



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:
Desarrollo de Sistemas para la Electroseparación
Enantiomérica de Compuestos Quirales

Tesista: Carlina Lancioni

Director: Leonardo G. Gagliardi

Co-directora: Sonia Keunchkarian

Año: 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabajo de Tesis Doctoral:
Desarrollo de Sistemas para la Electroseparación
Enantiomérica de Compuestos Quirales

Tesista: Carlina Lancioni

Director: Leonardo G. Gagliardi

Co-directora: Sonia Keunchkarian

Año: 2019

El presente trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA) de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Leonardo G. Gagliardi y la co-dirección de la Dra. Sonia Keunchkarian. El mismo se presenta a consideración de las autoridades de dicha Facultad con el objeto de acceder al grado académico de Doctora de la Facultad de Ciencias Exactas, Área Química.

Índice

	Índice
Agradecimientos	I
Publicaciones	II
Acrónimos y abreviaturas	V
Lista de símbolos	VII
Capítulo 1 Introducción	1
1.1 QUIRALIDAD	2
1.1.1 Descubrimiento de la quiralidad molecular	2
1.1.2 Definiciones e importancia	4
1.1.3 Determinación de enantiómeros	6
1.2 MÉTODOS ELECTROSEPARATIVOS	8
1.2.1 Antecedentes históricos	8
1.2.2 Instrumentación	9
1.2.3 Principios básicos de la electroforesis	10
1.2.3.1 Electroforesis	10
1.2.3.2 Flujo Electroosmótico	12
1.3 MODOS DE OPERACIÓN EN ELECTROFORESIS CAPILAR	14
1.3.1 Electroforesis capilar en zonas (CZE)	14
1.3.2 Electroforesis capilar en gel (CGE)	15
1.3.3 Isoelectroenfoque capilar (CIEF)	16
1.3.4 Isotacoforesis capilar (CITP)	16
1.3.5 Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)	17
1.3.6 Electro cromatografía capilar (CEC)	18
1.3.6.1 Columnas capilares para CEC	19
1.3.6.2 Fabricación de columnas capilares particuladas	22
1.3.6.2.1 Preparación de frits	22
1.3.6.2.2 Llenado con el material particulado	23
1.4 ELECTROSEPARACIONES QUIRALES	28
1.4.1. Selectores quirales	28

	Índice
1.5 OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES CONTINUAS	35
1.6 ANALITOS	39
1.6.1 Betabloqueantes	39
1.6.2 Anticolinérgicos	40
1.7 REFERENCIAS	42
Capítulo 2 Objetivos	48
2.1 OBJETIVO GENERAL	49
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
Capítulo 3 Experimental	50
3.1 REACTIVOS Y MATERIALES	51
3.2 INSTRUMENTOS	54
3.3 PROCEDIMIENTOS	57
3.3.1 Estudio del equilibrio de asociación analito-ligando	57
3.3.2 Optimización de la concentración de selector quiral	59
3.3.3 Fabricación de columnas capilares particuladas	59
3.3.3.1 Preparación de frits	59
3.3.3.2 Llenado con el material particulado	60
Capítulo 4 Resultados y Discusión	64
4.1 ESTUDIO DEL EQUILIBRIO DE ASOCIACIÓN ANALITO-LIGANDO	65
4.1.1 Modelo teórico	65
4.1.2 Determinación de constantes termodinámicas de asociación	68
4.1.3 Elucidación de contribuciones al mecanismo de separación	73
4.2 OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SELECTOR QUIRAL	80
4.3 FABRICACIÓN DE COLUMNAS RELLENAS PARTICULADAS	87

	<u>Índice</u>
4.3.1 Preparación de frits	87
4.3.2 Llenado con el material particulado	91
4.4 REFERENCIAS	94
Capítulo 5 Conclusiones	95

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cecilia Castells, por introducirme desde su rol docente a las técnicas separativas durante mi formación de grado, y por permitirme realizar mi Tesis Doctoral en el LIDMA.

Al Dr. Leonardo G. Gagliardi por la dirección de este trabajo de Tesis y por estar siempre dispuesto a desarmar, rearmar y sobre todo a taladrar equipos.

A la Dra. Sonia Keunchkarian por la dirección de este trabajo de Tesis y por salirse tantas veces de esa posición para ocupar la posición de psicóloga-amiga, alentándome de todas las formas posibles para no bajar los brazos y concretar esta meta.

A la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, casa de estudios que posibilitó mi formación de grado y de posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca otorgada para la realización de este trabajo de Tesis.

A mis compañeros y amigos del LIDMA; Gi, Ester, Romi, Fiore, Juan, Agus, Nico, Brenda, Dami, Marcos, Emilia, Lilian y Mario. Gracias por todos los momentos compartidos, hicieron que el día a día fuera indudablemente mucho más divertido!

A Simón; por los consejos, por el aliento y por darme confianza y apoyo con tanto amor y paciencia en la recta final.

A Oriana, mi princesa, quien llegó durante el desarrollo de esta Tesis a enseñarme día a día la tarea de ser tía y a darle a toda la familia momentos de unión, alegría y felicidad.

A mis hermanos y cuñados; Orne, Neri, Nico y Lucía por estar siempre presentes.

...A mi Mamá y a mi Papá...

Las siguientes publicaciones contienen parte de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis:

Revistas científicas

- “Determination of Thermodynamic Binding Constants by Affinity Capillary Electrophoresis”

Carlina Lancioni, Sonia Keunchkarian, Cecilia B. Castells, Leonardo G. Gagliardi

Talanta 192 (2019) 448-454.

DOI: 10.1016/j.talanta.2018.09.044



Determination of thermodynamic binding constants by affinity capillary electrophoresis

Carlina Lancioni, Sonia Keunchkarian, Cecilia B. Castells, Leonardo G. Gagliardi*

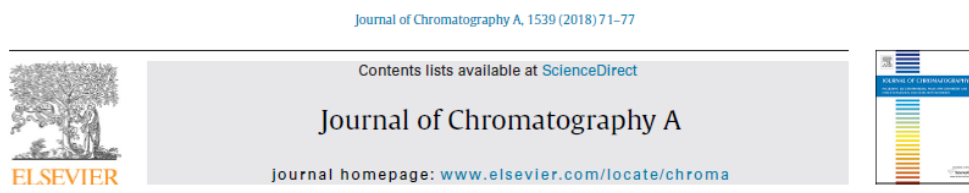
Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos, LIDMA, Facultad de Ciencias Exactas, (Universidad Nacional de La Plata, CIC-PBA, CONICET), Calle 47 esq. 115 (B1900AII), La Plata, Buenos Aires, Argentina

- “Enantiomeric Separations by Capillary Electrophoresis: Theoretical Method to Determine Optimum Chiral Selector Concentration”

Carlina Lancioni, Sonia Keunchkarian, Cecilia B. Castells, Leonardo G. Gagliardi.

