 10% de DDOH y 60% de CiOH), 1%p/p de LPO respecto a los monómeros y 20hs de polimerización a 60°C.
- El monolito resultante mostró muy alta permeabilidad, cuyo valor fue reproducible en el rango óptimo de 10%p/p de DDOH (dentro de los límites de

error de la medida). Además, el monolito mostró propiedades mecánicas apropiadas para ser utilizado como relleno de columna para cLC, aunque con una baja área superficial, del orden de $10\text{m}^2/\text{gr}$, inherente a este tipo de polímeros porosos.

- Se caracterizaron materiales monolíticos, evaluando la influencia de diversas variables que afectan su estructura: composición de la mezcla de solventes porogénicos, tiempo de polimerización y forma del molde que contiene al monolito. Se concluyó que el monolito preparado con 10%p/p de DDOH en 20hs de polimerización resultó apropiado para usos posteriores como columna para cLC, con tamaños de poro óptimos para el posterior depósito o anclaje del selector quirál derivado de celulosa.
- Los monolitos preparados en “bulk”, procedimiento habitual en la bibliografía para caracterizar la estructura porosa, resultan en una distribución de poros muy diferente a la obtenida polimerizando directamente dentro del capilar, por lo cual es recomendable caracterizar el monolito obtenido de esta manera, expulsándolo de la columna mediante una polimerización sin anclaje a la pared del tubo capilar.

3.5. Bibliografía

- [1] Legido-Quigley, C., Marlin, N. D., Melin, V., Manz, A., Smith, N. W., Advances in Capillary Electrochromatography and Micro-High Performance Liquid Chromatography Monolithic Columns for Separation Science. *Electrophoresis*, 2003, 24, 917–944.
- [2] Viklund, C., Svec, F., Fréchet, J. M. J., Monolithic, “Molded”, Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations, Catalysis, or Solid-Phase Chemistry: Control of Porous Properties During Polymerization. *Chem. Mater.*, 1996, 8, 744–750.
- [3] Buchmeiser, M. R., Polymeric Monolithic Materials: Syntheses, Properties, Functionalization and Applications. *Polymer (Guildf.)*, 2007, 48, 2187–2198.
- [4] Desire, C. T., Hilder, E. F., Arrua, R. D., Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley and Sons, Inc., 2017, pp. 1–37.
- [5] Urban, J., Current Trends in the Development of Porous Polymer Monoliths for the Separation of Small Molecules. *J. Sep. Sci.*, 2016, 39, 51–68.
- [6] Merhar, M., Podgornik, A., Barut, M., Zigon, M., Strancar, A., Methacrylate Monoliths Prepared from Various Hydrophobic and Hydrophilic Monomers - Structural and Chromatographic Characteristics. *J. Sep. Sci.*, 2003, 26, 322–330.
- [7] Lämmerhofer, M., Gargano, A., Monoliths with Chiral Surface Functionalization for Enantioselective Capillary Electrochromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, 53, 1091–1123.
- [8] Eeltink, S., Herrero-Martinez, J. M., Rozing, G. P., Schoenmakers, P. J., Kok, W. T., Tailoring the Morphology of Methacrylate Ester-based Monoliths for

- Optimum Efficiency in Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 2005, 77, 7342–7347.
- [9] Mikhail, S. Z., Kimel, W. R., Densities and Viscosities of Methanol-Water Mixtures. *J. Chem. Eng. Data*, 1961, 6, 533–537.
- [10] Uzun, L., Yavuz, H., Say, R., Ersoz, A., Denizli, A., Poly(Ethylene Dimethacrylate-Glycidyl Methacrylate) Monolith as a Stationary Phase in Dye-Affinity Chromatography. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 2004, 43, 6507–6513.
- [11] Nischang, I., Brüggemann, O., On the Separation of Small Molecules by Means of Nano-Liquid Chromatography with Metacrylate-Based Macroporous Polymer Monoliths. *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 7514–7522.
- [12] Koeck, R., Fischnaller, M., Bakry, R., Tessadri, R., Bonn, G. K., Preparation and Evaluation of Monolithic poly(N-vinylcarbazole-co-1,4-divinylbenzene) Capillary Columns for the Separation of Small Molecules. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, 406, 5897–5907.
- [13] Viklund, C., Svec, F., Fréchet, J. M. J., Monolithic, “Molded”, Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations, Catalysis, or Solid-Phase Chemistry: Control of Porous Properties during Polymerization. *Chem. Mater.*, 1996, 8, 744–750.

4. Desarrollo de columnas monolíticas poliméricas quirales para cLC

4.1. Introducción

4.1.1. Estructura de la celulosa

La celulosa es un polímero natural compuesto por unidades de D-glucopiranososa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4). Estas unidades de glucosa se encuentran dispuestas en forma sindiotáctica, es decir que la orientación del anillo, evidenciada por la cadena pendiente que contiene el grupo hidroxilo primario, se encuentra de forma alternada respecto a un plano de simetría que pasa por el eje de la cadena del polímero. Si en cambio se toma el dímero de la celobiosa como unidad básica, ésta se encuentra dispuesta de forma isotáctica, es decir siempre con la misma orientación, como se puede apreciar en la **Figura 4.1**. La cadena tiene un sentido que inicia con el anillo conteniendo el grupo hidroxilo en el C4 libre (no reductor) y finaliza con el hidroxilo reductor del C1 en el otro extremo[1].

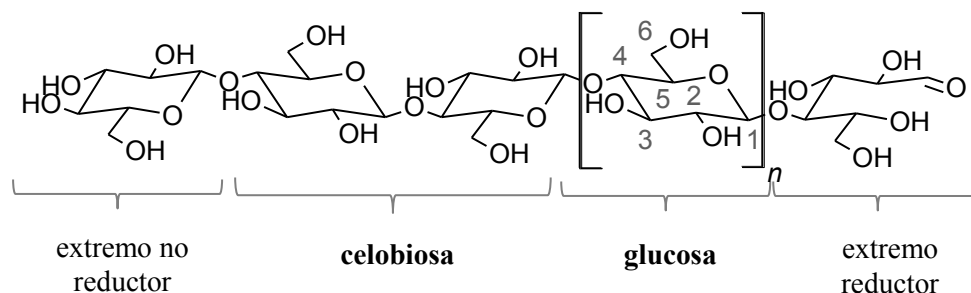


Figura 4.1. Estructura química de la celulosa.

La estructura secundaria de la celulosa es una hélice que se denomina 3/2 en sentido de la mano izquierda[2]. Esto indica que posee 3 unidades de glucosa por cada 2 vueltas de la hélice, en la que el sentido de giro es en el sentido de las agujas del reloj cuando se observa la hélice desde el eje con el C1 terminal orientado hacia el observador.

La presencia de un gran número de grupos hidroxilo, junto con la estructura rígida del polímero, favorecen la formación de una elevada cantidad de puentes de hidrógeno intercatenarios, dando lugar a un polímero insoluble en agua y poco soluble en la mayoría de los solventes.

4.1.2. Fases estacionarias de celulosa

Tanto el alto número de centros quirales, como la estructura tridimensional ordenada de la celulosa, hacen que a lo largo de la cadena se formen cavidades con capacidad de enantiorreconocimiento. Si bien la celulosa se ha utilizado como fase estacionaria para separaciones quirales, su capacidad de enantiodiscriminación no es muy elevada ya que las interacciones con los analitos suelen ser débiles debido al elevado número de puentes de hidrógeno intracatenarios. Sin embargo, al derivatizar la celulosa, se puede disminuir la cantidad de estas interacciones e incorporar grupos funcionales diversos que aumentan y diversifican las posibles interacciones con los analitos. Se ha comprobado que al derivatizar la celulosa en condiciones suaves, tanto en reacciones heterogéneas (con la celulosa en suspensión) como homogéneas (en solución), ésta no pierde su estructura secundaria[3]. También se sabe que en reacciones homogéneas el grado de derivatización es más elevado que en condiciones heterogéneas.

Existen columnas cromatográficas comerciales conteniendo acetatos, benzoatos y fenilcarbamatos de celulosa[4], siendo estas últimas las más utilizadas. En estos derivados, cuya estructura tridimensional se representa en la **Figura 4.2**, se conserva la estructura helicoidal de la celulosa y los grupos adicionados se orientan hacia afuera de la hélice, expandiendo las cavidades quirales presentes en el polisacárido.

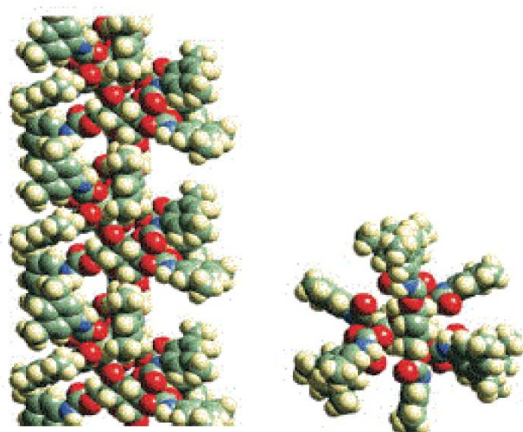


Figura 4.2. Representación tridimensional del tris-(3,5-dimetilfenil)carbamato de celulosa (tris-CDMPC) visto de forma perpendicular (izquierda) y sobre el eje de la hélice (derecha)[5].

En los fenilcarbamatos de celulosa, la región cercana al eje de la hélice es polar debido a la presencia de los grupos amino y carbonilo del carbamato, mientras que el exterior

es poco polar gracias a la presencia de los anillos aromáticos. Se postula que las principales interacciones con los analitos son las de tipo π - π (favorecidas en cromatografía de líquidos en modo inverso), puentes de hidrógeno con los grupos amino y dipolo-dipolo con los grupos carbonilo (éstas dos últimas interacciones ocurren preferencialmente en cromatografía de líquidos en modo normal)[6,7]. De esta manera, los analitos se ven atraídos de forma no enantioselectiva por interacciones de largo alcance con los grupos provenientes del fenilcarbamato y luego, ya cerca de la fase estacionaria, factores estéricos promueven la retención diferencial de los enantiómeros en las cavidades quirales[8,9].

Las fases estacionarias de celulosa pueden encontrarse depositadas sobre el soporte del lecho por adsorción, o pueden encontrarse ligadas químicamente por una unión covalente. Cuando el selector quiral se encuentra adsorbido, se suelen observar mejores resoluciones ya que el polímero puede adoptar su estructura secundaria sin impedimentos, sin embargo hay ciertos solventes como THF, HCCl_3 o un alto contenido de isopropanol, que no pueden ser utilizados en la fase móvil, ya que disolverían a la fase estacionaria. Por el contrario, cuando el derivado de celulosa se encuentra unido covalentemente al soporte, se puede disponer de cualquier solvente como fase móvil, aunque se han observado resoluciones menores por motivo de la discontinuidad de la estructura helicoidal al quedar ciertos puntos de la cadena fijados al soporte[10].

4.2. Parte experimental

4.2.1. Reactivos

Para la síntesis del derivado de celulosa se utilizaron celulosa microcristalina (Avicel PH-101) y cloruro de trifenilmetilo (97,0%) de Fluka, piridina (99,5%) y LiCl (99,0%) de Biopack, CaO (Standard), N,N-dimetilacetamida (**DMAc**) (99,9%) y HCl (37%p/p) de Anedra; 3,5-dimetilfenil isocianato (Aldrich, 99%) y metanol (Tedia, 99,9%). Para la unión del selector quiral al monolito se utilizaron éterato de BF_3 (Aldrich, 46-51%), tolueno (Dorwil, 99%), NH_3 (Anedra, 29,8%p/p) THF (Sintorgan, 99,0%) y acetona (Tedia, 99,9%).

Los analitos estudiados fueron furalaxil, metalaxil y R-metalaxil (97,9%) de Agrofina S.A., oxprenolol (99%), propranolol (99%), metoprolol (99%) y benzoína (98%) de

Sigma Aldrich. Para la fase móvil se utilizaron *n*-hexano (**hex**) (J.T.Baker, 99,9%), isopropanol (**i-prOH**) (Sintorgan, 99,5%), ácido fórmico (**HFor**) (85%) y dietilamina (**DEA**) (99,8%) de Anedra, ácido acético (**HAc**) (Merk, 99,8%), ácido trifluoroacético (**TFA**) (Riedel de Haën, 99%) y ácido caproico (**HCap**) (Analabs, 98%).

Para la separación cromatográfica de enantiómeros en una muestra comercial conteniendo propranolol, se utilizó un comprimido de Gador de 40mg y como muestras de metalaxil dos formulaciones comerciales, una de metalaxil racémico de Gleba y otra de R-metalaxil de Agrofina S.A.

4.2.2. Equipamiento

Para caracterizar el selector quiral a emplear como fase estacionaria se utilizaron un espectrómetro IR (Perkin-Elmer Spectrum 400) y un microanalizador (Carlo Erba EA 1108). Las corridas cromatográficas se realizaron en un equipo de HPLC, descrito en detalle en la sección experimental del capítulo 3 (Hewlett Packard 1100). Dicho equipo contiene un desgasificador, sistema de bomba binario y detector UV-Vis de longitud de onda variable. Para adaptar el equipo a escala miniaturizada, se empleó un divisor de flujo modelo P470 (Upchurch, Chromtech, EEUU) y una válvula de seis vías MXT Series II (Rheodyne, IDEX, EEUU), equipada con un adaptador para micro inyección M432 (Rheodyne, IDEX, EEUU).

4.2.3. Síntesis de bis-(3,5-dimetilfenil)carbamato de celulosa (bis-CDMPC)

La unión covalente de la fase estacionaria al soporte monolítico puede realizarse a partir de la reacción de un grupo OH libre de la celulosa con el grupo epóxido del monolito. Por lo tanto, la derivatización de la celulosa tiene un paso previo de protección del hidroxilo primario.

4.2.3.1. Purificación de los reactivos

En primer lugar, se deben purificar los reactivos necesarios para la síntesis[11,12].

Piridina: Se secaron 100mL de piridina con 1gr de CaO (previamente calcinado a 800°C por 2 horas) y se calentó a reflujo por 18 horas en atmósfera de N₂. Luego se destiló la piridina a una temperatura constante de 80°C.

Dimetilacetamida (DMAc): Se agitaron 80mL de DMAc con 1gr de CaO (seco) por dos días. Luego se calentó a reflujo por 1 hora y finalmente se destiló a presión reducida. A una presión de 70mmHg, el líquido destiló a temperatura constante de 89°C.

LiCl: se secó a 130°C en estufa durante un día.

Celulosa: se secó a 40°C en estufa de vacío durante un día.

Cloruro de trifenilmetilo (cloruro de tritilo): se secó al vacío a 40°C durante un día.

4.2.3.2. Síntesis

El procedimiento seguido en este trabajo de tesis para la obtención de bis-(3,5-dimetilfenil)carbamato de celulosa (bis-CDMPC), se ha utilizado en numerosas ocasiones para sintetizar fases estacionarias quirales y se encuentra disponible en bibliografía[13–15]. La reacción se representa esquemáticamente en la **Figura 4.3**.

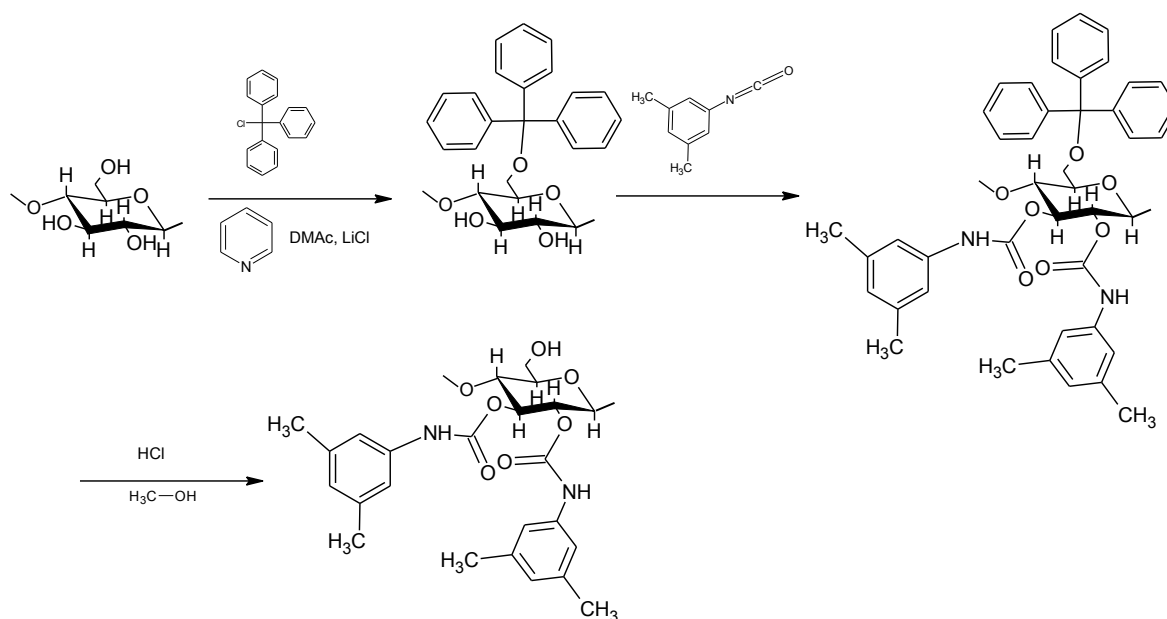


Figura 4.3. Esquema de la reacción de obtención de bis-CDMPC.

En la primera reacción de síntesis realizada (**Síntesis 1**), se mezclaron 0,9537gr de celulosa seca y 2,5gr de LiCl en 50mL de DMAc y se dejó en agitación por 48 horas a temperatura ambiente. Se disolvieron parte de los sólidos, pero no se observó disolución total. Se agregaron 60mL de piridina y 3gr de cloruro de trifenilmetilo (también llamado

cloruro de tritilo) y se dejó en reflujo a 80°C por 24 horas en atmósfera de N₂. Luego, la mezcla se enfrió hasta temperatura ambiente y se agregaron gota a gota 3mL de 3,5-dimetilfenil isocianato y se calentó nuevamente a reflujo a 80°C por 24 horas en atmósfera de N₂. Se vertió la mezcla de reacción en 600mL de metanol, observándose la formación de un precipitado blanco. Se agitó la mezcla por 1 hora, se filtró y se lavó con metanol hasta pH neutro. Para remover el grupo protector, se dispersó el sólido en 500mL de metanol con HCl al 1%v/v y se agitó por 24 horas. Finalmente, se filtró el producto, se lavó con metanol hasta llegar a pH neutro en el solvente de lavado y se secó a 50°C en vacío. Se obtuvo una masa de 2,6639gr del derivado.