Journal of Chromatography A. 1539 (2018) 71-77

DOI: 10.1016/j.chroma.2018.01.002



Enantiomeric separations by capillary electrophoresis: Theoretical method to determine optimum chiral selector concentration[☆]

Carlina Lancioni, Sonia Keunchkarian, Cecilia B. Castells, Leonardo G. Gagliardi*

Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos, LIDMA, Facultad de Ciencias Exactas (Universidad Nacional de La Plata, CIC-PBA, CONICET), Buenos Aires, Argentina

Congresos, Jornadas y Simposios

- 24th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology. Mendoza, Argentina (2018).
“Determination of Thermodynamic Binding Constants by Affinity Capillary Electrophoresis”. Carlina Lancioni; Sonia Keunchkarian; Leonardo G. Gagliardi
- 24th Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology. Mendoza, Argentina (2018).
“Affinity Capillary Electrophoresis: more or less selective than chromatography?”. Leonardo G. Gagliardi; Carlina Lancioni; Sonia Keunchkarian
- IX Congreso Argentino de Química Analítica. Rio Cuarto, Argentina (2017).
“Electroforesis capilar de afinidad: Determinación de constantes termodinámicas de asociación”. Carlina Lancioni; Sonia Keunchkarian; Leonardo G. Gagliardi.
- IX Congreso Argentino de Química Analítica. Rio Cuarto, Argentina (2017).
“Separaciones quirales mediante electroforesis capilar: tratamiento matemático para determinar la concentración óptima de selector quiral”. Carlina Lancioni; Sonia Keunchkarian; Leonardo G. Gagliardi.
- 15th Instrumental Analysis Conference, Barcelona, Spain (2017). “A new quality criterion to optimize separations of bioactive compounds in capillary electrophoresis”. Roger Però-Gascón, Carlina Lancioni, Victòria Sanz-Nebot, Marcos Tascón, Leonardo G. Gagliardi, Fernando Benavente.
- 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Prague, Czech Republic (2017). “Capillary Electrophoresis

Chiral Separations: Mathematical Approach to Determine Optimum Chiral Selector Concentration". Carlina Lancioni, Sonia Keunchkarian, Leonardo G. Gagliardi.

Otras presentaciones en congresos comprendidas en el período de desarrollo de esta tesis.

- VIII Congreso Argentino de Química Analítica, La Plata, Argentina (2015). "Determinación de cationes inorgánicos por CE utilizando detección UV indirecta en muestras de alta fuerza iónica". Lancioni, C.; Aspromonte, J. A.; Tascón, M.; Gagliardi, L. G.

Acrónimos y abreviaturas

- 2-HP- β -CD	2-hidroxipropil- β -ciclodextrina
- ACE	<i>Affinity Capillary Electrophoresis</i> . Electroforesis capilar de afinidad.
- BGE	<i>Background Electrolyte</i> . Electrolito soporte.
- CD	Ciclodextrina
- CE	<i>Capillary Electrophoresis</i> . Electroforesis capilar.
- CEC	<i>Capillary Electrochromatography</i> . Electro cromatografía capilar.
- cEKC	<i>Capillary Electrokinetic Chromatography</i> . Cromatografía electrocinética capilar.
- CGE	<i>Capillary Gel Electrophoresis</i> . Electroforesis capilar en gel.
- CIEF	<i>Capillary Isoelectric Focusing</i> . Enforque isoelectrico capilar.
- CITP	<i>Capillary Isotachopheresis</i> . Isotacoforesis capilar.
- CZE	<i>Capillary Zone Electrophoresis</i> . Electroforesis capilar en zonas.
- DC	Dicroísmo circular.
- EKC	<i>Electrokinetic Chromatography</i> . Cromatografía electrocinética.
- EOF	<i>Electroosmotic Flow</i> . Flujo electroosmótico.
- GC	<i>Gas Chromatography</i> . Cromatografía gaseosa.
- HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> . Cromatografía líquida de alto rendimiento.
- IR	Espectroscopia infrarroja.
- MEKC	<i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i> . Cromatografía electrocinética micelar.

- ORD *Optical Rotatory Dispersion*. Dispersión óptica rotatoria.
- pI Punto isoeléctrico.
- RMN Resonancia magnética nuclear.
- SFC *Supercritical Fluid Chromatography*. Cromatografía de fluido supercrítico.

Símbolos

- v	Velocidad.
- μ_{ef}	Movilidad electroforética (efectiva) de un soluto.
- E	Campo eléctrico.
- V	Voltaje aplicado.
- L_t	Longitud total del capilar.
- q	Carga del ión.
- F_E	Fuerza eléctrica.
- F_F	Fuerza de fricción.
- η	Viscosidad.
- r	Radio del ión.
- μ_a	Movilidad aparente.
- μ_{EOF}	Movilidad del flujo electroosmótico.
- ϵ	Constante dieléctrica o permitividad de la solución.
- ζ	Potencial zeta.
- α	Selectividad.
- d	Movilidad diferencial. Criterio de calidad de separación o factor de respuesta de Clark.
- p	Término de selectividad. Criterio de calidad de separación o factor de respuesta de Giddings y Gebauer.
- p'	Criterio de calidad de separación o factor de respuesta de Jorgenson.
- t'	Criterio de calidad de separación o factor de respuesta de Tascón.

- T'	Función escalar de optimización multicomponente.
- L_d	Longitud del capilar desde la entrada hasta la ventana de detección.
- t_m	Tiempo de migración.
- i	Corriente.
- K_f	Constante termodinámica de asociación.
- k_f	Constante estequiométrica de asociación.
- K_d	Constante termodinámica de disociación.
- k_d	Constante estequiométrica de disociación.
- a	Actividad.
- γ	Coefficiente de actividad.
- μ_{ef}^*	Movilidad electroforética corregida por viscosidad.
- $\Delta\mu_e$	Diferencia de movilidad electroforética entre enantiómeros.
- $[X]$	Concentración de ligando/selector quiral

Capítulo 1
Introducción

1.1 QUIRALIDAD

1.1.1 Descubrimiento de la quiralidad molecular

La cadena histórica de eventos que llevaron al desarrollo de la estereoquímica molecular en el siglo XIX tiene sus orígenes en la observación de quiralidad en compuestos obtenidos de organismos vivos. La correlación de sus propiedades cristalográficas con aquellas encontradas en muestras minerales (siendo esta área la más desarrollada en aquel momento), fue fundamental para su entendimiento¹⁻³.

En 1801, el cristalógrafo R. H. Haüy observó que la simetría aparentemente hexagonal de los cristales de cuarzo en realidad se encontraba reducida por pequeñas caras hemiédricas (pequeñas modificaciones asimétricas en vértices alternados del cristal). La hemiedría tiene un efecto marcado en la simetría del cristal, dado que reduce los objetos de simetría y da lugar a imágenes especulares no superponibles del cristal de cuarzo, que pueden ser reconocidas por su aspecto externo.

En 1811, F. Arago descubrió la actividad óptica (una herramienta necesaria en el estudio de la quiralidad a escala molecular) que fue relacionada con el cristal de cuarzo, dado que fue el primer material en el cual se observó rotación óptica. Inmediatamente luego, el físico J. B. Biot descubrió que el cuarzo natural existía en dos formas que rotaban el plano de polarización en direcciones opuestas⁴. En 1822, J. W. F. Herschel identificó que las dos formas del cuarzo correspondían a dos formas hemiedrales⁵. Las estructuras de dichos cristales se representan en la Figura 1.1.

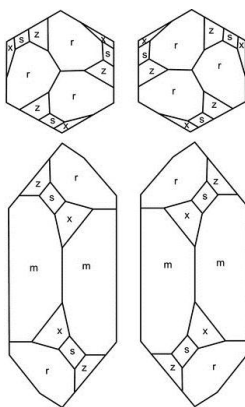


Figura 1.1. Estructura de las dos formas hemiedrales del cristal de cuarzo.

La teoría ondulatoria de la luz fue ganando aceptación con el tiempo y dos años más tarde A. J. Fresnel llegó a la conclusión de que la luz linealmente polarizada puede considerarse como la superposición de la luz circularmente polarizada hacia la izquierda y hacia la derecha, hecho que permitió profundizar en los requerimientos de simetría para la existencia de actividad óptica⁶. En 1832, Biot notó que el efecto de la rotación óptica en el plano de la luz polarizada no era específico de los cristales sino que también ocurría en ciertos productos naturales en estado líquido⁷. Entre los ejemplos que se pueden mencionar se encontraban las soluciones acuosas de ácido tartárico, dado que en el año 1843⁸ Biot observó un comportamiento atípico entre dos sustancias isoméricas de fórmula $C_4H_6O_6$: el ácido (+)-tartárico (natural) ópticamente activo, y el entonces llamado ácido paratartárico que es químicamente idéntico pero ópticamente inactivo. Por los años 1847-1848, Louis Pasteur decide que el caso requiere un mayor estudio y, asistido por Biot, prepara cristales de sales de sodio y amonio del ácido ópticamente inactivo y resuelve las mezclas utilizando lupa y pinzas, separándolas en dos grupos (ver Figura 1.2) de igual número de moléculas que en solución dan rotaciones ópticas iguales y opuestas⁹.

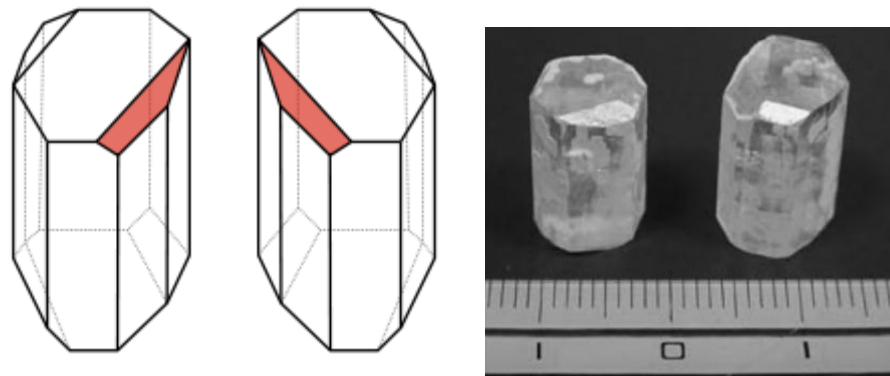


Figura 1.2. Estructura de cristales de tartrato de sodio y amonio: a) (-)-enantiómero, b) (+)-enantiómero

De este descubrimiento surge el hecho de que las moléculas deben ser representadas en tres dimensiones, fue entonces que en el año 1874 los químicos J. H. van't Hoff^{10,11} y J. A. Lebel¹² propusieron independiente y casi simultáneamente, el átomo de carbono asimétrico como base para la quiralidad molecular, es decir, que las cuatro valencias del átomo de carbono se distribuyen espacialmente hacia los vértices de un tetraedro centrado en el carbono, de modo que cuando los cuatro sustituyentes son diferentes, pueden

obtenerse dos distribuciones tetraédricas (A y B) que son entre sí imágenes especulares como se muestra en la Figura 1.3.

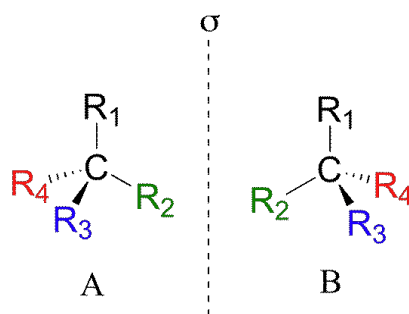


Figura 1.3. Representación espacial de un átomo de carbono asimétrico. R_1 , R_2 , R_3 y R_4 representan cuatro sustituyentes diferentes.

Esto proporcionó la explicación del fenómeno de asimetría molecular descubierto por Pasteur y la existencia de “isómeros ópticos”¹³.





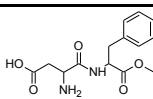
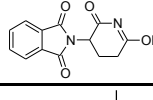
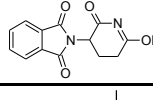
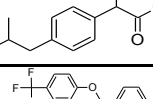
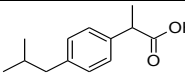
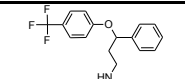
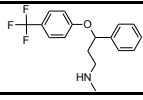
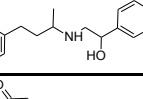
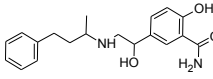
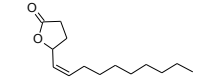
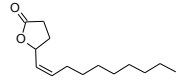
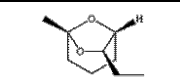
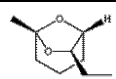
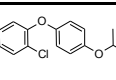
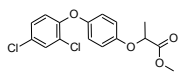
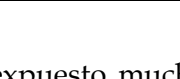
1.1.2 Definiciones e importancia

La ciencia que estudia de la estructura tridimensional molecular se denomina estereoquímica (del griego *stereos*, “sólido”) y un aspecto importante de la misma es la estereoisomería. Los **isómeros** son compuestos diferentes que poseen la misma fórmula molecular, mientras que los **estereoisómeros** son una clase particular de isómeros que solo se diferencian por la orientación espacial de sus átomos, siendo iguales los enlaces entre átomos (o grupos de átomos). Aquellos estereoisómeros que no se superponen con sus imágenes especulares se denominan **isómeros ópticos o enantiómeros** y la mezcla de ambas formas moleculares en iguales proporciones se conoce como **mezcla racémica**. Una molécula que presenta al menos un centro asimétrico, recibe el nombre de **molécula quiral**. Por otro lado, si los estereoisómeros no son superponibles, pero tampoco son imágenes especulares entre sí (como los isómeros *cis-* y *trans-*) o como las moléculas con más de un centro quiral, se clasifican como **diastereoisómero o diasterómero**.

Los enantiómeros tienen propiedades físicas y químicas idénticas, excepto que su entorno también sea quiral, situación en la que pueden exhibir comportamientos diferentes¹⁴. El

entorno natural es quiral y por ende la quiralidad y la vida se encuentran íntimamente relacionadas en el sentido de que la mayoría de las funciones biológicas son inherentemente quirales^{1,15,16}. Prácticamente todos los fenómenos fisiológicos se basan en interacciones moleculares precisas en las que los receptores quirales reconocen a las dos moléculas huésped enantioméricas de modos diferentes, de forma tal que la actividad fisiológica de compuestos quirales exógenos puede verse afectada^{17,18}. En la Tabla 1.1 se presenta una serie de ejemplos de compuestos quirales, y se describe la propiedad de cada isómero.