Dado que no se logró solubilizar completamente la celulosa en la **Síntesis 1**, se realizó una segunda síntesis del selector quiral (**Síntesis 2**), pero en esta ocasión se modificó el proceso de disolución de la celulosa[16]. Se dispersaron 0,9599gr de celulosa seca en 40mL de DMAc y se calentó a 130°C por 2 horas. Luego, se dejó enfriar la mezcla hasta llegar a 100°C y se agregaron 3gr de LiCl seco. Se dejó enfriar en agitación hasta el día siguiente en atmósfera de N₂. Una vez a temperatura ambiente, la celulosa se disolvió completamente, observándose una solución gelatinosa incolora. A temperatura ambiente y en atmósfera inerte se agregaron 55mL de piridina y 3gr de cloruro de tritilo seco y se calentó hasta llegar a una temperatura de entre 80 y 85°C. Se dejó en reflujo un día y se observó la disolución total del cloruro de tritilo, así como la aparición de una leve coloración amarillenta. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se agregaron 6mL de 3,5-dimetilfenil isocianato en atmósfera de N₂. Se calentó la mezcla a 80-85°C en atmósfera inerte durante 24 horas y se observó un leve oscurecimiento de la mezcla de reacción.

Una vez fría la mezcla, se vertió en 600mL de metanol, observándose la formación de un precipitado blanco. La suspensión se agitó durante una hora y se filtró. El sólido obtenido se redispersó en 500mL de metanol con 1%v/v de HCl para remover el grupo protector (**Figura 4.3**) y se dejó en agitación por 24 horas. Finalmente, se filtró el sólido y se secó a 50°C hasta peso constante. La masa de producto obtenida fue de 2,4928gr.

4.2.4. Unión covalente de bis-CDMPC al monolito de poli(GMA-co-EDMA)

Para unir covalentemente la fase estacionaria al soporte monolítico polimérico, se siguió el procedimiento propuesto por Chankvetadze et al.[17] para monolitos de sílice. El

esquema de reacción se muestra en la **Figura 4.4** y consiste en el llenado de la columna con una solución del derivado de celulosa disuelto en acetona. Se deja evaporar el solvente, se llena la columna con el catalizador de eterato de BF_3 disuelto en tolueno seco (10%v/v), se tapan los extremos y se deja que la reacción proceda durante toda la noche a temperatura ambiente. Finalmente, se lava la columna con acetona para remover la celulosa que no reaccionó y se deja secar con los extremos abiertos durante 2 días en una estufa a 40°C .

Se trabajó con una solución de 35mg/mL del selector quiral. Esta concentración fue la máxima posible (con una viscosidad no tan elevada) como para que la solución pueda ser pasada a través de la columna monolítica sin que ésta colapse por la elevada presión generada.

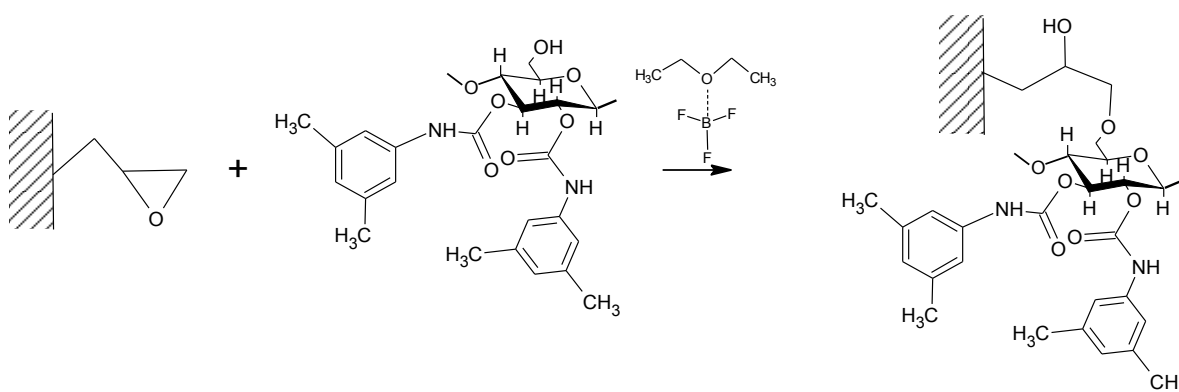


Figura 4.4. Anclaje covalente del bis-CDMPC al monolito de poli(GMA-*co*-EDMA).

4.2.5. Adsorción de bis-CDMPC al monolito de poli(GMA-*co*-EDMA)

Para la adsorción del selector quiral bis-CDMPC al monolito de poli(GMA-*co*-EDMA) se intentaron tres estrategias diferentes, la más directa consistió en el pasaje de una solución del selector quiral (35mg/mL en acetona) directamente sobre el monolito sintetizado, y las otras dos consistieron en variar la polaridad del monolito mediante la apertura del grupo epóxido del GMA en medio básico y en medio ácido.

4.2.5.1. Modificación del monolito en medio básico con NH_3

Al tratar el monolito de poli(GMA-*co*-EDMA) con NH_3 , ocurre una apertura del epóxido para dar lugar a una amina primaria y un alcohol secundario[18], como se detalla en el esquema de la **Figura 4.5**.



Figura 4.5. Reacción de apertura del epóxido con NH_3 .

En este trabajo, la reacción se realizó por pasaje de una solución de NH_3 4,5M sobre el monolito, previamente solvatado en metanol, a un caudal de $0,7\mu\text{L}/\text{min}$ (empleando una bomba de jeringa) hasta pH alcalino a la salida. Luego, se sellaron los extremos de la columna y se calentó a 70°C por 2 horas en una estufa. A continuación se lavó la columna con metanol hasta pH neutro, el cual se midió con papel indicador.

4.2.5.2. Modificación del monolito en medio ácido empleando H_2SO_4

Otra alternativa para modificar la superficie monolítica y obtener grupos funcionales capaces de interactuar fuertemente a través de interacciones dipolares y puentes de hidrógeno con el selector quiral, es tratarlo con un ácido fuerte. De esta manera, se puede abrir el anillo del epóxido[19], dando lugar a dos grupos hidroxilo (**Figura 4.6**). La reacción se realizó por pasaje de una solución de H_2SO_4 0,5M por el monolito a $0,7\mu\text{L}/\text{min}$ con una bomba jeringa hasta pH ácido a la salida de la columna. Luego, se taparon los extremos y se colocó la columna en una estufa a 90°C por 2 horas. Finalmente, se lavó la columna con agua hasta pH neutro, luego con metanol y se secó a 40°C .

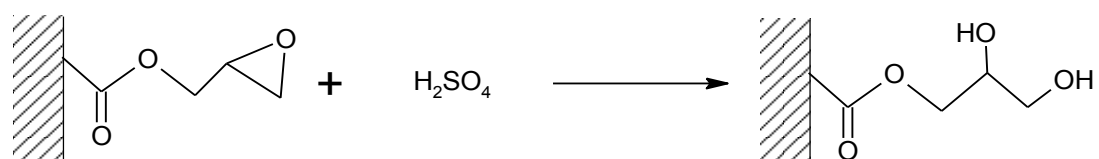


Figura 4.6. Reacción de apertura del grupo epóxido del monolito con H_2SO_4 .

4.2.5.3. Depósito de bis-CDMPC

Para el depósito de bis-CDMPC sobre el soporte monolítico, se siguió un protocolo de literatura[20,21], para lo cual se pasó sobre el monolito una solución de bis-CDMPC 35mg/mL disuelto en acetona a un caudal de $0,7\mu\text{L}/\text{min}$ por 1,5 horas, se evaporó el solvente a 40°C , durante dos días y se lavó la columna resultante con *n*-hexano.

4.2.6. Pretratamiento de un comprimido comercial conteniendo propranolol

La columna monolítica quiral preparada de acuerdo al procedimiento de la sección 4.2.5.3, fue utilizada para la determinación cualitativa de un principio activo farmacéutico quiral. Se utilizó un comprimido conteniendo el antihipertensivo propranolol de la marca Gador (40mg). Para extraer el principio activo del comprimido comercial, se molió en mortero una pastilla, se transvasó el sólido a un tubo Hach, se agregaron 10mL de isopropanol y se sonicó la suspensión por 5 minutos. Luego de precipitar el sólido insoluble, se tomó una fracción del líquido sobrenadante y se filtró con un filtro de nylon de 0,22 μ m de tamaño de poros (Osmonics Inc.). Se realizó una dilución 1:20 en *n*-hexano y se inyectó en la columna monolítica capilar quiral.

4.2.7. Pretratamiento de las formulaciones comerciales conteniendo metalaxil

Se analizaron dos formulaciones líquidas conteniendo el plaguicida metalaxil racémico (Gleba) y R-metalaxil (Agrofina S.A.). En este caso, también el procedimiento de preparación de las dos muestras se realizó con fines cualitativos. Debido a que las muestras fueron inmiscibles en hexano, fue necesario realizar una extracción líquido-líquido para tener la muestra disuelta en un solvente compatible con la fase móvil cromatográfica. Para ello, se tomaron 100 μ L de las muestras, se adicionaron 1000 μ L de *n*-hexano y se observó la formación de un sistema de dos fases, como se muestra en la **Figura 4.7**. Luego de sonicar 5 minutos, la fase orgánica superior (*n*-hexano) se inyectó directamente en el cromatógrafo de líquidos. En el caso de la muestra de R-metalaxil fue necesario realizar una dilución 1:10 antes del análisis cromatográfico.

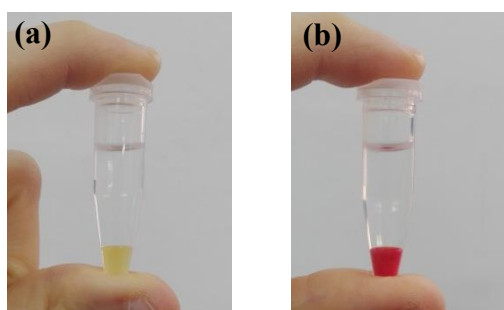


Figura 4.7. Extracciones líquido-líquido con *n*-hexano de las muestras de (a) R-metalaxil y (b) metalaxil racémico.

4.3. Resultados y discusión

En esta sección se muestran los resultados obtenidos para: *i.* la síntesis química, caracterización espectroscópica y elemental del selector quiral bis-CDMPC a partir de celulosa microcristalina; *ii.* para la funcionalización de los monolitos orgánicos con el selector quiral; y *iii.* para la optimización de las condiciones cromatográficas para la enantiorresolución de los contaminantes emergentes ópticamente activos estudiados.

4.3.1. Caracterización de bis-CDMPC

El rendimiento de reacción de derivatización de la celulosa, $R\%$, se calculó como $R\% = 100 \cdot m_{exp} / m_{teórica}$, donde m_{exp} corresponde a la masa de producto obtenida experimentalmente, mientras que $m_{teórica}$ es la masa teórica del producto que se debería obtener asumiendo un rendimiento del 100%. El rendimiento obtenido para la **Síntesis 1** (Sección 4.2.3.2) fue de 99,23%, lo cual es sumamente elevado para un procedimiento experimental.

El producto obtenido se caracterizó mediante espectroscopía IR. En la **Figura 4.8** se muestran en forma comparativa los espectros IR de la celulosa nativa y del producto obtenido. En el espectro IR del producto, se observaron las bandas características de los grupos hidroxilo ($\tilde{\nu} \approx 3500 \text{cm}^{-1}$), amina secundaria ($\tilde{\nu} \approx 3300 \text{cm}^{-1}$), carbonilo ($\tilde{\nu} \approx 1600 \text{cm}^{-1}$) y protones aromáticos ($\tilde{\nu} \approx 800 \text{cm}^{-1}$). Este análisis indica que en el producto se encuentran los grupos funcionales de bis-CDMPC. Sin embargo, a diferencia de lo reportado en literatura, donde se informa una solubilidad de hasta 100mg/mL en acetona[17], el producto obtenido mediante la **Síntesis 1** fue casi insoluble en dicho solvente.

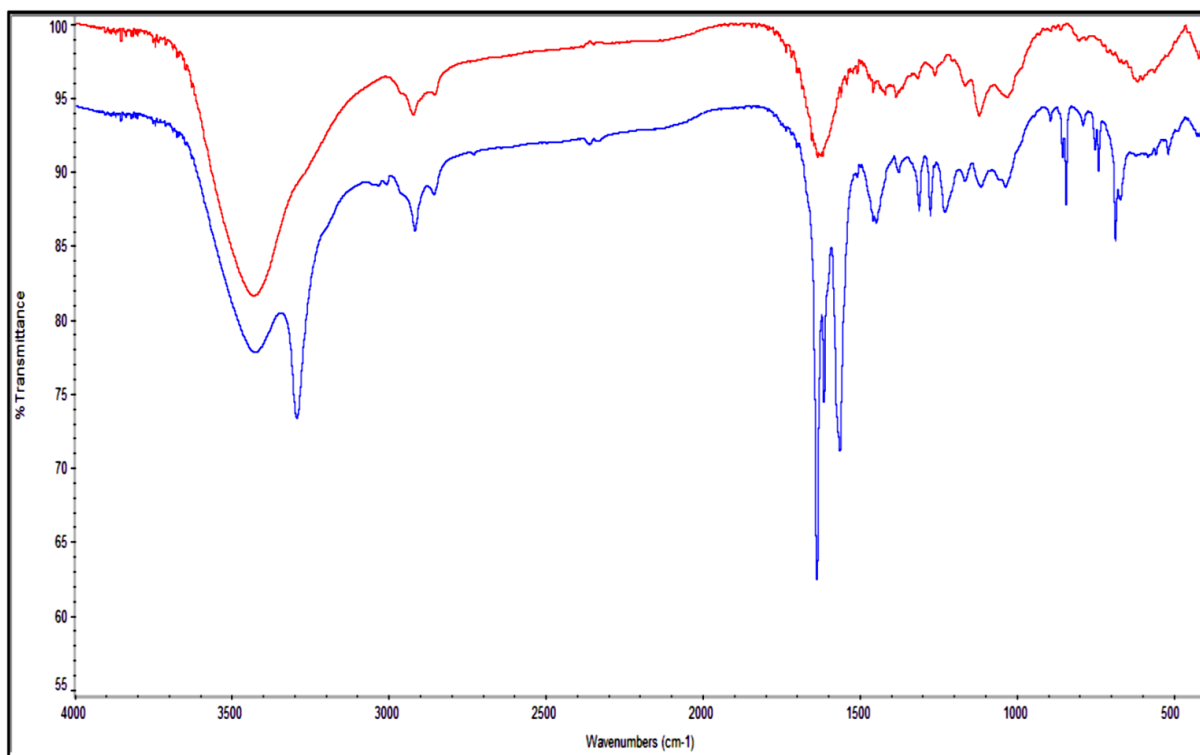


Figura 4.8. Espectro infrarrojo de la celulosa (línea roja) y del producto de la **Síntesis 1** (línea azul) que se detalla en la Sección 4.2.3.2.

Se realizó un análisis elemental del producto, el que arrojó como resultado una fórmula de $C_{24}H_{34}O_7N_2$, mientras que la fórmula molecular de bis-CDMPC es $C_{24}H_{28}O_7N_2$. La diferencia entre la fórmula obtenida y la esperada es de 12H, lo cual lleva a suponer que el reactivo del segundo paso de reacción de la **Figura 4.3**, el 3,5-dimetilfenil isocianato, se pudo haber descompuesto y por lo tanto, pudo haber quedado ocluido dentro de las cadenas poliméricas de la celulosa. Es conocido que los reactivos conteniendo grupos isocianato son muy reactivos[22], por lo que el derivatizante podría haber reaccionado con H_2O o con metanol para dar como productos secundarios la respectiva amina o el carbamato.

Aunque en el espectro IR del producto de síntesis aparecen las bandas características de los grupos químicos que se esperan en el bis-CDMPC, no se puede saber a través de este tipo de análisis si efectivamente hay una unión covalente entre la celulosa y el derivatizante mediante un carbamato o si dentro de las cadenas de la celulosa quedaron ocluidos productos secundarios de la síntesis. Sin embargo, debido a la pobre solubilidad en acetona así como el análisis elemental que no concuerda exactamente con las masas esperadas de cada elemento, se puede concluir que el producto de la **Síntesis**

1 no concuerda con el esperado para la obtención del selector quiral bis-CDMPC. Por lo tanto, se procedió a realizar la **Síntesis 2**, en la que se modificó el proceso de disolución de la celulosa, como se indica en la sección 4.2.3.2. En este caso, el rendimiento de la reacción fue de 92,26%, logrando solubilizarse 62mg/mL, concentración muy superior a la obtenida en la **Síntesis 1** y cercano al valor de solubilidad reportado en la literatura[17].

En el espectro IR del producto obtenido (**Figura 4.9**) se observa una marcada disminución de la banda ancha característica de los grupos hidroxilo ($\tilde{\nu} \approx 3500 \text{cm}^{-1}$), mientras que se observa el pico agudo característico de aminas secundarias a $\tilde{\nu} \approx 3500 \text{cm}^{-1}$. En comparación con el espectro de la celulosa de la **Figura 4.8**, se observa la aparición de varios picos a números de onda bajos, con lo cual se puede concluir que el sólido posee una estructura diferente a la celulosa.

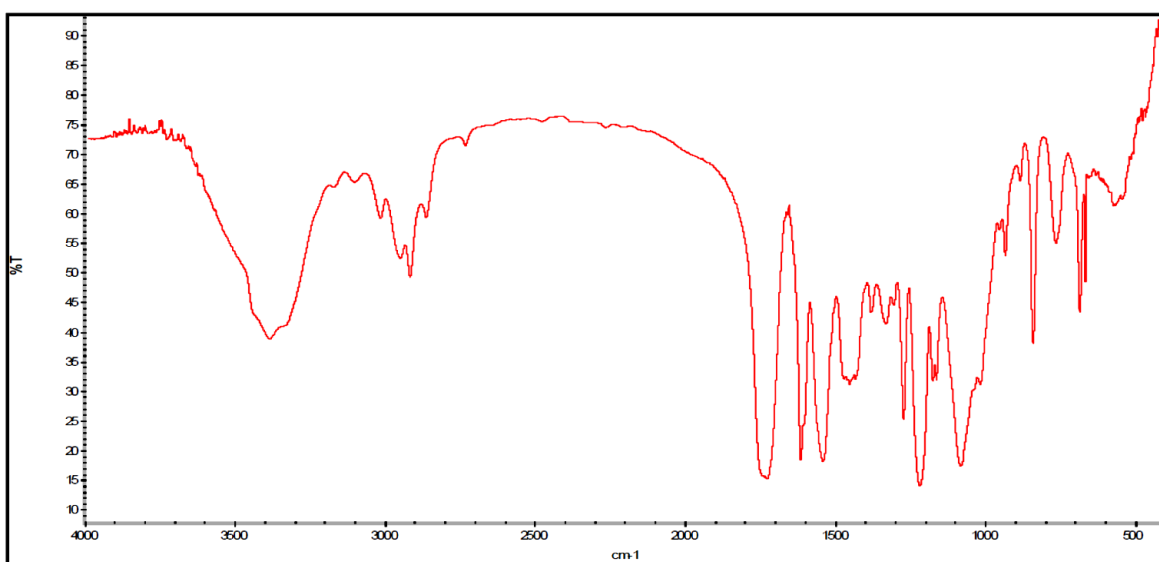


Figura 4.9. Espectro IR del producto obtenido en la **Síntesis 2** de bis-CDMPC.