Tabla 1.1. Ejemplos de compuestos quirales, y descripción de la propiedad de cada isómero.

Compuesto	Isómero	Propiedad		
Carvona		R	Aroma a menta	Aditivos alimenticios
		S	Aroma a alcaravea	
Limoneno		R	Aroma a naranja	
		S	Aroma a limón	
Aspartamo		R, R	Sabor dulce	
		S, R	Sabor amargo	
Talidomida		R	Sedante, antiemético	Fármacos
		S	Teratogénico	
Ibuprofeno		R	Inerte	
		S	Analgésico, antiinflamatorio	
Fluoxetina		R	Antidepresivo	
		S	Antimigraña	
Labetalol		S, R	Alfa-bloqueante	
		R, R	Beta-bloqueante	
Japolinure		R	Inhibidor sexual	Feromonas
		S	Feromona sexual (escarabajo)	
Brevicomina		(+)	Feromona activa (gusano pino)	
		(-)	Inerte	
Diclofop metil		R (+)	Herbicida	Pesticidas
		S (-)	Inactivo	

Si bien se han expuesto muchos ejemplos de actividades estereoselectivas de fármacos, aditivos alimenticios, feromonas y pesticidas, entre otros, las aplicaciones más importantes y numerosas de las técnicas quirales son las de la industria farmacéutica^{19,20}. El desarrollo

de principios activos o fármacos enantioméricamente puros no solo requiere de la síntesis enantioselectiva o de técnicas de separación quiral para el aislamiento de las sustancias, sino también de técnicas para la determinación y análisis de cada isómero.

1.1.3 Determinación de enantiómeros

Actualmente se dispone de un gran número de métodos que pueden emplearse para la determinación de enantiómeros, y se han reportado un gran número de trabajos en la temática²¹⁻³¹. Los mismos pueden clasificarse en técnicas espectroscópicas o en técnicas cromatográficas.

Dentro de las técnicas espectroscópicas se encuentran las clásicas técnicas tales como la polarimetría, la dispersión óptica rotatoria (ORD), y el dicroísmo circular (DC). En estos casos es imprescindible conocer los valores de rotación específica del enantiómero puro, que depende de un gran número de factores (pH, concentración del analito, temperatura, naturaleza del solvente, etc). También existen otras técnicas espectroscópicas alternativas que son empleadas con mayor frecuencia como la espectroscopia infrarroja (IR) y la resonancia magnética nuclear (RMN), sin embargo resultan muy sensibles a interferencias tanto quirales como aquirales que pueden estar presentes en las muestras reales.

Respecto a las técnicas cromatográficas, estas han ido desplazando a las técnicas espectroscópicas, dado que presentan importantes ventajas frente a las anteriores por tratarse de métodos sensibles, reproducibles y confiables que pueden aplicarse en muestras con una gran variedad de matrices. Dentro de esta clasificación se incluyen la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de fluido supercrítico (SFC), cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía gaseosa (GC) y electroforesis capilar (CE).

Asimismo, la aplicación de técnicas para la determinación de compuestos quirales implica también la selección de un método que puede ser tanto indirecto como directo. Por un lado, los métodos indirectos consisten en transformar los enantiómeros en diastereoisómeros por reacción previa con un reactivo quiral. Dado que los diastereoisómeros presentan propiedades fisicoquímicas diferentes, la determinación se

realiza posteriormente con las técnicas no quirales convencionales. Por otro lado, los métodos directos, consisten básicamente en añadir una sustancia que genere un entorno quiral, de modo de establecer un equilibrio dinámico para formar diastereoisómeros transitorios que generen comportamientos cromatográficos diferenciales.

El presente trabajo de tesis abordará el desarrollo de sistemas para la electroseparación enantiomérica de compuestos quirales, de modo que se limitará a la descripción de métodos electroseparativos, y particularmente a los métodos directos de determinación enantiomérica.

1.2 MÉTODOS ELECTROSEPARATIVOS

1.2.1 Antecedentes históricos

La electroforesis capilar (CE) es una técnica analítica moderna, que surge como resultado de la combinación de los mecanismos de separación electroforéticos (electroforesis convencional) y de los conceptos de instrumentación de la cromatografía. La separación en electroforesis se basa en la velocidad de migración diferencial entre sustancias cargadas cuando se encuentran bajo la acción de un campo eléctrico.

La electroforesis comenzó a desarrollarse a principios del siglo XVIII, en manos de A. Tiselius quien realizaba sus experimentos en tubos de vidrio con forma de U, y a los cuales les aplicaba una corriente continua de unos cientos de voltios. Dado que los tubos presentaban diámetros internos relativamente grandes, la eficiencia en solución libre estaba limitada por calentamiento Joule y por convección. Estos fenómenos se producen por la resistencia al paso de corriente a través de una solución, la cual genera calor que se disipa, produciendo gradientes de temperatura y por lo tanto, convección. Como solución a dicho inconveniente es que comenzaron a utilizarse medios anticonvectivos tales como geles de poliacrilamida, de sílice o de agarosa. Sin embargo, este tipo de experimentos presentaban las desventajas de requerir tiempos de análisis muy largos, bajas eficiencias y dificultades en cuanto a la detección y automatización. En un segundo intento por minimizar dichos efectos, se emplearon tubos de vidrio de menor diámetro, ya que al poseer una menor sección transversal, el calor generado se disipa con mayor facilidad.

Los trabajos iniciales en tubo abierto fueron realizados por Hjertén^{32,33} en 1967, en aquel entonces solo había disponibles tubos de entre tres y un milímetro de diámetro interno, de modo que los rotaba alrededor de su eje longitudinal para minimizar los efectos convectivos. El avance de la tecnología no permitió el desarrollo de la electroforesis en su máximo potencial, hasta que años más tarde, con el advenimiento de los tubos de sílice de diámetro capilar, Mikkers^{34,35} y Virtanen³⁶⁻³⁸ desarrollaron electroforesis en capilares de entre 200 y 500 μm , sin la necesidad de rotarlos. No obstante, no tuvieron demasiado éxito dado que las eficiencias que obtenían eran bajas debido tanto a la sensibilidad de los

detectores existentes en ese momento como también a la sobrecarga de la columna como consecuencia de la imposibilidad de inyectar pequeños volúmenes de muestra.

En 1981, Jorgenson y Lukacs fueron considerados los primeros en demostrar en la práctica la alta eficiencia de las separaciones por electroforesis en tubos capilares de sílice de 100 μm de diámetro interno, aplicando campos eléctricos elevados (30 kVm^{-1})³⁹⁻⁴¹. Fue en ese momento que se sentaron los fundamentos básicos de la técnica y se establecieron teorías simples sobre los mecanismos de separación y de dispersión de las bandas electroforéticas. En los años siguientes, se introdujeron algunos cambios tendientes a la obtención de nuevos modos de CE para dar versatilidad a la técnica, pero manteniendo las bases de la misma intactos. A fines de la década del '80, ya se comercializaban instrumentos de CE que permitieron un enorme avance de la técnica durante de la década siguiente, incluyendo el desarrollo del equipo en lo que respecta a la adaptación a una gran variedad de detectores.