También se realizó un ensayo de análisis elemental sobre el producto de síntesis que arrojó una fórmula de $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$. Los porcentajes teóricos (%p/p) de cada elemento constituyente son: C=63,2; H= 6,1; N=6,2 y O=24,6; mientras que los porcentajes en masa obtenidos en el microanálisis fueron: C=64,1($\pm 0,3$); H= 6,0($\pm 0,2$); N=6,4($\pm 0,2$) y O=23,5 (éste último obtenido por diferencia). Sin embargo, considerando los errores experimentales en la determinación de H y N, se puede arribar a la fórmula esperada, con lo cual podemos concluir que el producto obtenido fue bis-CDMPC.

4.3.2. Unión covalente de bis-CDMPC al monolito de poli(GMA-co-EDMA)

Al llevar a cabo el procedimiento descrito en la Sección 4.2.4, se observó que al pasar por la columna la solución con el catalizador eterato de BF_3 disuelto en tolueno, la celulosa depositada sobre el monolito fue eluida de la columna, observándose el desprendimiento de un sólido blanco. Lo mismo ocurrió al lavar la columna resultante con una mezcla de *n*-hexano/isopropanol (95:5), lo que fue confirmado por la ausencia de retención y separación de los analitos. Estos resultados indicarían que las interacciones entre el monolito y el polisacárido no son lo suficientemente fuertes como para permitir la adsorción del selector quiral en los solventes de elución ensayados, principalmente en tolueno, el solvente de disolución del catalizador, lo cual es necesario en la etapa previa a su reacción con el soporte.

Recientemente, R. Echevarría y col.[23], en el trabajo de tesis doctoral, prepararon exitosamente columnas monolíticas de poli(HEMA-co-EDMA), empleando metacrilato de hidroxietilo como monómero funcional y dimetacrilato de etilenglicol como entrecruzante, sobre la que se adsorbió tris-CDMPC. Este grupo funcional, posee los tres grupos hidroxilo de cada unidad de glucosa sustituidos con grupos 3,5-dimetilfenil carbamato. El selector quiral sintetizado se probó en las columnas de poli(GMA-co-EDMA) del presente trabajo, pero no se logró adsorber, lo cual se puso de manifiesto tanto por el desprendimiento de un sólido blanco al lavar las columnas, como la ausencia de retención y separación de los analitos. Debido a que el monolito de poli(HEMA-co-EDMA) posee una gran cantidad de grupos hidroxilos superficiales, ausentes en el monolito de poli(GMA-co-EDMA), es probable que la interacción principal entre el soporte monolítico y la fase estacionaria ocurra por interacciones dipolares más fuertes y/o puentes de hidrógeno.

Se evaluó luego la posibilidad de realizar la reacción de unión del selector quiral a la columna en una sola etapa, disolviendo el catalizador en la solución del derivado de celulosa para que la reacción ocurra a medida que la fase estacionaria fluye por el monolito. La elección de un solvente para la disolución simultánea del selector quiral y el catalizador no fue trivial, ya que la acetona, que es un buen solvente para el bis-CDMPC, reacciona con el catalizador de boro[24], mientras que el tolueno y el CHCl_3 son solventes inertes para el catalizador pero malos solventes para el selector quiral. El THF disuelve el derivado de celulosa, es inerte frente al catalizador y aunque solvata al

monolito, no afecta su estructura[25], por lo que cumple todos los requisitos buscados para esta reacción. Se ensayó entonces la reacción propuesta, para lo cual se preparó una solución de 35mg/mL de bis-CDMPC en THF, se adicionaron 100 μ L de eterato de BF₃ y se pasó la mezcla por un monolito de poli(GMA-*co*-EDMA) con una bomba jeringa a 0,7 μ L/min. La solución en la jeringa fue adquiriendo lentamente turbidez y resultó ser tan viscosa que no llegó a mojar toda la longitud de la columna. Después de varias horas, se notó la presencia de un sólido blanco en la solución de la jeringa, el cual era insoluble en acetona. Estos resultados parecen indicar que la reacción entre las cadenas del polisacárido es más rápida que entre éste y el monolito, con lo cual tampoco se pudo realizar la reacción de fijación mediante este procedimiento.

4.3.3. Adsorción de bis-CDMPC sobre monolitos de poli(GMA-*co*-EDMA) modificados en medio ácido y básico

Los resultados anteriores mostrarían que los puentes de hidrógeno representan la principal interacción entre la fase estacionaria de celulosa y el soporte de la columna. Por lo tanto, se ensayaron diferentes procedimientos para exponer grupos con posibilidad de formar puentes de hidrógeno en la superficie del monolito, tales como amino o hidroxilo, mediante la apertura de los grupos epóxido presentes. En la **Figura 4.10** se muestran los grupos capaces de formar puentes de hidrógeno tanto en el monolito soporte (modificado o sin modificar) como en la fase estacionaria derivada de celulosa. Como puede observarse, el monolito de poli(GMA-*co*-EDMA) carece de grupos químicos capaces de contribuir a este tipo de interacciones.

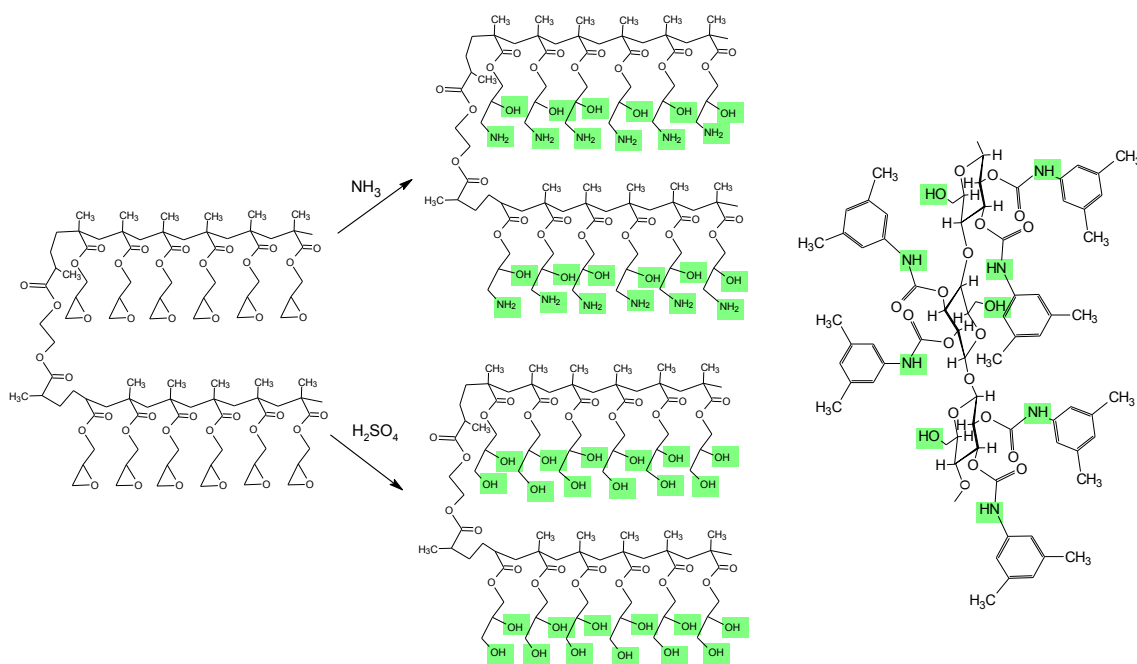


Figura 4.10. Estructura química del soporte monolítico original de GMA, de los soportes que resultan de la apertura del epóxido en medio básico y ácido y estructura de bis-CDMPC (en color se indican los grupos capaces de interactuar por puentes de hidrógeno).

4.3.3.1. Modificación superficial del polímero monolítico empleando NH_3

Mediante el procedimiento descrito en la Sección 4.2.5.1, se modificó la superficie monolítica empleando NH_3 y se hizo circular la solución de bis-CDMPC a través de ella. De esta manera se obtuvo la columna de poli(GMA-*co*-EDMA) modificada en medio alcalino y con posterior depósito de bis-CDMPC (“poli(GMA-*co*-EDMA)- NH_2 /bis-CDMPC”). La columna permitió retener y separar 5 pares de racematos: furalaxil, metalaxil, oxprenolol, metoprolol y propranolol, lo que confirma la presencia del selector quiral. En la **Figura 4.11** se muestran los correspondientes cromatogramas obtenidos en distintas condiciones de fase móvil. La enantioselectividad (α) se calculó como la relación de factores de retención $\alpha = k_2/k_1$ y la enantiorresolución (R_s) como $R_s = 2 \cdot (t_{r2} - t_{r1}) / (w_{b1} + w_{b2})$, donde t_r es el tiempo de retención y w_b el ancho en la base del pico cromatográfico. Se obtuvieron valores de enantioselectividad de entre 1,53 y 19,04 y de enantiorresolución entre 0,28 y 1,45, lo cual demuestra la enorme capacidad de enantiorreconocimiento del selector quiral bis-CDMPC.

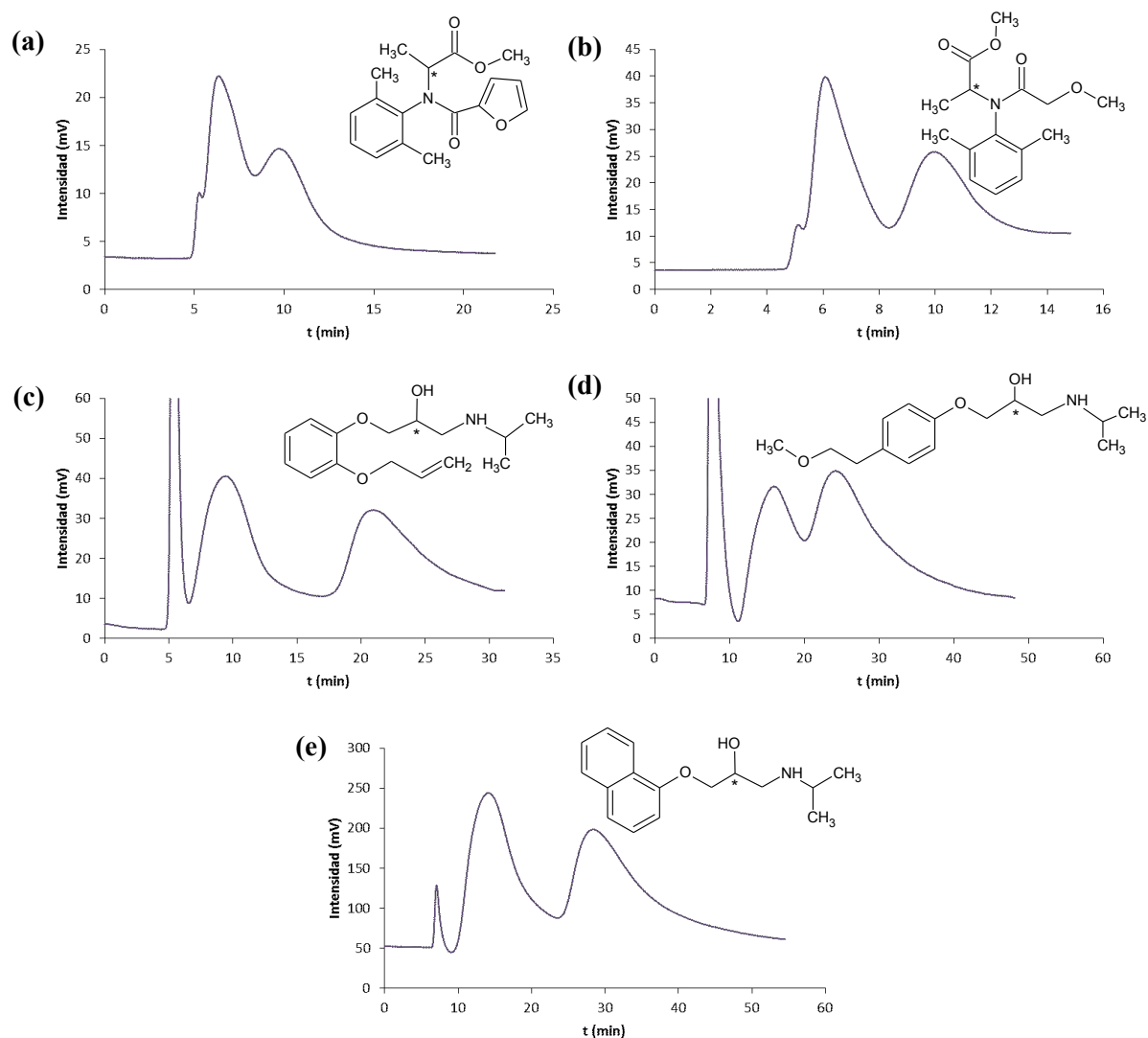


Figura 4.11. Cromatogramas de (a) furalaxil (fase móvil: hex/*i*-prOH (95:5)), (b) metalaxil (fase móvil: hex/*i*-prOH (95:5)), (c) oxprenolol (fase móvil: hex/*i*-prOH/TFA (95:5:0,1)), (d) metoprolol (fase móvil: hex/*i*-prOH/HAc (95:5:0,1)), (e) propranolol (fase móvil: hex/*i*-prOH/TFA (95:5:0,1)). En todos los casos $F=5\mu\text{L}/\text{min}$, $v_{\text{iny}}=0,1\mu\text{L}$ y $\lambda=230\text{nm}$.

4.3.3.1.1. Influencia del uso de aditivos en la fase móvil y mecanismo de retención

Es bien conocido el efecto que tienen los aditivos de la fase móvil sobre la separación de compuestos quirales[26]. Con el objetivo de estudiar la influencia de diferentes aditivos en la separación que ocurre en la columna preparada mediante el depósito de bis-CDMPC sobre el monolito de poli(GMA-*co*-EDMA) modificado con NH_3 , se emplearon como aditivos ácidos: HFor, HAc, TFA y HCap y como aditivo básico DEA

en la fase móvil. Se estudió el efecto sobre la retención y enantioseparación de los analitos empleados y los resultados obtenidos para los aditivos ácidos se muestran en la **Tabla 4.1**.

De los resultados mostrados en la **Tabla 4.1** pueden observarse comportamientos diferentes para las dos familias de compuestos estudiadas. Para los fungicidas, furalaxil y metalaxil, el agregado de aditivos ácidos no cambia significativamente el **factor de retención**, k . Sin embargo, en el caso de los β -bloqueantes, oxprenolol, metoprolol y propranolol, puede observarse un aumento notable en los factores de retención.

Respecto a la **enantioselectividad** así como a la **enantiorresolución**, también se observan comportamientos diferenciales en ambas familias en estudio. Los fungicidas, no muestran una tendencia clara, aunque se observan fluctuaciones en estos parámetros debidas principalmente a los valores bajos del factor de retención del enantiómero menos retenido. Por otra parte, los β -bloqueantes muestran un aumento tanto en la enantiorresolución como en la enantioselectividad para los aditivos de cadena corta y luego una leve disminución para aditivos ácidos de cadena más larga. Es importante destacar que tanto el metoprolol como el propranolol se separan únicamente en presencia de aditivos ácidos.

Tabla 4.1. Factores de retención, selectividad y resolución para los analitos separados con aditivos ácidos.

Analito	hex/ <i>i</i> -prOH (95:5)				hex/ <i>i</i> -prOH/HFor (95:5:0,1)				hex/ <i>i</i> -prOH/HAc (95:5:0,1)				hex/ <i>i</i> -prOH/TFA (95:5:0,1)				hex/ <i>i</i> -prOH/HCap (95:5:0,1)			
	k ₁	k ₂	α	Rs	k ₁	k ₂	α	Rs	k ₁	k ₂	α	Rs	k ₁	k ₂	α	Rs	k ₁	k ₂	α	Rs
Furalaxil	0,21	0,85	4,06	0,74	0,07	-	-	-	0,21	0,74	3,45	0,56	0,22	0,69	3,12	0,54	0,14	0,66	4,63	0,64
Metalaxil	0,19	0,94	5,07	1,37	0,04	0,78	19,04	0,93	0,12	1,00	8,12	1,27	0,21	0,81	3,93	0,79	0,08	0,85	10,29	1,00
Oxprenolol	0,34	0,88	2,59	0,51	2,81	-	-	-	0,90	3,69	4,09	1,41	0,76	2,93	3,84	1,45	0,64	2,77	4,35	1,14
Metoprolol	0,32	-	-	-	4,10	-	-	-	1,12	2,21	1,98	0,61	0,84	1,71	2,04	0,52	0,80	-	-	-
Propranolol	0,04	-	-	-	3,06	4,68	1,53	0,61	1,05	3,05	2,92	1,14	1,00	3,01	3,02	1,03	0,70	1,57	2,26	0,51

HFor: ácido fórmico, HAc: ácido acético, TFA: ácido trifluoroacético, HCap: ácido hexanoico (caproico).

La **Figura 4.12** muestra el comportamiento de la retención y la selectividad para los β -bloqueantes estudiados en función de la cantidad de átomos de carbono del ácido utilizado como aditivo de la fase móvil. En todos los casos se observa que la mejor selectividad está acompañada por el menor tiempo de análisis (menor valor de k') para HAc como aditivo.