1.2.2 Instrumentación

Una de las principales ventajas de la CE es que su instrumentación es relativamente simple y robusta. En el esquema de la Figura 1.4, se representan los componentes básicos: el equipo de CE consta de un capilar de sílice fundida cuyos extremos se ubican en dos reservorios. Paralelamente a dichos extremos se ubican dos electrodos de platino, que están conectados con una fuente de alto voltaje.

Por último, el sistema de detección se realiza en el mismo tubo o capilar, es decir "on-column", como puede apreciarse en el esquema de la figura 1.4. Esta es la configuración generalmente empleada en CE, e implica que el mismo capilar actúa como celda del detector; por lo tanto la principal consecuencia de este tipo de sistemas, es que los límites de detección (LOD) son mucho más elevados debido a que los volúmenes o cantidades a detectar son mucho menores. Sin embargo, la versatilidad que se obtiene es mucho mayor ya que permite detectar en distintas zonas y acoplar con otros detectores, tanto por separado como en simultáneo.

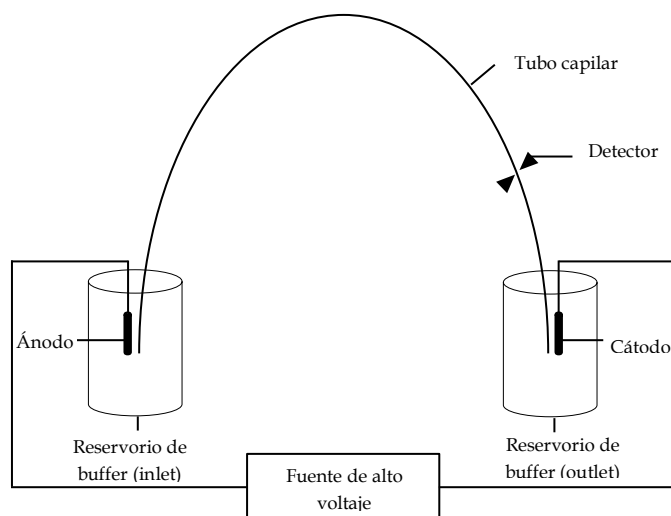


Figura 1.4. Representación esquemática de los componentes básicos de un equipo de electroforesis capilar.

Adicionalmente, el equipo de CE puede contar con otros accesorios para mejorar la automatización del sistema. Se pueden mencionar controladores de temperatura (por medio de líquidos refrigerantes o bien por aire), dispositivos de inyección múltiple, inyector automático y presurizadores, entre otros.

1.2.3 Principios básicos de la electroforesis

1.2.3.1 Electroforesis

El principio de separación electroforética se basa en las diferencias de velocidad de los solutos parcial o completamente ionizados en un medio dado, conocido como electrolito soporte (BGE por sus siglas en inglés) dentro de un campo eléctrico aplicado. Matemáticamente se expresa de la siguiente forma:

$$v = \mu_{ef}E \quad [1.1]$$

Donde v es la velocidad del soluto, μ_{ef} la movilidad electroforética del soluto y E el campo eléctrico aplicado. Este último puede expresarse en función del voltaje aplicado (V) y la longitud total del capilar (L_t), que son dos parámetros experimentales fácilmente medibles:

$$E = \frac{V}{L_t} \quad [1.2]$$

La movilidad electroforética de un ión en un medio determinado, es una constante característica de dicho ión, y es directamente proporcional a la fuerza eléctrica (F_E) e inversamente proporcional a la fuerza de fricción (F_F) que experimenta el ión en dicho medio:

$$\mu_{ef} \propto \frac{\text{Fuerza eléctrica } (F_E)}{\text{Fuerza de fricción } (F_F)} \quad [1.3]$$

Expresando la fuerza eléctrica a partir de las leyes de la electrostática como:

$$F_E = qE \quad [1.4]$$

Donde q es la carga del ión. Aproximando la fuerza de fricción con la ecuación de Stokes-Einstein, considerando que los iones son esféricos:

$$F_F = -6\pi\eta r v \quad [1.5]$$

Donde η es la viscosidad de la solución empleada como BGE y r es el radio del ión, que puede ser reemplazado por el radio de Stokes.

Si se considera que durante la electroforesis se alcanza un estado estacionario, en donde ambas fuerzas se encuentran balanceadas, es decir, iguales y opuestas:

$$F_E = -F_F \quad [1.6]$$

$$qE = 6\pi\eta r v \quad [1.7]$$

Reemplazando v en esta ecuación por la dada en [1.1], se obtiene una expresión que describe la movilidad electroforética a partir de parámetros físicos:

$$\mu_{ef} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad [1.8]$$

Del análisis de la misma se hace evidente que iones pequeños y altamente cargados tienen movilidades elevadas. Asimismo, las movilidades son independientes del campo eléctrico y por lo tanto del voltaje aplicado y de la longitud del capilar.

1.2.3.2 Flujo Electroosmótico

En CE, la fuerza impulsora de la separación está dada por el flujo electroosmótico (EOF). El EOF es el flujo neto del seno del líquido contenido en el capilar, el cual surge como consecuencia del efecto de la aplicación de un campo eléctrico sobre la carga superficial debida principalmente a la ionización de los grupos silanoles del interior del capilar, que es usualmente de sílice fundida. Dicho EOF afecta la cantidad de tiempo que el soluto permanece dentro del capilar, es decir el tiempo de migración. Por este motivo es que resulta fundamental definir una movilidad, que recibe el nombre de movilidad aparente (μ_a) que es la superposición de la movilidad del EOF (μ_{EOF}) con la movilidad propia del soluto:

$$\mu_a = \mu_{ef} + \mu_{EOF} \quad [1.9]$$

Por lo tanto, el EOF es un parámetro de suma importancia, dado que afecta directamente las movilidades de las especies, y por lo tanto los tiempos de migración y resolución de los compuestos.

La movilidad del EOF puede describirse a partir del modelo de la doble capa eléctrica, definiéndola en función de la constante dieléctrica o constante de permitividad de la solución (ϵ), el potencial zeta de las paredes del capilar (ζ) y la viscosidad de la solución (η) según la siguiente ecuación:

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \quad [1.10]$$

El potencial zeta está determinado principalmente por la carga superficial de la pared del capilar. En el caso de capilares de sílice, la misma depende del pH, debido a que éste determina la ionización de los grupos silanoles de la superficie, de manera que la magnitud del EOF variará con el mismo. A elevados valores de pH, los silanoles se encuentran mayormente desprotonados, de modo que el EOF es significativamente mayor que a valores de pH bajos donde los silanoles de la pared del capilar se encuentran protonados.

El potencial zeta también depende de la fuerza iónica y por consiguiente también afecta el EOF. Al aumentar la fuerza iónica del medio, la doble capa eléctrica sufre una compresión,

por lo tanto el potencial zeta disminuye. Es decir, el EOF es menor a medida que aumenta la fuerza iónica del BGE. Por último, pero no por esto menos importante se debe considerar también el efecto de la viscosidad del BGE, la cual es considerablemente afectada por la temperatura y por la cantidad de aditivos agregados, principalmente si estos últimos son poliméricos.

En el caso de las cromatografías, el flujo que se establece a través del lecho es hidrodinámico, es decir, impulsado por una diferencia de presión. El perfil de velocidades en este caso es parabólico, lo que produce un ensanchamiento longitudinal de las bandas cromatográficas debido a la diferencia de velocidades entre los distintos puntos de la sección transversal de los tubos. En contrapartida, la fuerza impulsora del EOF se encuentra uniformemente distribuida sobre las paredes del capilar, de forma tal que no hay caída de presión dentro del mismo y el flujo es casi uniforme a través del mismo. Esto proporciona un perfil de velocidades planos que es una de las principales características del EOF y el motivo por el cual se lo conoce comúnmente como “flujo pistón”. A diferencia de los flujos hidrodinámicos, prácticamente no produce dispersión de las bandas electroforéticas, lo que constituye la base de la elevada eficiencia de las técnicas electroseparativas. Esto puede observarse en la Figura 1.5.

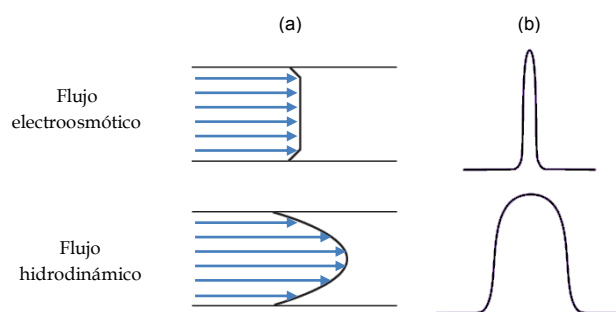


Figura 1.5. Flujos electroosmótico e hidrodinámico: (a) Perfiles de velocidades y (b) dispersión hipotética de un pico al ser detectado

1.3 MODOS DE OPERACIÓN EN ELECTROFORESIS CAPILAR

La CE es una técnica con una gran versatilidad, que deriva principalmente de sus numerosos modos de operación, en los cuales los mecanismos de separación son diferentes. Entre los modos más importantes y más aplicados se pueden mencionar: electroforesis capilar en zonas, electroforesis capilar en gel, cromatografía electrocinética micelar, electrocromatografía capilar, isoelectroenfoque capilar e isotacoforesis. A continuación se presenta una descripción de cada uno de ellos ⁴², haciendo especial hincapié en los modos de electroforesis capilar en zonas y electrocromatografía, dado que fueron los abordados en el presente trabajo.

1.3.1 Electroforesis capilar en zonas (CZE)

La CZE, también conocida como electroforesis capilar de tubo abierto o en solución libre, es el modo más sencillo y más comúnmente empleado en CE. En este modo de operación, las separaciones se basan en las diferencias de movilidades electroforéticas entre los solutos. Estas diferencias resultan en distintas velocidades de migración y por lo tanto, en la separación de los mismos. Dado que las movilidades electroforéticas dependen del tamaño del soluto y de su carga neta, es posible modificar ciertos parámetros para mejorar la separación. Una opción es modificar el radio hidrodinámico del soluto, y esto es posible mediante el agregado de un complejante, el cambio de la temperatura o el agregado de solventes orgánicos. Otra alternativa es cambiar la carga neta de la esfera hidratada del soluto, por ejemplo modificando el pH o por asociación con otras especies cargadas, ya sea por complejación, formación de aductos, pares iónicos, etc.

Por último, otro elemento fundamental para la separación es el EOF, y el mismo es dependiente de la carga superficial del capilar, de forma tal que modificando las paredes internas del mismo, se ve afectado el EOF y por lo tanto la velocidad de migración de los solutos.

Estas características le proporcionan a la CZE cierta complejidad, pero también una gran versatilidad que permite un sinnúmero de aplicaciones⁴³⁻⁴⁷.

Una situación particular de este modo de electroforesis capilar es aquella en la que el soluto interactúa reversiblemente con uno (o más) componentes del BGE a medida que va avanzando a través del medio. En este caso, el modo de CZE suele denominarse también electroforesis capilar de afinidad (ACE por sus siglas en inglés). Esta terminología es la que se encuentra con mayor frecuencia en publicaciones de proteómica, biología molecular o microbiología y en dichas áreas suele hacerse referencia a el/los componente/s con el/los que interactúa el soluto como ligando. No obstante, en el área de separaciones, el componente que interactúa cumple el rol de hacerlo selectivamente con varios solutos presentes en la muestra afectando por lo tanto su separación, motivo por el cual se le otorga el nombre de selector. Debido a esta interacción entre selector y soluto, el término cromatografía electrocinética (EKC) también se volvió común para este tipo de separaciones^{48,49}, en tanto que otros autores sugirieron denominarlas cromatografía electrocinética capilar (cEKC)⁵⁰.

Para evitar confusiones es conveniente emplear el acrónimo ACE cuando los selectores o ligandos cumplan todos los requisitos que se detallan a continuación:

- Se encuentren como aditivos en el BGE.
- No formen una fase separada.
- Modifiquen la migración efectiva del analito a través de interacciones de afinidad (esto incluye asociación, complejación, unión, inclusión, formación de pares iónicos)⁵¹.

1.3.2 Electroforesis capilar en gel (CGE)

El mecanismo de separación en CGE está dado por las diferencias de tamaños de los analitos debido a su migración diferencial a través de los poros de un gel con el que se rellena la columna. Los geles son potencialmente útiles para esta técnica porque permiten la separación basada en el efecto de tamiz molecular. Además actúan como medios anticonvectivos minimizando los efectos de dispersión, y otorga las ventajas de supresión del EOF y disminución sustancial de los efectos de adsorción a las paredes del capilar. Este modo de operación surgió como derivación de la conocida electroforesis en gel, que aun continua en uso para estudiar proteínas y otras biomoléculas. Hjertén⁵² y Hjertén y Zhu^{53,54}

realizaron los primeros ensayos, empleando capilares de sílice fundida de 150 μm de diámetro interno rellenos con poliacrilamida y agarosa, demostrando que las eficiencias de separación eran mucho mejores mediante CGE que en las placas de gel convencionales y también posibilitando su uso como técnica micropreparativa.

1.3.3 Isoelectroenfoque capilar (CIEF)

Este modo de operación, también conocido como enfoque isoeléctrico, es una herramienta importante en el análisis y purificación de mezclas de proteínas, dado que la separación se basa en “enfocar” o posicionar los analitos según sus puntos isoeléctricos (pI)⁵⁵. En 1985 Hjertén *et al.* trasladaron el modo de isoelectroenfoque, ya conocido en placas de gel, a capilares de vidrio aplicándolo a la separación de proteínas.