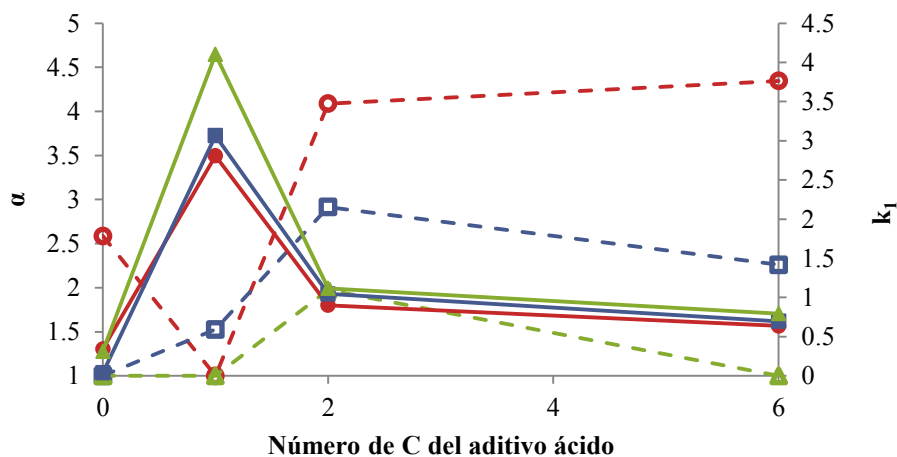


Figura 4.12. Factor de retención (línea llena) y selectividad (línea punteada) para \circ oxprenolol, Δ metoprolol y \square propranolol en función del número de C del ácido carboxílico utilizado como aditivo de la fase móvil.

Los resultados obtenidos concuerdan con el mecanismo propuesto por Ye et al.[27]. Si bien este mecanismo fue planteado para la retención de ésteres de aminoácidos sobre una columna de tris-CDMPC, puede emplearse también para explicar el comportamiento enantioselectivo de los β -bloqueantes sobre bis-CDMPC, dado que los mismos tienen grupos funcionales de naturaleza similar y complementarios entre sí con capacidad de formación de puentes de hidrógeno. En este mecanismo de retención, se plantea la formación de un anillo de 9 miembros entre el analito y la fase estacionaria por la formación de dos puentes de hidrógeno, el cual incluye al C asimétrico del analito, como se puede observar en la **Figura 4.13**.

El comportamiento tanto de la retención como de la selectividad de los β -bloqueantes se corresponde con este mecanismo, lo cual se ve evidenciado en presencia de aditivos ácidos en la fase móvil. Al adicionar una especie ácida en la fase móvil el grupo amino de los analitos se protonará. En fase normal, esta especie cargada no será estable como tal, sino que el anión del ácido correspondiente quedará asociado. El anión, por lo tanto, generará impedimento estérico para la formación del anillo de 9 miembros entre el analito y la fase estacionaria. Este

impedimento estérico contribuye a la enantioselectividad, lo cual se ve reflejado en el aumento de α para aditivos de cadena corta, pero cuando el anión es muy grande, éste puede impedir la asociación entre el analito y el selector quiral, observándose un descenso tanto de la retención como selectividad, como en el caso del HCap. Es interesante notar, como se observa en la **Tabla 4.1**, que k y α son bastante similares cuando se utilizan HAc y TFA como aditivos, lo cual estaría mostrando que el tamaño del ácido tiene mayor influencia que la naturaleza del anión o la fuerza del mismo.

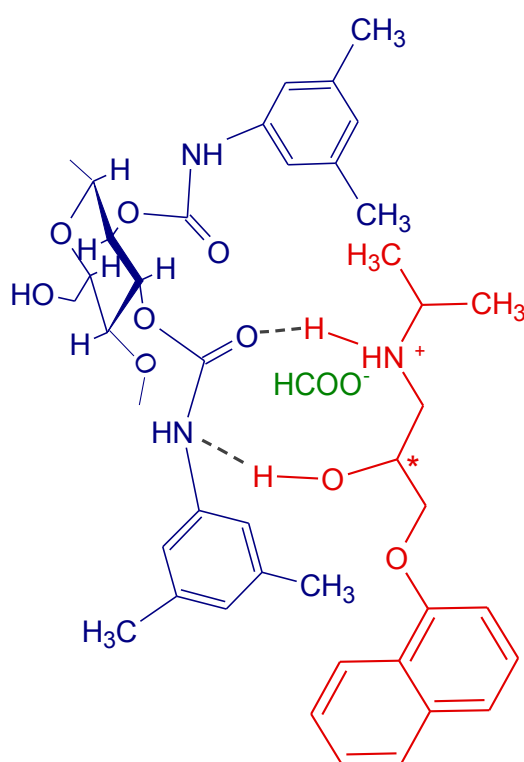


Figura 4.13. Esquema propuesto para el complejo que se forma en la interacción entre la fase estacionaria de bis-CDMPC y propranolol en presencia de ácido fórmico en la fase móvil. Las diferentes posiciones del grupo OH en el centro quiral del analito generan las diferencias de enantiorreconocimiento.

Aunque el mecanismo de retención propuesto puede justificar el comportamiento observado en los β -bloqueantes que se lograron separar, no explica el motivo por el que otros α -amino alcoholes de la misma familia no se resuelven. Por ejemplo, se inyectaron alprenolol, arterenol, metaproterenol y labetalol, pero ninguno de ellos se logró separar quiralmemente. Es

probable que otros grupos químicos de los analitos contribuyan tanto con interacciones con el selector quiral, así como con factores estéricos. En particular, es interesante resaltar que aunque el oxprenolol y el alprenolol poseen estructuras muy similares, el primero se separó en casi todas las condiciones estudiadas, mientras que el segundo no se logró separar en ninguna de ellas. Como el anillo aromático del oxprenolol es mejor aceptor de electrones que el del alprenolol debido a que el anillo posee dos sustituyentes alcóxicos en lugar de uno (**Figura 4.14**), y los anillos de la fase estacionaria son donores de electrones, es probable que haya interacciones de tipo donador-aceptor de electrones fuertes entre ellos que no pueden establecerse del mismo modo con el alprenolol. Los otros β -bloqueantes separados con esta columna, metoprolol y propranolol, también poseen anillos aceptores de electrones.

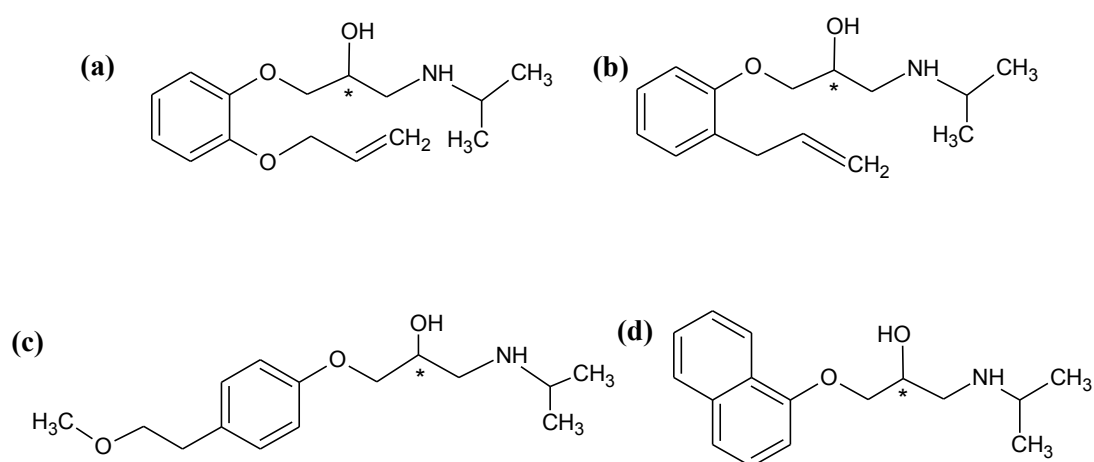


Figura 4.14. Estructura química del (a) oxprenolol, (b) alprenolol, (c) metoprolol y (d) propranolol.

En la **Tabla 4.2** se muestran los valores factores de retención, enantioselectividad y enantiorresolución para el agregado de DEA como aditivo básico en la fase móvil.

Tabla 4.2. Factores de retención, selectividad y resolución para los analitos separados con DEA.

Analito	hex/ <i>i</i> -prOH (95:5)				hex/ <i>i</i> -prOH/DEA (95:5:0,1)			
	k_1	k_2	α	R_s	k_1	k_2	α	R_s
Furalaxil	0,21	0,85	4,06	0,74	0,14	0,35	2,56	0,28
Metalaxil	0,19	0,94	5,07	1,37	0,13	0,81	6,29	0,67
Oxprenolol	0,34	0,88	2,59	0,51	0,29	1,03	3,56	1,17
Propranolol	0,04	-	-	-	0,26	0,62	2,36	0,51

Nuevamente, se pueden observar comportamientos distintos para los fungicidas y los β -bloqueantes. Respecto a los **factores de retención**, tanto el furalaxil como el metalaxil presentan cambios leves frente al agregado de DEA, mientras que el oxprenolol y propranolol muestran un aumento en dicho parámetro.

También puede observarse que el furalaxil muestra una disminución tanto de la **enantioselectividad** como la **enantiorresolución** al agregar el aditivo básico en la fase móvil, mientras que los resultados para el metalaxil, no son concluyentes y es probable que las sutiles diferencias de los factores de retención en ausencia y presencia de DEA, cuyos valores son pequeños, sean los responsables de los cambios en la selectividad y resolución. Por su parte, se observa que la selectividad del oxprenolol mejora con el agregado de DEA, mientras que la resolución se duplica y que el propranolol, que no se logró separar en ausencia de aditivos en fase móvil, puede ser separado en presencia de DEA.

Como medida de la eficiencia de la columna para los diferentes aditivos empleados, se calculó el número de platos por metro (N) para el pico de uno de los enantiómeros, a partir de $N=5,54(t_r/w_{1/2})^2$, donde t_r y $w_{1/2}$ corresponden al tiempo de retención y ancho a mitad de altura del pico cromatográfico. Los resultados se muestran en la **Figura 4.15**.

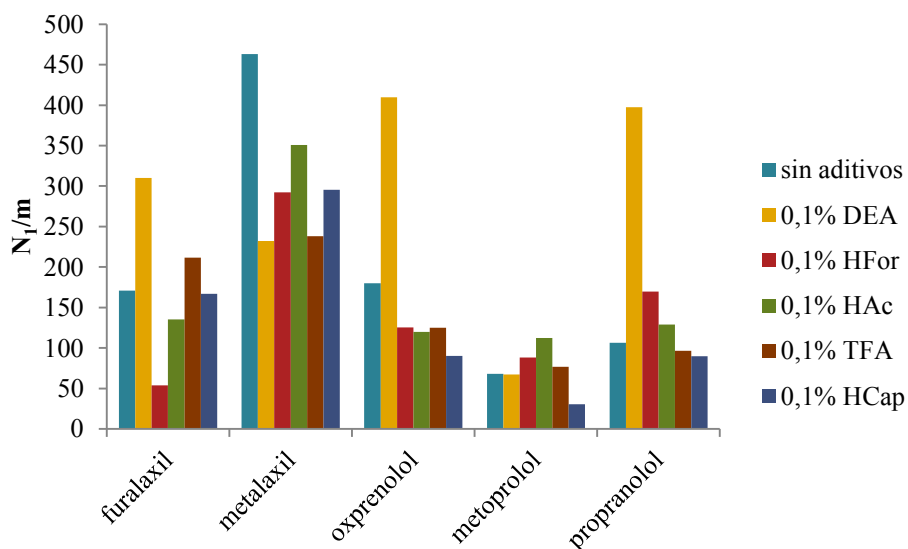


Figura 4.15. Número de platos con y sin aditivos para el primer pico (N_1) de los analitos quirales estudiados. Fase móvil de hex/*i*-prOH (95:5).

En primer lugar se observa que el número de platos obtenidos es muy bajo, lo cual es típico para monolitos orgánicos, a diferencia de los de sílice, debido al bajo número de mesoporos que contiene[28]. Uno de los desafíos actuales para mejorar la eficiencia de las columnas monolíticas orgánicas es emplear nanoestructuras que aporten microporos, tales como nanopartículas o redes organometálicas[29].

En la **Figura 4.15** también se puede observar que la eficiencia aumenta sustancialmente cuando se utiliza DEA como aditivo, especialmente para oxprenolol y propranolol, que son aminas secundarias. Es probable que este incremento de la eficiencia se deba a la competencia del aditivo, que también posee un grupo amino, con los analitos por los sitios de adsorción presentes en el monolito soporte o en las paredes de sílice de la columna. Al disminuir los sitios de adsorción no enantioespecíficos para los analitos, disminuye el cooleo de los picos cromatográficos, lo cual se ve reflejado en un angostamiento de los picos.

Por otra parte, como modificador de la fase móvil se ensayó una mezcla de TFA y DEA. En la **Tabla 4.3** se muestran los resultados comparativos de los factores de retención, enantioselectividad, enantiorresolución y número de platos para todos los analitos utilizando como aditivos TFA, DEA o una combinación de ambos. En la **Figura 4.16** se muestran los cromatogramas correspondientes.

Se puede observar que para todos los analitos se logran los mejores valores de resolución con la mezcla de aditivos, lo cual se debe a que el número de platos es mayor que el obtenido con DEA, mientras que los valores de selectividad son muy similares a los obtenidos con TFA, con lo cual se suman las ventajas de ambos aditivos al utilizarlos en simultáneo.

Tabla 4.3. Factores de retención, k , enantioselectividad, α , enantiorresolución, R_s , y número de platos por metro, N , para ambos enantiómeros de furalaxil, metalaxil, oxprenolol, metoprolol y propranolol, utilizando TFA o DEA o una combinación de ambos como aditivos de la fase móvil.

	hex/ <i>i</i> -prOH/TFA (95:5:0,1)						hex/ <i>i</i> -prOH/DEA (95:5:0,1)						hex/ <i>i</i> -prOH/TFA/DEA (95:5:0,05:0,05)					
	k_1	k_2	α	R_s	N_1 (platos/m)	N_2 (platos/m)	k_1	k_2	α	R_s	N_1 (platos/m)	N_2 (platos/m)	k_1	k_2	α	R_s	N_1 (platos/m)	N_2 (platos/m)
furalaxil	0,22	0,69	3,12	0,54	212	155	0,14	0,35	2,56	0,28	310	116	0,29	0,86	3,01	0,84	443	277
metalaxil	0,21	0,81	3,93	0,79	238	251	0,13	0,81	6,29	0,67	232	99	0,28	1,17	4,18	1,33	511	375
oxprenolol	0,76	2,93	3,84	1,45	125	320	0,29	1,03	3,56	1,17	410	442	0,61	2,83	4,65	1,75	463	244
metoprolol	0,84	1,71	2,04	0,52	77	156	0,24	-	-	-	67	-	0,58	1,48	2,56	1,20	430	475
propranolol	1,00	3,01	3,02	1,03	97	191	0,26	0,62	2,36	0,51	397	200	0,61	1,95	3,21	0,91	143	152

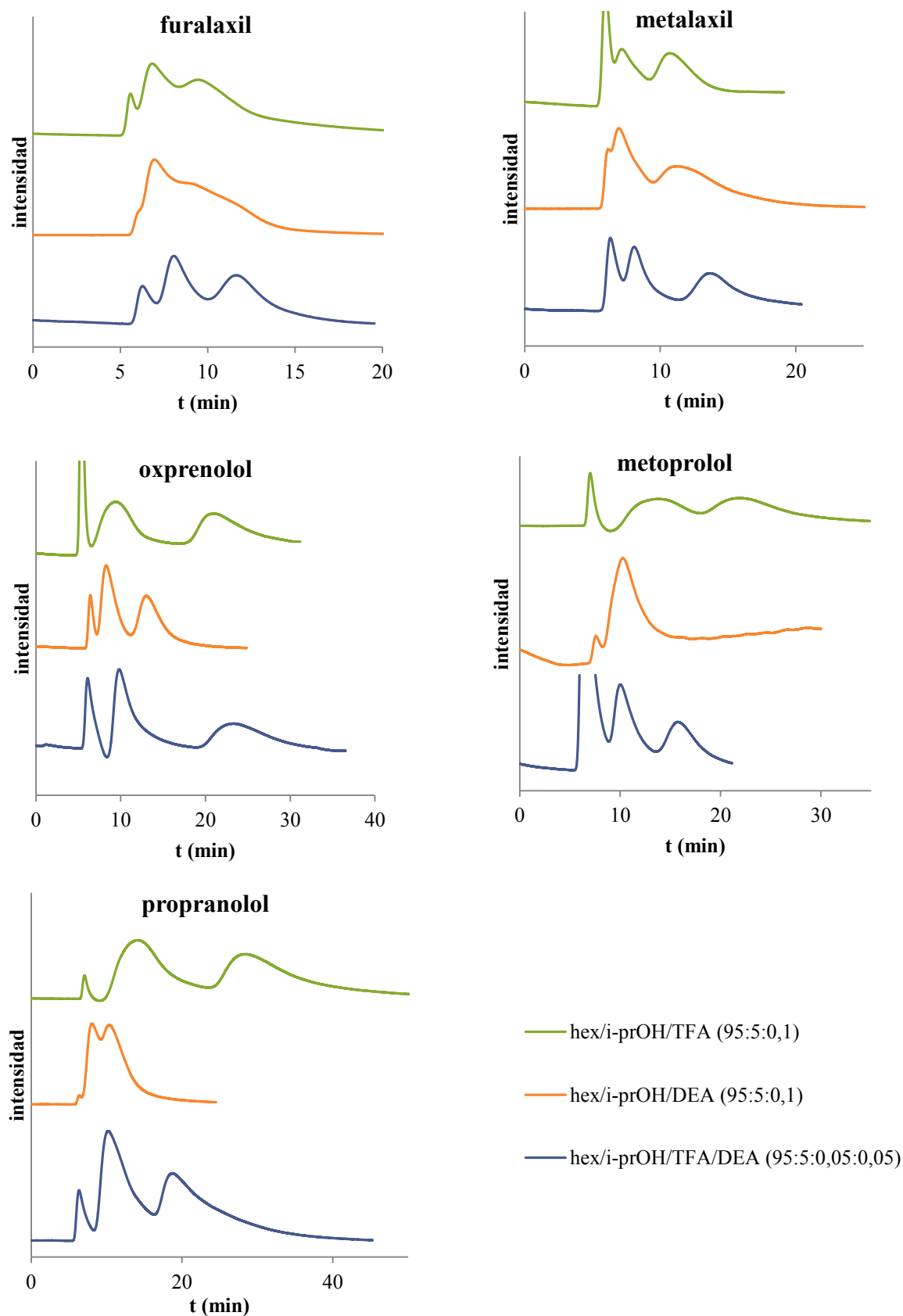


Figura 4.16. Cromatogramas de los analitos quirales estudiados en modo normal con aditivos en la fase móvil (TFA, DEA o ambos). En todos los casos $F=7,1\mu\text{L}/\text{min}$, $v_{\text{iny}}=0,1\mu\text{L}$ y $\lambda=230\text{nm}$.