La implementación de este modo requiere la generación de un gradiente de pH a lo largo del capilar. Para lograrlo, el ánodo se sumerge en una solución ácida (anolito) y el cátodo en una solución alcalina (catolito). Al aplicar un voltaje entre los electrodos, los protones migrarán hacia el cátodo en tanto que los hidroxilos migrarán hacia el ánodo. Del mismo modo, los analitos cargados migrarán a través del medio hasta encontrarse en una región de pH en la que se vuelven eléctricamente neutros y por lo tanto dejan de migrar alcanzando una condición de estado estacionario. Una vez que ocurre el isoelectroenfoque, las zonas son desplazadas hasta la región de detección aplicando presión.

La resolución en CIEF se expresa en términos de diferencias de pI, y dado que el enfoque se realiza en toda la columna capilar, se obtienen picos muy estrechos permitiendo obtener diferencias muy bajas, de 0.01 unidades logarítmicas de pH⁵⁶ o menores⁵⁷.

1.3.4 Isotacoforesis capilar (CITP)

La CITP es un modo de operación cuya característica principal es que la separación se realiza en un medio discontinuo, es decir en un BGE cuya composición no es constante. La consecuencia directa es que tanto el campo eléctrico como las movilidades electroforéticas pueden cambiar durante la migración. Dicho medio se obtiene empleando dos electrolitos diferentes: uno líder o guía que debe tener movilidad elevada, superior a la de los componentes de la muestra que se deben separar y se coloca en un extremo; el otro

electrolito, conocido como electrolito terminal debe tener una movilidad baja, inferior a la de los componentes de la muestra. Entre ambos electrolitos se debe introducir la muestra, cuyos componentes se separarán en base a sus movilidades electroforéticas, alcanzando como resultado un estado estacionario compuesto de zonas consecutivas que es necesario para mantener la continuidad eléctrica a lo largo del sistema, dado que no hay un BGE continuo.

A diferencia de los modos antes mencionados de CE, en CITP el electroferograma, también conocido como isotacofograma, consiste en una serie de escalones en los que cada escalón representa una zona de analito, y la longitud es proporcional a la concentración.

1.3.5 Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)

Un desarrollo importante en CE fue la introducción de la MEKC en el año 1984 por Terabe y colaboradores⁵⁸⁻⁶⁰. En este modo de operación, el mecanismo de separación principal se basa en la partición de los solutos entre una fase micelar y una fase solución. Para formar la fase micelar, se debe adicionar un surfactante en una concentración igual o superior a la concentración micelar crítica. Dichas micelas son atraídas hacia uno de los electrodos al mismo tiempo que proporcionan a las moléculas neutras un medio para particionarse. Por este motivo es que a las micelas se las suele denominar como una pseudo fase estacionaria o como una fase estacionaria móvil. De aquí surge como consecuencia una de las principales ventajas de la MEKC que es que provee una alternativa para separar compuestos neutros que quedaban excluidos en las electroforesis convencionales. Jorgenson *et al.* demostraron el elevado potencial de la técnica mediante la resolución de compuestos marcados isotópicamente con una elevada eficiencia⁶¹.

En este modo de CE, la selectividad se obtiene por combinación de las relaciones carga/masa, la hidrofobicidad y las interacciones electrostáticas de los analitos con las micelas. El uso de diferentes surfactantes como de modificadores orgánicos puede conducir a cambios significativos en la resolución. Además, las micelas pueden reemplazarse por otros aditivos que reaccionen diferencialmente con los solutos a separar⁶².

1.3.6 Electro cromatografía capilar (CEC)

Este modo de electroforesis fue introducido por Pretorius y colaboradores en 1974, pero en la década del 90 recibió un interés renovado. Dicha revalorización se debe a que CEC se trata de una técnica separativa similar a CE que tiene lugar en una columna capilar que contiene una fase estacionaria donde se establecen los equilibrios de retención comúnmente conocidos en las cromatografías convencionales, combinando así las mejores características de CE y HPLC. En CEC el BGE está en contacto con la pared de sílice así como también con la superficie del relleno, por lo tanto el EOF es más inestable que en un tubo abierto pero aun así es más estable que si el flujo fuese impulsado hidrodinámicamente. Como consecuencia se puede decir que CEC ofrece una mayor eficiencia con respecto a HPLC, pero por otra parte involucra un mecanismo de separación adicional respecto de CE para mejorar la resolución.

En esencia, CEC acopla principalmente la elevada selectividad de HPLC con la elevada eficiencia separativa de CE. Además la CEC provee elevada resolución, menores tiempos de análisis, robustez y bajo consumo tanto de fase móvil como de muestra. También ofrece una amplia selectividad y facilita la separación tanto de compuestos neutros como cargados⁶³.

Es importante destacar que existen diferentes columnas que pueden utilizarse en CEC: empleando como fase estacionaria un monolito (CEC en columnas rellenas monolíticas), anclando la fase estacionaria a la pared del capilar (CEC en tubo abierto), o bien llenando la columna con partículas que soportan fase estacionaria como las de HPLC (CEC en columnas rellenas particuladas). Este último es el modo que se desarrolla con mayor frecuencia.

En relación al equipamiento para desarrollar CEC, es esencial que el instrumento cuente con un sistema para presurizar los viales. Esta presurización es necesaria dado que se emplea para evitar un importante factor negativo para las separaciones electro cromatográficas que es la formación de burbujas que pueden originarse por diversas causas: diferencias locales en la velocidad del EOF (por ejemplo, entre las secciones rellena y vacía del capilar)⁶⁴, diferencias locales en la intensidad del campo

eléctrico, liberación del gas ocluido entre los poros o formado electroquímicamente⁶⁵, por calentamiento⁶⁶ o en los tapones permeables que retienen el material particulado⁶⁷.

1.3.6.1 Columnas capilares para CEC

En CEC como en cualquier otro sistema cromatográfico, la columna (capilar) es el componente más importante, por lo tanto su preparación es una etapa crítica. Existen diversos tipos de columnas capilares que pueden clasificarse en: columnas de tubo abierto, columnas rellenas monolíticas o columnas rellenas particuladas⁶⁸. Las mismas se esquematizan en la Figura 1.6.