4.3.3.2. Monolito modificado en medio ácido con H₂SO₄

La columna de poli(GMA-*co*-EDMA) también fue modificada por el pasaje de H₂SO₄, lo cual aporta dos grupos hidroxilo a la superficie monolítica por cada grupo proveniente del GMA. Luego de pasar por el monolito la solución de bis-CDMPC, se obtuvo la columna “poli(GMA-*co*-EDMA)-OH/bis-CDMPC”. El depósito del selector quiral fue confirmado dado que se lograron separar quiralmente con distintas fases móviles correspondientes al modo normal, furalaxil, metalaxil, benzoina y oxprenolol, con valores de α entre 1,93 y 3,05, y de R_s entre 0,30 y 1,35. En la **Figura 4.17** se muestran los resultados.

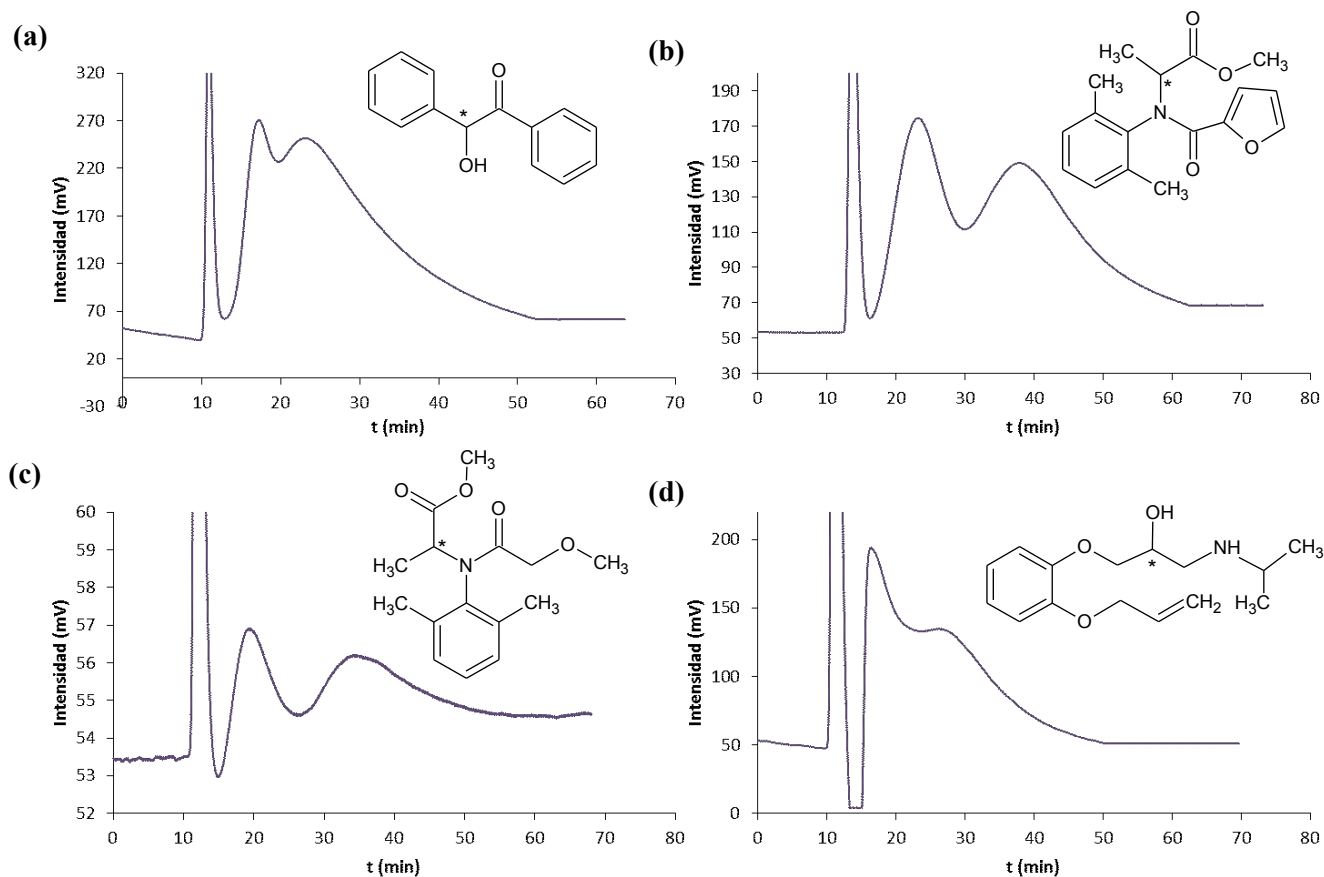


Figura 4.17. Cromatogramas de (a) benzoina (fase móvil: hex/*i*-prOH (95:5)), (b) furalaxil (fase móvil: hex/*i*-prOH (95:5)), (c) metalaxil (fase móvil: hex/*i*-prOH (95:5)), (d) oxprenolol (fase móvil: hex/*i*-prOH/DEA (95:5:0,1)). En todos los casos $F=5\mu\text{L}/\text{min}$, $v_{\text{iny}}=0,1\mu\text{L}$ y $\lambda=230\text{nm}$.

4.3.3.2.1. Influencia del uso de aditivos en la fase móvil

Se ensayaron corridas cromatográficas tanto en ausencia como con el agregado de TFA y DEA como aditivos en la fase móvil. En la **Tabla 4.4** se muestran los resultados obtenidos para los analitos separados.

Tabla 4.4. Factores de retención, k , enantioselectividad, α , y enantiorresolución, R_s , para los analitos separados con y sin aditivos en fase móvil.

Analito	hex/ <i>i</i> -prOH (95:5)				hex/ <i>i</i> -prOH/TFA (95:5:0,1)				hex/ <i>i</i> -prOH/DEA (95:5:0,1)			
	k_1	k_2	α	R_s	k_1	k_2	α	R_s	k_1	k_2	α	R_s
Benzoina	0,59	1,13	1,93	0,42	0,63	-	-	-	0,52	-	-	-
Furalaxil	0,69	1,77	2,56	0,65	0,60	1,40	2,33	0,53	0,62	1,58	2,55	0,55
Metalaxil	0,62	1,89	3,05	0,82	0,64	1,92	2,98	0,73	0,61	1,81	2,94	1,35
Oxprenolol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,44	0,90	2,03	0,30

Se destaca, en primer lugar, la separación de benzoina, analito que no se resolvió en la columna modificada con NH_3 . Respecto de los β -bloqueantes ensayados, propranolol, metoprolol y oxprenolol (todos ellos separados en la columna modificada con NH_3), el único que se separó en presencia de un aditivo básico en la fase móvil es el oxprenolol. En ausencia de aditivos o con aditivos ácidos, el factor de retención fue tan elevado que no se llegó a observar la elución del analito en un análisis de 80min. Estos dos resultados, en los que se observa una notable diferencia respecto a la columna modificada con NH_3 , indican que los analitos interaccionan fuertemente con el soporte monolítico y que dicha interacción no estereoespecífica afecta la enantioseparación de los mismos.

También en esta columna, poli(GMA-*co*-EDMA)-OH/bis-CDMPC, tanto el metalaxil como el furalaxil se separan sin mostrar cambios significativos con el agregado de aditivos en la fase móvil. Comparando los valores tanto de factor de retención como de enantioselectividad y enantiorresolución para estos analitos entre las columnas modificadas con NH_3 y H_2SO_4 , se puede observar que son similares, con lo cual se puede inferir que la cantidad de selector quiral adsorbida en ambos casos es comparable.

4.3.3.3. Efecto de memoria

En ocasiones, se ha observado que el uso de aditivos en fase móvil para separaciones quirales en columnas con fases estacionarias de polisacáridos genera efecto de memoria, es decir que el efecto del aditivo se sigue observando luego del lavado de la columna con fase móvil libre de dicho aditivo[30,31]. Esto ocurre cuando las interacciones entre el aditivo y la fase estacionaria son tan fuertes que éste queda adsorbido en la columna incluso luego del lavado con fase móvil, ya que los solventes que la componen no pueden desplazar al aditivo.

Para evaluar la presencia de efecto de memoria se fabricaron columnas nuevas para evitar la posible presencia previa de aditivos en las mismas. Se eligieron TFA y DEA como aditivos de prueba, ya que éstos permitieron obtener los mejores resultados para las enantioseparaciones estudiadas. Además, dado que uno de los aditivos es de naturaleza ácida y el otro de naturaleza básica, son representativos de los aditivos normalmente utilizados en cromatografía de líquidos. En la **Tabla 4.5** se muestran los factores de retención, los valores de selectividad y resolución del oxprenolol en ausencia de aditivos y en presencia de TFA y DEA en la fase móvil. Los cromatogramas correspondientes a dichas corridas cromatográficas, se muestran en orden cronológico en la **Figura 4.18**.

Como se puede observar en los cromatogramas de la **Figura 4.18** y en la **Tabla 4.5**, las columnas estudiadas presentan efecto de memoria, dado que el efecto de los aditivos luego de un lavado exhaustivo con la fase móvil de hex/*i*-prOH (95:5) (más de 350 volúmenes de columna) vuelve a dar prácticamente los mismos parámetros cromatográficos iniciales.

Es interesante observar que si bien la fase móvil de hex/*i*-prOH no es capaz de desplazar a los aditivos, la presencia de un nuevo aditivo, en este caso, desplaza al anterior. Para corroborar que este desplazamiento entre aditivos puede ocurrir en cualquier orden, es decir que la DEA desplaza completamente al TFA y viceversa, se ensayaron dos columnas sin uso previo, en donde las condiciones de corrida se realizaron en orden cronológico opuesto. Comparando las filas 2 y 6 de la **Tabla 4.5** (en gris), se puede observar que se vuelven a obtener los mismos parámetros cromatográficos iniciales

(dentro del error experimental) para el aditivo utilizado. De esta manera se demostró que el desplazamiento de los aditivos es total y que no se observan efectos combinados de los mismos. Esta conclusión es muy útil dado que permite validar los estudios previos realizados sobre el efecto de los aditivos en fase móvil.

Tabla 4.5. Factores de retención, selectividad y resolución para el oxprenolol en dos columnas sin uso previo, en presencia y ausencia de aditivos en la fase móvil.

	Fase móvil	k₁	k₂	α	Rs
Columna A	hex/ <i>i</i> -prOH (95:5)	0,26	0,91	3,58	0,84
	hex/ <i>i</i> -prOH/TFA (95:5:0,1)	1,16	5,23	4,52	2,19
	hex/ <i>i</i> -prOH (95:5)	1,52	6,29	4,13	2,68
	hex/ <i>i</i> -prOH/DEA (95:5:0,1)	0,59	1,66	2,83	1,98
	hex/ <i>i</i> -prOH (95:5)	0,72	2,06	2,87	1,68
	hex/ <i>i</i> -prOH/TFA (95:5:0,1)	1,21	5,06	4,18	2,33
Columna B	hex/ <i>i</i> -prOH (95:5)	0,34	1,19	3,54	1,25
	hex/ <i>i</i> -prOH/DEA (95:5:0,1)	0,23	1,02	4,50	1,59
	hex/ <i>i</i> -prOH (95:5)	0,33	1,23	3,75	1,09
	hex/ <i>i</i> -prOH/TFA (95:5:0,1)	1,25	5,02	4,03	2,86
	hex/ <i>i</i> -prOH (95:5)	1,23	4,71	3,82	3,09
	hex/ <i>i</i> -prOH/DEA (95:5:0,1)	0,31	1,26	4,12	1,48

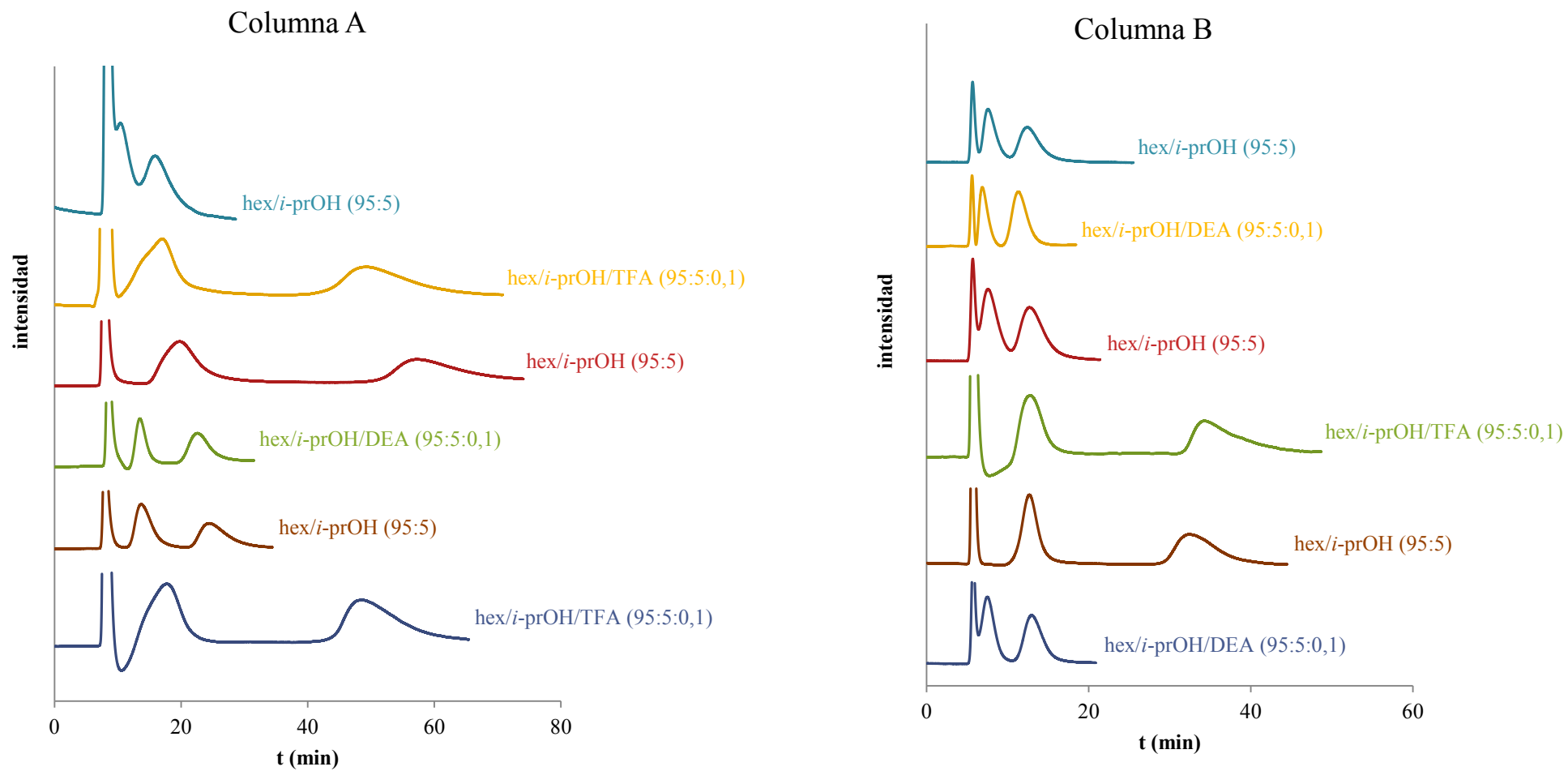


Figura 4.18. Cromatogramas cronológicos de arriba hacia abajo de la separación del oxprenolol en replicados de columnas (A y B) en presencia y ausencia de aditivos en fase móvil. En todos los casos, $F=7,1\mu\text{L}/\text{min}$, $v_{\text{iny}}=0,1\mu\text{L}$ y $\lambda=230\text{nm}$.

4.3.3.4. Eficiencia

La eficiencia de la columna de poli(GMA-*co*-EDMA)-NH₂/bis-CDMPC fue evaluada a través de una curva de van Deemter. Para ello se empleó anilina como analito de prueba, el cual posee un factor de retención de 0,73. Como las medidas se realizaron en modo normal, se utilizó isopropanol como marcador de tiempo muerto, t_0 , cuya señal se puede ver claramente en los cromatogramas como una perturbación en la línea de base en la longitud de onda de medida (254nm).

Con el tiempo muerto y la longitud de la columna, L , se puede calcular la velocidad lineal (u) de la fase móvil de acuerdo a $u=L/t_0$. A su vez, sabiendo que de la altura equivalente de plato teórico (H) es $H=L/N$, donde N es el número de platos, se puede calcular H para cada valor de u .

El gráfico de van Deemter obtenido experimentalmente para esta columna se muestra en la **Figura 4.19**.

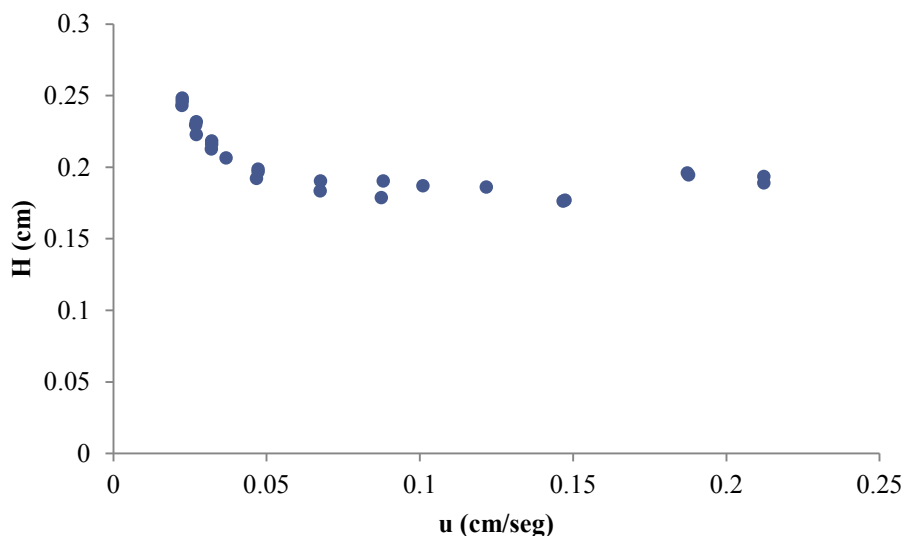


Figura 4.19. Curva de van Deemter para anilina en una columna de poli(GMA-*co*-EDMA)-NH₂/bis-CDMPC. Fase móvil: hex/*i*-prOH/DEA (95:5:0,1), $v_{iny}=0,1\mu\text{L}$ y $\lambda=254\text{nm}$.

De la **Figura 4.19** se obtuvo el mínimo valor de H (H_{min}), con un valor de 1,87mm, muy grande para esta columna en comparación a una monolítica de sílice, para la cual se han obtenido valores de H de 0,02mm[32]. La baja eficiencia puede deberse por un lado a la

típicamente baja área superficial que se obtiene en este tipo de columnas poliméricas, como se mencionó en la Sección 4.3.3.1 y por el otro, a un depósito de espesor finito no del todo homogéneo y/o uniforme de la fase estacionaria sobre el soporte.

De la **Figura 4.19** también se puede observar que la pendiente de la rama *C* de la curva es muy baja (casi nula), lo cual da cuenta de una muy baja resistencia a la transferencia de materia, típico de materiales monolíticos poliméricos, lo que puede atribuirse a la ausencia de microporos con fase móvil estanca, como ocurre con columnas de rellenos con partículas. Esta característica de los materiales monolíticos orgánicos, permite trabajar a caudales elevados, disminuyendo el tiempo de análisis sin perder eficiencia.

El ensanchamiento de los picos cromatográficos se debe tanto a factores propios del proceso separativo, los cuales ocurren dentro de la columna (factores intracolumna), como a factores propios del equipo, tales como el volumen de las tuberías, de la celda del detector o la frecuencia de adquisición de los datos, entre otros (factores extracolumna). Por lo tanto, la dispersión total del pico cromatográfico (σ_T^2), se deberá a la suma de ambas contribuciones ($\sigma_C^2 + \sigma_{EC}^2$). A su vez, asumiendo una distribución gaussiana, se puede correlacionar la varianza de dicha distribución (σ) con el ancho a mitad de altura del pico del cromatograma ($w_{1/2}$) de acuerdo a $\sigma = w_{1/2} / (2 \cdot (2 \cdot \ln 2)^{1/2})$. De esta manera, al medir el ancho de los picos cromatográficos con y sin columna en el sistema, se puede determinar la dispersión total del sistema, así como la contribución debida exclusivamente a los factores extracolumna.

Se midió el ancho del pico de la anilina en un sistema con y sin columna en 5 niveles y se determinó la relación de las contribuciones de la dispersión intracolumna y extracolumna. En promedio, se determinó que para este sistema, la dispersión extracolumna representa un 2% del total, la que es muy baja a pesar de haber utilizado un detector UV-Vis convencional de 1 μ L de volumen de celda, que puede resultar grande para el volumen de los picos en columnas capilares. Esto indica que casi todo el ensanchamiento del pico se debe a deficiencias de la columna fabricada (monolito y/o depósito del selector quiral). En la Sección 4.3.3.5 se estudiarán en detalle estos dos efectos.

4.3.3.5. Reproducibilidad

La reproducibilidad de las columnas preparadas se estudió midiendo los factores de retención y número de platos para una serie de cuatro replicados de columnas a partir de la misma mezcla de polimerización. Además, con el fin de hacer un seguimiento del proceso de fabricación de las mismas, aquellos parámetros se evaluaron a lo largo de todas las etapas de fabricación. Se seleccionaron nitrobenzono, fenol y anilina como analitos de prueba. Esta mezcla se inyectó en la columna del monolito “desnudo” de poli(GMA-*co*-EDMA). Luego, al modificar las columnas con NH₃ (poli(GMA-*co*-EDMA)-NH₂), sólo se inyectó anilina, ya que tanto el nitrobenzono como el fenol eluyeron junto con el tiempo muerto. Finalmente, al depositar la fase estacionaria quiral (poli(GMA-*co*-EDMA)-NH₂/bis-CDMPC), se inyectaron anilina y metalaxil racémico.

Como medida de la reproducibilidad en las columnas, se utilizó la desviación estándar relativa porcentual de los factores de retención de los analitos, así como del número de platos, calculada como $RSD\% = 100 \cdot s / \bar{x}$, siendo s la desviación estándar y \bar{x} la media de las medidas correspondientes. Los ensayos se realizaron por triplicado. Con respecto a los ensayos realizados en una misma columna (**Figura 4.20**), se obtuvieron valores de $RSD\%$ menores a 20 para todos los parámetros. Los resultados comparativos de los cuatro replicados en todas las etapas de fabricación, se encuentran en la **Tabla 4.6**. En todos los casos, los análisis cromatográficos se realizaron utilizando una fase móvil de hex/*i*-prOH (95:5) a un caudal de 7,1 μL/min, el volumen de inyección fue de 0,1 μL y la detección se realizó a 254nm para anilina, fenol y nitrobenzono y 230nm en el caso del metalaxil.

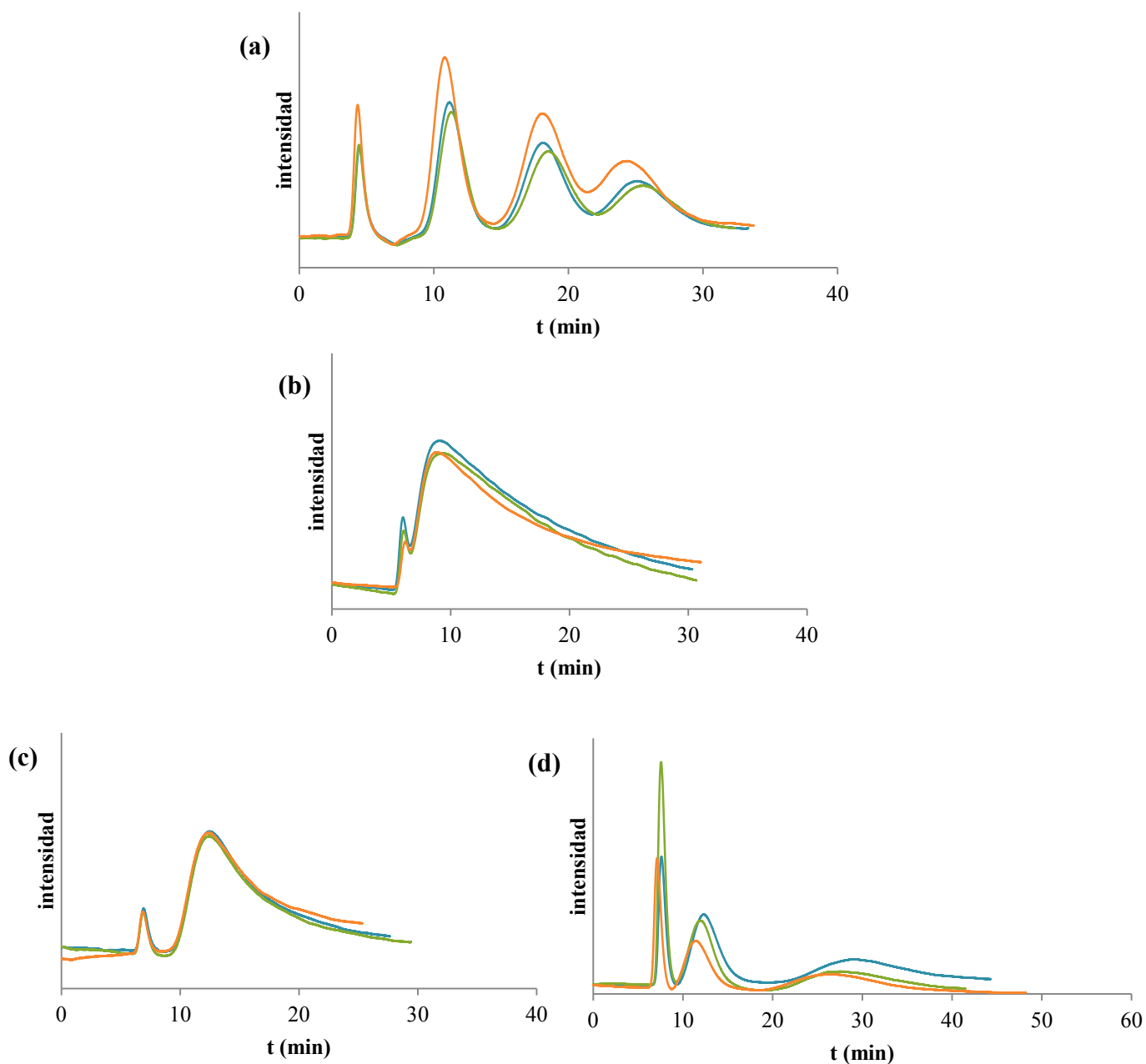


Figura 4.20. Cromatogramas de (a) nitrobenzeno, fenol y anilina en la columna 2 de poli(GMA-*co*-EDMA), (b) anilina en la columna 4 de poli(GMA-*co*-EDMA)-NH₂, (c) y (d) anilina y metalaxil respectivamente en la columna 1 de poli(GMA-*co*-EDMA)-NH₂/bis-CDMPC. Fase móvil: hex/*i*-prOH (95:5), F=7,1 μL/min, v_{iny}=0,1 μL y λ= 254nm para los analitos no quirales y 230nm para metalaxil.

Tabla 4.6. Desviación estándar relativa (*RSD%*) para los factores de retención (*k*) y número de platos por metro (*N*) para anilina, fenol, nitrobenzeno y metalaxil en las distintas etapas de fabricación de 4 columnas replicadas.

columna	poli(GMA-co-EDMA)						poli(GMA-co-EDMA)-NH ₂		poli(GMA-co-EDMA)-NH ₂ /bis-CDMPC					
	k _n	N _n	k _f	N _f	k _a	N _a	k _a	N _a	k _a	N _a	k _{S-m}	N _{S-m}	k _{R-m}	N _{R-m}
1	1,59	773	3,29	745	4,69	729	0,54	20	0,81	111	0,60	334	2,71	165
2	1,51	570	3,12	537	4,66	482	0,45	29	0,52	102	0,37	241	1,30	84
3	1,59	816	3,22	804	4,86	893	0,63	25	0,70	193	0,54	1062	2,47	743
4	1,55	803	3,21	850	4,68	910	0,50	18	0,41	167	0,26	395	0,81	186
RSD%	2,46	15,54	2,13	18,83	1,90	26,35	14,37	21,82	29,14	30,70	34,93	73,76	50,24	102,66

Los sufijos corresponden a los analitos, siendo n: nitrobenzeno, f: fenol, a: anilina, S-m: S-metalaxil y R-m: R-metalaxil.

De los resultados de la **Tabla 4.6** se observa que tanto para las columnas aquirales de poli(GMA-co-EDMA) como las columnas modificadas con NH₃ los valores de *RSD%* son relativamente bajos. Por el contrario, las columnas monolíticas quirales presentan valores de *RSD%* muy elevados, de hasta 50 para los factores de retención y más de 100 para el número de platos, indicando que las columnas resultantes no son reproducibles. Una de las razones podría ser la forma de realizar el depósito de la fase estacionaria. En literatura [33] se han reportado procedimientos donde luego de llenar las columnas con la solución de CDMPC, se dejó que la acetona (solvente en que se encontraba disuelto el selector quiral) se evapore a temperatura ambiente durante varias semanas. Probablemente el procedimiento utilizado en el presente trabajo de Tesis, donde la acetona se evapora durante dos días a 40°C sea muy brusco y se necesite recurrir a procedimientos de evaporación más suaves. Otra alternativa, sumada a la anterior, podría ser emplear soluciones de bis-CDMPC de concentración menor a 35mg/mL y realizar más de una etapa de depósito para conseguir un cubrimiento equivalente más uniforme de selector quiral.

4.3.3.6. Determinación de propranolol y metalaxil en muestras reales

Las columnas preparadas se utilizaron en la determinación de propranolol en un comprimido comercial y de metalaxil en dos formulaciones comerciales del plaguicida que se utilizan en el tratamiento de semillas. Los procedimientos de pretratamiento de las muestras se indicaron en la Sección 4.2.7. En el caso del metalaxil, los fabricantes indican que una de las formulaciones de metalaxil contiene el racemato del fungicida, mientras que para la otra se informa la presencia del enantiómero R. Los cromatogramas correspondientes a los extractos obtenidos se muestran en la **Figura 4.21**.

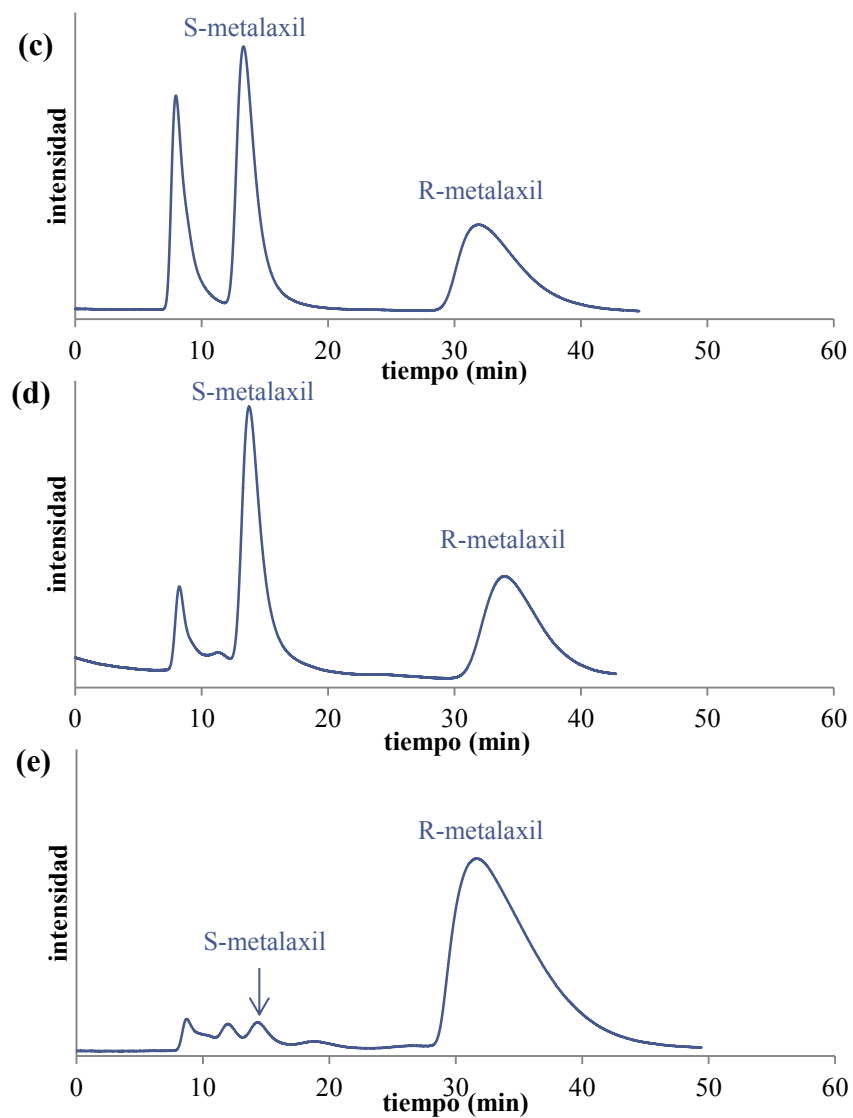
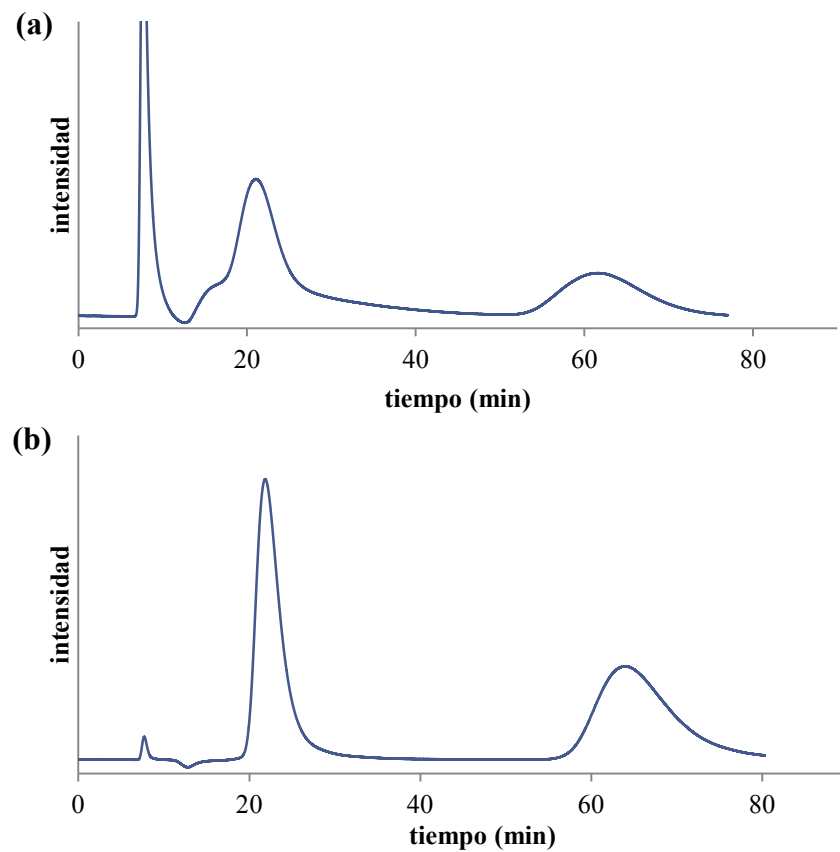


Figura 4.21. Cromatogramas correspondientes a (a) estándar de propranolol, (b) comprimido comercial de propranolol, (c) estándar de metaxilin y formulaciones comerciales de metaxilin: (d) R,S-metaxilin y (e) R-metaxilin. En todos los casos la fase móvil es hex/*i*-prOH/TFA/DEA (95:5:0,05:0,05), $F=7,1\mu\text{L}/\text{min}$, $v_{\text{iny}}=0,1\mu\text{L}$ y $\lambda=230\text{nm}$.

Se puede observar que en el cromatograma de la **Figura 4.21 (b)**, el extracto del comprimido de propranolol presenta una mezcla racémica del principio activo, que coincide con la separación del estándar puro. Los enantiómeros se separan a línea de base con una selectividad de 3,97 y una resolución de 4,05.

Para las muestras de metalaxil también se logró una separación a línea de base, con un valor de enantioselectividad de 4,66 y de enantiorresolución de 3,70. En el extracto del formulado de la mezcla racémica (**Figura 4.21 (d)**) se observó la presencia de ambos enantiómeros en igual proporción, mientras que en el extracto de la formulación del enantiómero R (**Figura 4.21 (e)**), se observó que el segundo enantiómero en eluir es el componente mayoritario, aunque también se pudo evidenciar la presencia minoritaria del primer enantiómero. Por inyección de un estándar del R-metalaxil, se determinó que el orden de elución es el enantiómero S en primer lugar y luego el enantiómero R, lo cual permitió corroborar que el enantiómero R es el que se encuentra en mayor abundancia en la muestra. Además por relación entre las áreas de los picos correspondientes a cada enantiómero, se determinó que la concentración del S-metalaxil es de 4,3% respecto al enantiómero R.

4.4. Conclusiones parciales

- Se sintetizó bis-(3,5-dimetilfenil)carbamato de celulosa (bis-CDMPC), como selector quiral. La estructura fue confirmada por espectroscopía IR, análisis elemental y ensayos de solubilidad.
- No se logró la unión covalente de bis-CDMPC al monolito de poli(GMA-co-EDMA), debido a que la baja polaridad del monómero funcional GMA no permitió interacciones suficientemente fuertes como para que el selector quiral se pueda adsorber, condición necesaria para la formación del posterior enlace covalente.
- Se logró adsorber el selector quiral bis-CDMPC sobre un monolito de poli(GMA-co-EDMA) previamente modificado con NH₃ y sobre un monolito previamente modificado con H₂SO₄. Esto demuestra la necesidad de tener un monolito polar con capacidad de formar puentes de H para poder adsorber el selector quiral empleado.

- Se lograron separar, en condiciones de fase normal, 5 pares racémicos en la columna tratada con NH₃ y 4 analitos racémicos en la columna tratada con H₂SO₄ con factores de enantioselectividad tan grandes como 19 y enantiorresoluciones tan grandes como 4,6, a pesar de las bajas eficiencias (N<500platos/m).
- Se evaluó el efecto de diversos aditivos en la fase móvil sobre la retención y selectividad de los analitos y se encontró que la composición de fase móvil con la que se obtienen mejores valores de enantioselectividad y enantiorresolución es hex/*i*-prOH/TFA/DEA (95:5:0,05:0,05). Se observó la influencia del soporte monolítico en la retención y enantioselectividad.
- Mediante un gráfico típico de van Deemter para la columna quiral tratada con NH₃, se observó el bajo impacto del término *C* sobre la altura equivalente de plato teórico, típico de los monolitos poliméricos.
- Se observó efecto de memoria al emplear TFA y DEA como aditivos en fase móvil, efecto que es reversible, dado que puede eliminarse si el lavado de la columna se realiza con una fase móvil que contenga al otro aditivo.
- Se evaluó la reproducibilidad de las columnas obtenidas y se observó que tanto el monolito de poli(GMA-*co*-EDMA) como la modificación con NH₃ dan lugar a columnas reproducibles, mientras que las columnas con el depósito del selector quiral son muy poco reproducibles, con lo cual se concluye que se debe mejorar el procedimiento de depósito.
- Se utilizaron las columnas desarrolladas para la determinación de propranolol en un medicamento, así como para la determinación de metalaxil en formulaciones comerciales para el tratamiento de semillas, confirmando la presencia de los analitos de interés y obteniendo excelentes enantioseparaciones.

4.5. Bibliografía

- [1] Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U., Wagenknecht, W., Comprehensive Cellulose Chemistry. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 1998.
- [2] Green, M. M., Nolte, R. J. M., Meijer, E. W. (Eds.), Materials-Chirality. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, United States of America, 2003.

- [3] Steinmeier, H., Zugenmaier, P., Homogeneous and Heterogeneous Cellulose Tri-esteres and a Cellulose Triurethane: Synthesis and Structural Investigations of the Crystalline State. *Carbohydr. Res.*, 1987, 164, 97–105.
- [4] Qiu, J., Dai, S., Chai, T., Yang, W., Yang, S., Zhao, H., in: Van de Ven, T. G. M., Godbout, L. (Eds.), *Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications*. InTech, 2013, pp. 215–240.
- [5] Ikai, T., Okamoto, Y., *Chiral Recognition in Separation Methods. Mechanisms and Applications*. Springer, Nagoya, Japan, 2010.
- [6] Okamoto, Y., Kawashima, M., Hatada, K., Controlled Chiral Recognition of Cellulose Triphenylcarbamate Derivatives Supported on Silica Gel. *J. Chromatogr.*, 1986, 363, 173–186.
- [7] Félix, G., Zhang, T., Chiral Packing Materials for High-Performance Liquid Chromatographic Resolution of Enantiomers Based on Substituted Branched Polysaccharides Coated on Silica Gel. *J. Chromatogr.*, 1993, 639, 141–149.
- [8] Scriba, G. K. E., Chiral Recognition in Separation Science – an Update. *J. Chromatogr. A*, 2016, 1467, 56–78.
- [9] Wainer, I. W., Alembik, M. C., Resolution of Enantiomeric Amides on a Cellulose-Based Chiral Stationary Phase. Steric and Electronic Effects. *J. Chromatogr.*, 1986, 358, 85–93.
- [10] Padró, J. M., Keunchkarian, S., State-of-the-Art and Recent Developments of Immobilized Polysaccharide- Based Chiral Stationary Phases for Enantioseparations by High-Performance Liquid Chromatography (2013 – 2017). *Microchem. J.*, 2018, 140, 142–157.
- [11] Yamamoto, C., Okamoto, Y., in: Gübitz, G., Schmid, M. G. (Eds.), *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA, 2004, pp. 173–181.
- [12] Armarego, W. L. F., Chai, C. L. L., *Purification of Laboratory Chemicals*. Elsevier, Burlington, MA, United States of America, 2009.
- [13] Zhang, Y. J., Huang, M., Zhang, Y., Ryoo, J. J., Preparation of Bonded Cellulose Tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) Chiral Stationary Phases by Using Three Bifunctional Reagents. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 2013, 34, 2623–2628.
- [14] Ming, Y., Zhao, L., Zhang, H., Shi, Y., Li, Y., Investigation of Enantiomer Separation by LC with a New Bonded Cellulose 3,5-Dimethylphenylcarbamate Chiral Stationary Phase. *Chromatographia*, 2006, 64, 273–280.
- [15] Shen, J., Liu, S., Li, P., Shen, X., Okamoto, Y., Controlled Synthesis and Chiral Recognition of Immobilized Cellulose and Amylose tris(cyclohexylcarbamate)s/3-(triethoxysilyl)propylcarbamates as Chiral Packing Materials for High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2012, 1246, 137–144.
- [16] Heinze, T., Liebert, T., Koschella, A., *Esterification of Polysaccharides*. Springer, Heidelberg, Germany, 2006.
- [17] Chankvetadze, B., Ikai, T., Yamamoto, C., Okamoto, Y., High-Performance Liquid Chromatographic Enantioseparations on Monolithic Silica Columns Containing a Covalently Attached 3,5-dimethylphenylcarbamate Derivative of Cellulose. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1042, 55–60.
- [18] Carrasco-Correa, E. J., Ramis-Ramos, G., Herrero-Martínez, J. M., Lämmerhofer, M., Polymethacrylate Monoliths with Immobilized Poly-3-Mercaptopropyl Methylsiloxane Film for High-Coverage Surface

- Functionalization by Thiol-Ene Click Reaction. *J. Chromatogr. A*, 2014, 1367, 123–130.
- [19] Parker, R. E., Isaacs, N. S., Mechanisms of Epoxide Reactions. *Chem. Rev.*, 1959, 59, 737–799.
- [20] Grieb, S. J., Matlin, S. a., Phillips, J. G., Belenguer, A. M., Ritchie, H. J., Chiral HPLC with Carbohydrate Carbamates: Influence of Support Structure on Enantioselectivity. *Chirality*, 1994, 6, 129–134.
- [21] Ling, F., Brahmachary, E., Xu, M., Svec, F., Fréchet, J. M. J., Polymer-Bound Cellulose Phenylcarbamate Derivatives as Chiral Stationary Phases for Enantioselective HPLC. *J. Sep. Sci.*, 2003, 26, 1337–1346.
- [22] Delebecq, E., Pascault, J.-P., Boutevin, B., Ganachaud, F., On the Versatility of Urethane/Urea Bonds: Reversibility, Blocked Isocyanate and Non-isocyanate Polyurethane. *Chem. Rev.*, 2013, 113, 80–118.
- [23] Echevarría, R., Keunchkarian, S., Reta, M., Desarrollo de Columnas Capilares Monolíticas Quirales Para Técnicas Separativas Miniaturizadas. Aplicación a La Enantioseparación de Compuestos de Interés Biológico, Universidad Nacional de La Plata, 2018.
- [24] Gillesepie, R. J., Hartman, J. S., Nuclear Magnetic Resonance Studies of Ketone.BF₃ Complexes. II. The Boron Trifluoride Catalyzed Condensation of Acetone. *Can. J. Chem.*, 1968, 46, 3799–3811.
- [25] Tasfiyati, A. N., Ifitah, E. D., Sakti, S. P., Sabarudin, A., Evaluation of Glycidyl Methacrylate-Based Monolith Functionalized with Weak Anion Exchange Moiety Inside 0.5 mm i.d. Column for Liquid Chromatographic Separation of DNA. *Anal. Chem. Res.*, 2016, 7, 9–16.
- [26] Blackwell, J. A., Stringham, R. W., Weckwerth, J. D., Effect of Mobile Phase Additives in Packed-Column Subcritical and Supercritical Fluid Chromatography. *Anal. Chem.*, 1997, 69, 409–415.
- [27] Ye, Y. K., Stringham, R. W., Wirth, M. J., Origin of Enhanced Chiral Selectivity by Acidic Additives for a polysaccharide-based stationary phase. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1057, 75–82.
- [28] Desire, C. T., Hilder, E. F., Arrua, R. D., Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley and Sons, Inc., 2017, pp. 1–37.
- [29] Ahmed, A., Forster, M., Clowes, R., Myers, P., Zhang, H., Hierarchical Porous Metal-Organic Framework Monoliths. *Chem. Commun.*, 2014, 50, 14314–14316.
- [30] Stringham, R. W., Lynam, K. G., Lord, B. S., Memory Effect of Diethylamine Mobile Phase Additive on Chiral Separations on Polysaccharide Stationary Phases. *Chirality*, 2004, 16, 493–498.
- [31] Ye, Y. K., Lord, B., Stringham, R. W., Memory Effect of Mobile Phase Additives in Chiral Separations on a Chiralpak AD Column. *J. Chromatogr. A*, 2002, 945, 139–146.
- [32] Chankvetadze, B., Yamamoto, C., Tanaka, N., Nakanishi, K., Okamoto, Y., High-Performance Liquid Chromatographic Enantioseparations on Capillary Columns Containing Monolithic Silica Modified with Cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate). *J. Sep. Sci.*, 2004, 27, 905–911.
- [33] Lin, H., Ou, J., Tang, S., Zhang, Z., Dong, J., Liu, Z., Zou, H., Facile Preparation of a Stable and Functionalizable Hybrid Monolith via Ring-Opening Polymerization for Capillary Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2013, 1301, 131–138.

Conclusiones generales

- Se desarrollaron y caracterizaron materiales monolíticos tanto de naturaleza orgánica como inorgánica, evaluando la influencia de diversos parámetros experimentales en la estructura del material resultante.
- Se desarrolló un monolito de poli(GMA-*co*-EDMA) de elevada permeabilidad ($4,6 \times 10^{-12} \text{m}^2$), robusto, pero con una baja área superficial ($9 \text{m}^2/\text{gr}$).
- Se obtuvo un monolito de sílice de elevada área superficial ($266 \text{m}^2/\text{gr}$), muy resistente mecánicamente, pero difícil de anclar a la pared del capilar (para diámetros de capilar mayores a $50 \mu\text{m}$).
- Se sintetizó con éxito bis-(3,5-dimetilfenil)carbamato de celulosa como selector quiral y se caracterizó el producto obtenido.
- Se desarrollaron columnas enantioselectivas por adsorción de bis-CDMPC sobre monolitos de poli(GMA-*co*-EDMA) a los que se realizaron dos tratamientos diferentes en la superficie, uno empleando NH_3 y el otro empleando H_2SO_4 , a fin de obtener grupos de diferente polaridad en la superficie monolítica para poder establecer interacciones por puentes de hidrógeno con el selector quiral y comparar el grado de adsorción del mismo.
- Empleando el monolito con el selector quiral adsorbido poli(GMA-*co*-EDMA)- NH_2 /bis-CDMPC se separaron 5 analitos racémicos, mientras que con el monolito de poli(GMA-*co*-EDMA)-OH/bis-CDMPC se separaron 4 racematos. Se estudió la influencia de diversos aditivos en fase móvil, en la retención y selectividad de las columnas.
- Se evaluó la eficiencia de las columnas enantioselectivas, observándose una muy baja resistencia a la transferencia de masa. También se observó efecto de memoria en las mismas, frente al uso de TFA y DEA como aditivos en la fase móvil.
- Se estudió la reproducibilidad de las columnas desarrolladas y se concluyó que tanto la síntesis del soporte monolítico de poli(GMA-*co*-EDMA) como

el soporte modificado con NH_3 son reproducibles, mientras que el depósito del selector quiral genera irreproducibilidad en las columnas resultantes.

- Se utilizaron las columnas quirales obtenidas para el análisis cualitativo en muestras reales, en particular se logró la enantioseparación de propranolol y metalaxil en compuestos comerciales.

Anexo: Técnicas de caracterización

A.1. Caracterización de materiales porosos

A.1.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido o SEM (por sus siglas en inglés) es una técnica que permite obtener información tanto de la estructura como de la composición de superficies sólidas. Consiste en la irradiación de la muestra con un haz de electrones que interacciona de forma inelástica para dar lugar a diferentes señales medibles, tales como electrones secundarios, retrodispersados, Auger y rayos x. En la **Figura A.1** se encuentra un esquema de los procesos electrónicos involucrados en la radiación que se puede medir en un análisis de SEM, así como un diagrama de la penetración relativa de dichas formas de radiación en la muestra.

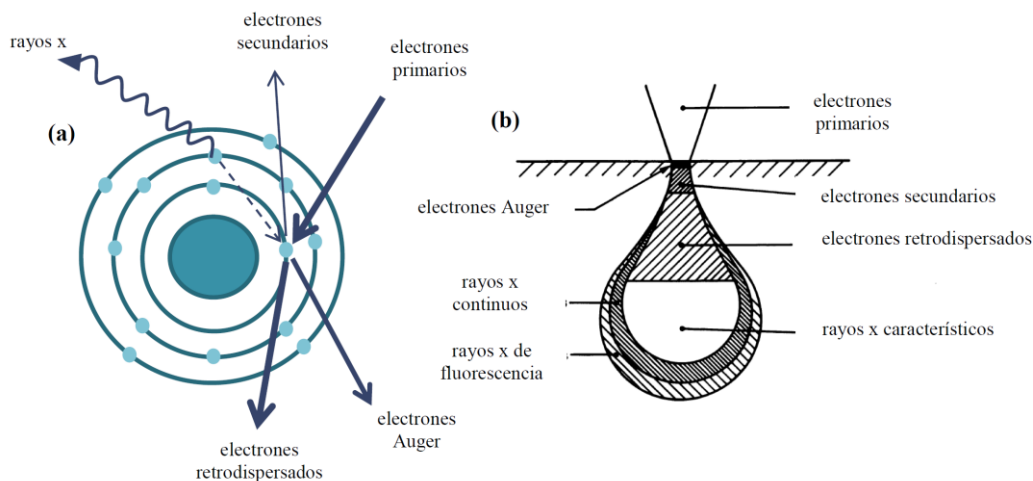


Figura A.1. (a) Esquema de las interacciones inelásticas entre el haz de electrones primarios y los átomos de la muestra[1]. (b) Esquema del alcance de los distintos tipos de electrones y radiación que se pueden medir en un análisis SEM[2].

Las muestras deben ser conductoras para poder ser escaneadas en un microscopio SEM, por lo que aquellos sólidos no conductores, como es el caso de los polímeros

monolíticos tanto orgánicos como inorgánicos, deben ser tratados previamente al análisis mediante el depósito de una capa delgada de algún material conductor, en general oro, platino o grafito.

Cuando se registran los electrones secundarios, se obtiene una imagen de la topografía de la superficie de la muestra. Esto se debe a que los electrones secundarios son de baja energía, por lo que sólo pueden recorrer una distancia de entre 1 y 10nm, es decir que únicamente los electrones secundarios superficiales son capaces de llegar al detector. Los electrones retrodispersados permiten tener un registro tanto de la topografía como de la composición de la muestra, ya que la intensidad depende de la masa atómica de los elementos que la componen. Por otro lado, al detectar los rayos x se obtiene información de la distribución elemental de la muestra, gracias a que el espectro de rayos x es característico de cada elemento[1].

Un microscopio de barrido electrónico consta de una fuente que emite electrones, los cuales son acelerados al pasar por una columna que posee lentes electromagnéticas y rendijas que permiten focalizar el haz. Una cámara en vacío contiene al portamuestra, a donde llega el haz de electrones y un detector permite el registro de las señales emitidas. En la **Figura A.2** se puede observar un esquema de un microscopio SEM.

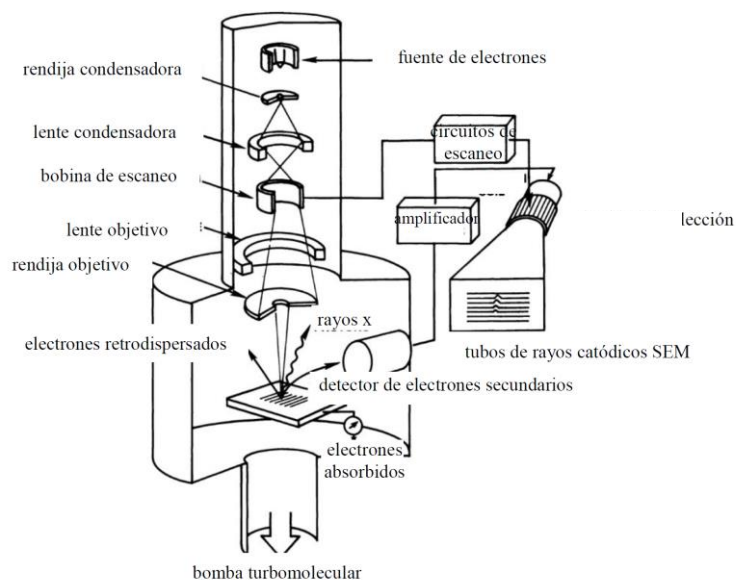


Figura A.2. Esquema de un microscopio electrónico de barrido[2].

A.1.2. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno BET

El modelo de adsorción de un gas inerte sobre una superficie sólida propuesto por Brunauer, Emmett y Teller, o isoterma BET, considera la posibilidad de que se generen multicapas del adsorbente. Bajo la suposición de que las moléculas de gas adsorbidas no interaccionan de forma lateral entre sí, que el calor de adsorción de la primer monocapa es constante y que el calor de adsorción de las siguientes capas corresponde al de condensación[3], el modelo BET permite arribar a la siguiente ecuación:

$$\frac{n}{n_{mon}} = \frac{C}{\left(1 - \frac{P}{P_0}\right) \left(1 + \frac{P}{P_0}(C-1)\right)} \frac{P}{P_0} \quad (\text{A.1})$$

Donde n es el número total de moles de gas adsorbidos, n_{mon} es el número de moles de una monocapa, P la presión del sistema, P_0 la presión de vapor del adsorbato y C una constante relacionada con parámetros termodinámicos de acuerdo a la **Ecuación A.2**.

$$C = \frac{a_1 k_1^{ad}}{a_i k_i^{ad}} e^{(Q_1 - Q_i)/RT} \approx e^{(Q_1 - Q_i)/RT} \quad (\text{A.2})$$

En esta ecuación a_1 y a_i son factores de frecuencia, k^{ad} es la constante de equilibrio de adsorción (donde el sufijo 1 corresponde a la primer monocapa y el i a las siguientes), Q_1 es el calor de adsorción, Q_i el calor de condensación, R la constante general de los gases y T la temperatura[4].

La forma que adoptan las isotermas depende del tipo de sólido adsorbente. En los sólidos macroporosos se forma una monocapa a presiones bajas y luego a medida que ésta aumenta comienzan a formarse las siguientes capas, como se muestra en la **Figura A.3**. Los sólidos mesoporosos presentan un comportamiento similar al de los macroporosos a presiones bajas, pero al aumentar la presión, ocurre condensación en los mesoporos, lo cual se observa como un salto en la isoterma debido al gran aumento de volumen de adsorbato incorporado por el material. En los sólidos microporosos se requiere una presión mayor para cubrir la superficie, observándose condensación también a una presión más elevada. Una vez que los microporos están llenos, se puede ver un comportamiento como el de los materiales macro o mesoporosos. En la **Figura**

A.4 se muestran gráficas típicas de isothermas correspondientes a materiales de diferentes porosidades.

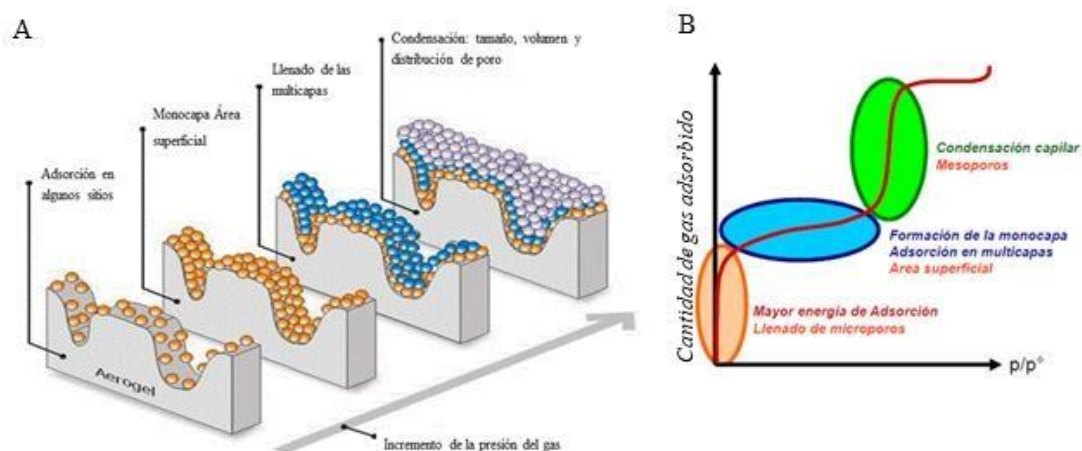


Figura A.3. Esquema representativo de (a) la adsorción de las moléculas de N_2 sobre la superficie de los poros y (b) isoterma de adsorción correspondiente[5].

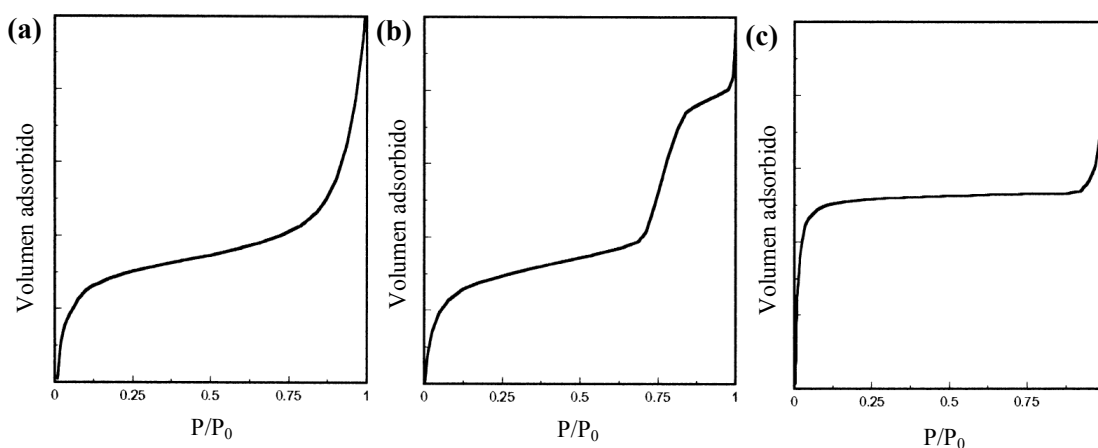


Figura A.4. Isothermas de adsorción BET para un sólido (a) macroporoso, (b) mesoporoso y (c) microporoso[3].

Cuando se miden las curvas de adsorción y desorción, se observa un fenómeno de histéresis, que consiste en un corrimiento a menores presiones para la desorción. Cuando la geometría de los poros es cilíndrica, el adsorbato condensa primero en las paredes y estas capas de líquido se van engrosando hasta hacer contacto entre sí y llenar completamente el poro. Sin embargo, durante la desorción, la evaporación comienza en

la boca del poro, dando lugar a una región de vapor de radio mayor al de la etapa de adsorción, como puede observarse en la **Figura A.5**. En el caso de geometría esférica de los poros, suele haber un angostamiento entre la región esférica del poro y la superficie externa del sólido. Por lo tanto, tanto el ingreso como el egreso del adsorbente ocurren desde dicha región angosta. Durante la condensación, al engrosarse la capa de líquido superficial, se genera un tapón de líquido en el cuello del poro y queda retenida una burbuja que disminuye de tamaño a medida que aumenta la presión. Por el contrario, en el proceso de evaporación, el líquido comienza a desalojar el poro primero en la región angosta del cuello, dando una distribución del adsorbente diferente respecto al poro en el proceso de mojado.

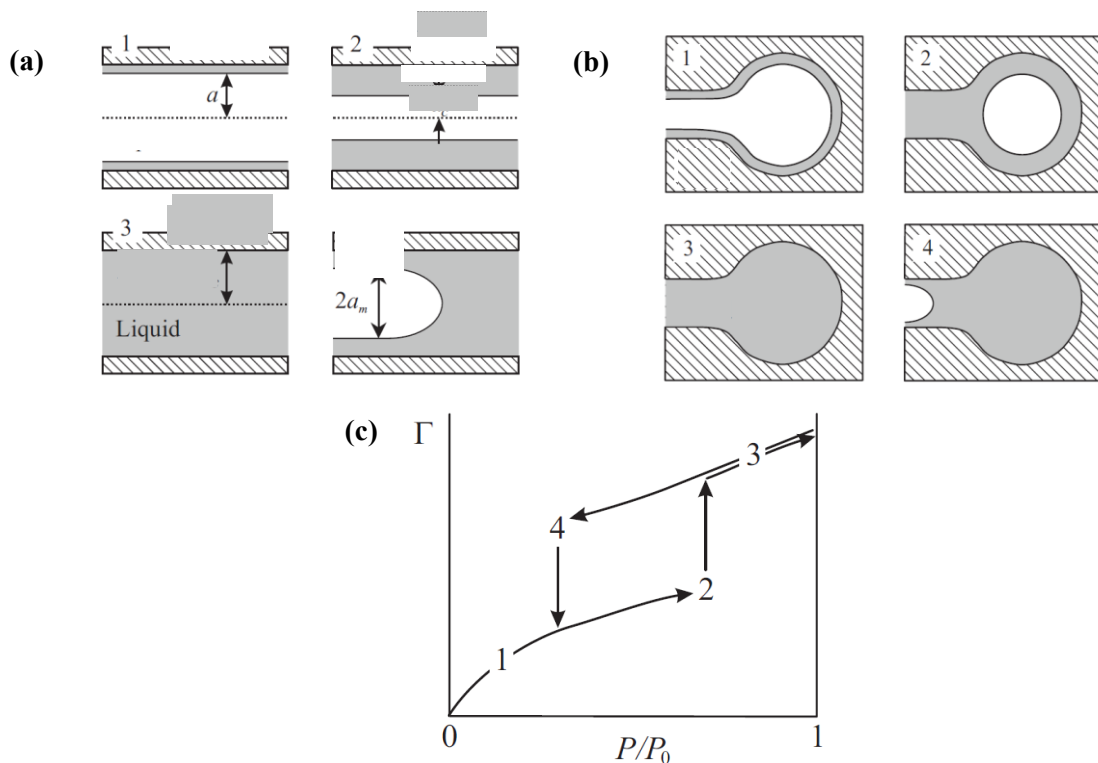


Figura A.5. Proceso de mojado y evaporación en poros (a) cilíndricos y (b) esféricos. (c) Isotherma en la que se observa la histéresis (Γ representa el exceso superficial, es decir los moles de adsorbente por unidad de área de la superficie del sólido)[4].

Al medir el volumen o la masa de adsorbente en función de la presión del sistema, se pueden obtener las isothermas BET. Además, al reordenar la **Ecuación A.1** se obtiene una expresión que permite calcular el área superficial.

$$\frac{P/P_0}{V^{ad}(1-P/P_0)} = \frac{1}{CV_{mon}^{ad}} + \frac{(C-1)}{CV_{mon}^{ad}} P/P_0 \quad (\text{A.3})$$

Donde V^{ad} es el volumen adsorbido y el sufijo *mon* hace referencia a la monocapa. Al graficar $\frac{P/P_0}{V^{ad}(1-P/P_0)}$ en función de P/P_0 se obtiene una recta y de la pendiente y ordenada al origen pueden calcularse los valores de la constante C y V^{ad} de la monocapa. Conociendo el área transversal de la molécula del gas que se utilice como adsorbente, se puede calcular el área superficial del material, S_g , a partir del volumen de adsorción de la monocapa[6].

A.1.3. Porosimetría de intrusión de mercurio (MIP)

El mercurio es un líquido a temperatura ambiente que no moja la mayoría de los sólidos. Debido a esta capacidad de no mojado, el mercurio es capaz de ingresar a los poros de un material únicamente por una fuerza externa que aumente la presión del líquido. Existe una relación entre la presión aplicada y el tamaño de los poros en los cuales penetra el mercurio, dada por la ecuación de Washburn (**Ecuación A.4**)[3]:

$$P = \frac{2\gamma \cos \theta}{r_p} \quad (\text{A.4})$$

Donde P es la presión aplicada, γ la tensión superficial del mercurio, θ el ángulo de contacto (que en general se asume de 140°) y r_p el radio de los poros, que se consideran cilíndricos.

Experimentalmente, para realizar un análisis de MIP se coloca la muestra en un penetrómetro similar al esquema de la **Figura A.6** y se realiza vacío. Luego, se deja ingresar mercurio al portamuestra y finalmente se aplica gradualmente presión sobre el sistema, forzando así el ingreso del mercurio a los poros de la muestra. El volumen de mercurio que ingresa a los poros coincide con la diferencia de volumen del líquido en el capilar del penetrómetro. Debido a que se forma un capacitor entre el mercurio que se encuentra dentro del capilar y el metal conductor que se encuentra en el exterior, las diferencias en la altura de la columna de mercurio se verán reflejadas en un cambio de

capacitancia que puede ser medido. El registro del volumen de intrusión en función de la presión permite tener información sobre la distribución de poros del material.

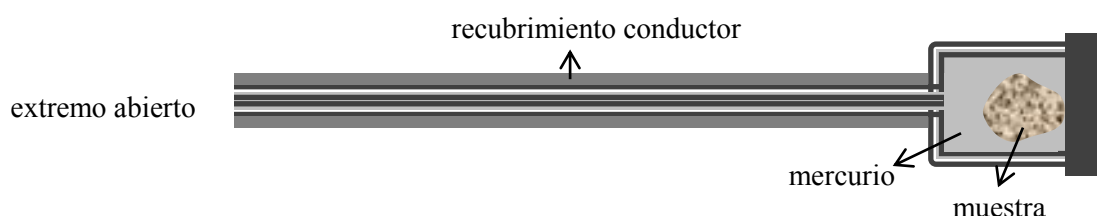


Figura A.6. Esquema de la estructura de un penetrómetro.

Este método se limita a poros de radio mayor a 2nm debido a las elevadas presiones requeridas para llenar poros más pequeños[4], por lo que en general se utiliza la porosimetría de intrusión de mercurio para la caracterización de *macro-* o *mesoporos*. De esta manera, las isothermas BET y la MIP son técnicas complementarias.

Si bien ambas técnicas deberían arrojar el mismo valor de área superficial para un determinado sólido macro o mesoporoso, cuando la muestra es frágil, como ocurrir en el caso de algunos materiales monolíticos, puede ocurrir que el mercurio a alta presión rompa la estructura del sólido y de esta manera se acceda a poros cerrados inaccesibles en la muestra original, dando así un valor de área superficial con un error por exceso[3].

Las medidas de MIP permiten conocer el *volumen total de poros*, la densidad total del material, la densidad del esqueleto (es decir del sólido sin considerar el volumen de los poros) y tanto el *tamaño* como la *abundancia de los poros*[7].

A.2. Caracterización de la fase estacionaria

A.2.1. Análisis elemental de CHNS

Un análisis elemental permite cuantificar la composición de los elementos de una dada muestra. En el caso de muestras orgánicas, se suele determinar la composición porcentual en masa de C, H, N y S, y en el caso de tener O, se calcula por diferencia. Para realizar el análisis, la muestra es introducida en un horno a 1000°C donde, en

presencia de O_2 , entra en combustión. Esta combustión puede operarse en dos modos, uno denominado estático, en el que un cierto volumen de O_2 ingresa al tubo de combustión previo a la entrada de la muestra, o un modo dinámico, en el que el ingreso de O_2 ocurre en simultáneo con la muestra a un cierto caudal por un tiempo determinado. Durante el proceso de combustión, el C de la muestra se convierte en CO_2 , el H en H_2O , el N en una mezcla de N_2 y óxidos de nitrógeno, y el S en SO_2 .

Luego de que la muestra pasa por la cámara de combustión, se utilizan una serie de adsorbentes para retener productos de combustión de otros elementos presentes en la muestra. Los productos de combustión generados son arrastrados por un gas inerte (en general He) a una cámara que se encuentra a $600^\circ C$ y que posee placas de Cu de alta pureza. La función del Cu es eliminar el O_2 que no reaccionó y convertir los óxidos de N en N_2 . Finalmente, los gases son separados y cuantificados por un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica[8].

A.2.2. Espectrometría infrarroja

Una técnica muy utilizada para la caracterización de compuestos orgánicos es la espectrometría infrarroja (IR), ya que permite detectar la presencia de distintos grupos funcionales en una molécula.

La radiación IR puede ser absorbida por las moléculas, excitando los modos vibracionales. Existen dos formas de vibración, el estiramiento y la flexión de los enlaces químicos. Únicamente aquellos modos vibracionales que generen un cambio del momento dipolar de la molécula pueden ser observados en el IR ya que esta alteración en el campo eléctrico debido a un cambio en la distribución de carga puede acoplarse a la oscilación eléctrica de la radiación IR. La longitud de onda de dicha absorción depende de la masa de los átomos involucrados, la fuerza de enlace entre ellos y la geometría de la molécula. En el espectro IR se suele graficar la transmitancia en función del número de onda ($\bar{\nu}$), que corresponde a la inversa de la longitud de onda.

En la región de números de onda elevados, de entre 1300 y 4000cm^{-1} , se pueden observar bandas características de distintos grupos funcionales. Entre 650 y 900cm^{-1} , se encuentra la región de absorción de enlaces C-H tanto alifáticos como aromáticos,

donde se pueden observar patrones característicos de acuerdo a la sustitución de los mismos. En la región intermedia, entre 900 y 1300cm^{-1} , se encuentra una zona que se denomina “huella digital” que presenta una serie de bandas originadas en la interacción de modos vibracionales. Debido a que esta región presenta un conjunto complejo de bandas, suele presentar un patrón característico para la molécula en estudio. Por lo tanto, la comparación de la región de la “huella digital” entre dos espectros permite diferenciar a dos compuestos que presentan los mismos grupos funcionales pero poseen diferente estructura.

La espectrometría IR no es una técnica de identificación absoluta de compuestos, pero es muy útil para la caracterización de los mismos[9].

A.3. Bibliografía

- [1] Michler, G. H., *Electron Microscopy of Polymers*. Springer, Heidelberg, Germany, 2008.
- [2] Young, R. A., Kalin, R. V., in: Casper, L. (Ed.), *Microelectronics Processing: Inorganic Materials Characterization*. American Chemical Society, Washington, DC, USA, 1986, pp. 49–74.
- [3] Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola, G., Venturelli, B., Surface Area and Pore Texture of Catalysts. *Catal. Today*, 1998, 41, 207–219.
- [4] Butt, H.-J., Graf, K., Kappl, M., *Physics and Chemistry of Interfaces*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2013.
- [5] Echevarría, R., Keunchkarian, S., Reta, M., *Desarrollo de Columnas Capilares Monolíticas Quirales Para Técnicas Separativas Miniaturizadas. Aplicación a La Enantioseparación de Compuestos de Interés Biológico*, Universidad Nacional de La Plata, 2018.
- [6] Collins, A. M., *Nanotechnology Cookbook*. Elseiver, 2012.
- [7] Webb, P. A., *An Introduction To The Physical Characterization of Materials by Mercury Intrusion Porosimetry with Emphasis On Reduction And Presentation of Experimental Data.*, 2001, 23.
- [8] Thompson, M., AMC Technical Briefs. *R. Soc. Chem.*, 2008, 7, 1–2.
- [9] Silverstein, R. M., Webster, F. X., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA, 1998.