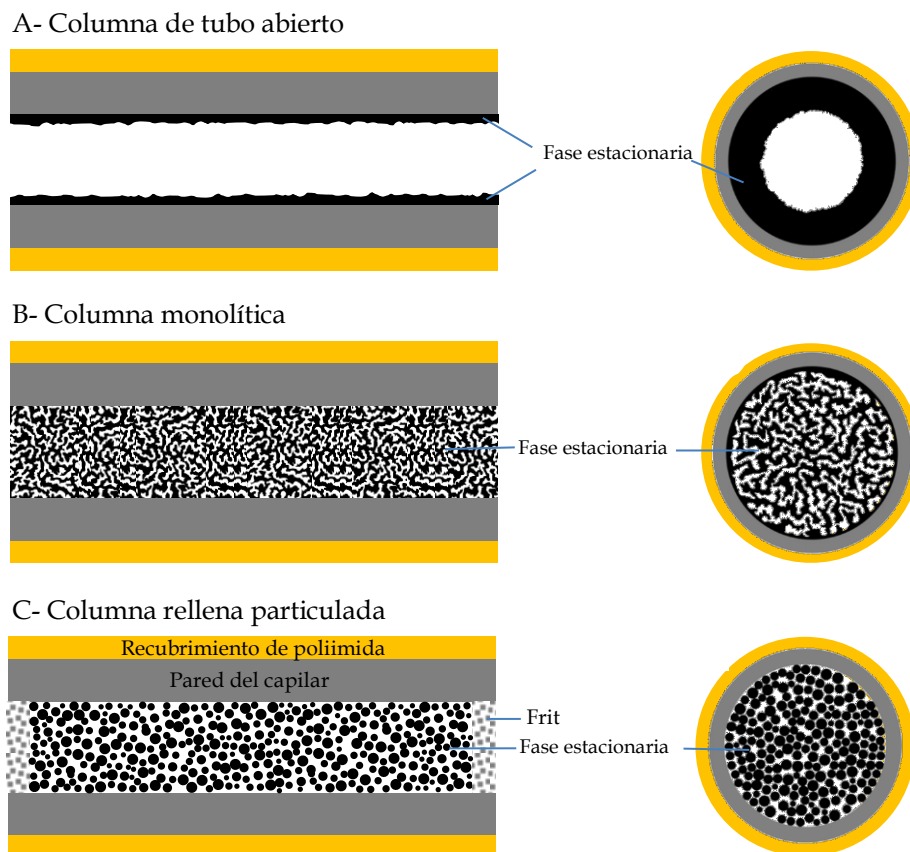


Figura 1.6. Diagrama esquemático de los tres tipos de columnas empleadas en electrocromatografía capilar. A la izquierda corte longitudinal, a la derecha corte transversal.

Columnas de tubo abierto

En este formato de columna, la fase estacionaria se deposita sobre la pared interna del capilar. Dicho recubrimiento debe ser estable para obtener separaciones cromatográficas eficientes y un flujo electroosmótico reproducible. Existen diversas formas de modificar la pared del capilar:

- Adsorción
- Unión covalente y/o entrecruzamiento
- Capas porosas
- Unión química luego de una etapa de pulido (etching)
- Sol-gel
- Impresión molecular

Las principales desventajas de este tipo de columnas son la baja capacidad y relación de fases debido a la poca área superficial del recubrimiento⁶³.

Columnas monolíticas

En este formato de columnas, se prepara una fase estacionaria monolítica dentro del capilar mediante polimerización in situ. En los últimos años, el desarrollo de columnas monolíticas ha ganado especial interés debido a la elevada estabilidad y a la simplicidad del método de preparación. Las columnas monolíticas pueden clasificarse en dos categorías, que dependen del material monolítico empleado que incluyen:

- Monolitos basados en sílice: Las columnas se preparan mediante el proceso sol-gel. El mismo se describe mediante dos etapas que son la hidrólisis del silicato seguida de una reacción de condensación. La estructura de un monolito de sílice está formada por un esqueleto interconectado con una distribución determinada de poros que puede controlarse variando las condiciones iniciales y la temperatura de reacción^{69,70}.
- Monolitos orgánicos: Están constituidos por polímeros basados en carbono. Las columnas se preparan en una única etapa mediante reacción de polimerización in

situ en el interior del tubo capilar. La mezcla de polimerización con la que se rellena el capilar está compuesta por una combinación de monómeros entre los que se encuentra un agente entrecruzante o cross-linker, una mezcla porogénica de disolventes y un iniciador^{71,72}. La mezcla se polimeriza en la mayoría de los casos por calentamiento en un baño termostático u horno, pero también es posible polimerizar por acción de iniciadores químicos o mediante radiación UV. La estructura de un monolito orgánico consiste en un conjunto interconectado de microglobululos de polímero separados por poros, que se caracteriza por presentar una distribución de tamaños bimodal, consistente en macroporos de tamaños del orden de los micrómetros, y mesoporos mucho más pequeños con tamaño del orden de los 10 nanómetros. Dicha estructura, puede controlarse variando la composición de la mezcla polimérica, así como también las condiciones de polimerización, o el tiempo de reacción⁷³.

Columnas rellenas particuladas

En este tipo de columnas los rellenos más utilizados son aquellos empleados típicamente para HPLC fase inversa: partículas de forma esférica con diámetros de 1,5 a 10 μm con fases estacionarias químicamente ligadas. Al igual que para las columnas de HPLC, el llenado de las mismas se realiza por metodologías que implican muchas veces ensayos de "prueba y error" hasta encontrar las condiciones adecuadas para obtener columnas de buena performance.

Las columnas particuladas empleadas hoy en día, son capilares de sílice fundida recubiertos externamente con poliimida y de diámetros internos de 100 μm o menores, siendo los diámetros de 50 μm y 75 μm los más comunes. Estos diámetros tan pequeños son necesarios para disipar el calor generado por la aplicación del campo eléctrico. En su mayoría, las columnas particuladas para CEC constan de dos segmentos: uno relleno y otro vacío o abierto; como consecuencia, cada segmento admite velocidades de EOF diferentes (Figura 1.7). En general, en el segmento vacío se fabrica una ventana óptica removiendo el recubrimiento de poliimida, con el fin de realizar la detección por medios espectroscópicos. El relleno se debe mantener en su lugar mediante tapones permeables

(**frit** o **frita**), aunque una alternativa consiste en emplear una columna con un frit en el extremo de entrada, pero sin frit a la salida (fritless). No obstante, este tipo de columnas puede emplearse solo si la movilidad electroforética del material de relleno es más grande que el EOF generado⁷⁴.

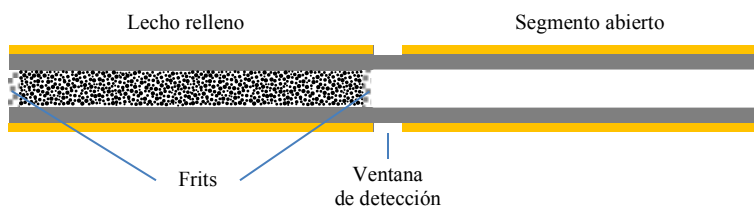


Figura 1.7 Representación esquemática de una columna particulada típica para electrocromatografía capilar.

En cuanto al llenado de capilares con partículas, se han reportado varios métodos. Los mismos se describirán posteriormente.

1.3.6.2 Fabricación de columnas capilares particuladas

Aunque se han reportado varios protocolos para fabricar columnas particuladas, este tema aún puede considerarse un “arte”. La performance y reproducibilidad de las columnas depende de su fabricación: columnas con un lecho de partículas no homogéneo o poco compacto, puede llevar a bajas eficiencias, resolución y también asimetría de picos. Una dificultad adicional, respecto de la preparación de columnas para HPLC, es que en este caso el frit para retener las partículas de relleno en el interior del tubo, también debe prepararse para cada columna (las de HPLC están disponibles comercialmente).

1.3.6.2.1 Preparación de frits

Una de las etapas principales en la construcción de columnas particuladas es la preparación de frits capaces de resistir el proceso de llenado, no provocar distorsiones en la separación y fundamentalmente retener las partículas⁷⁴. Los frits preparados por sinterizado térmico de partículas de sílice poseen mejores resultados en términos de resistencia mecánica y eficiencia. Si bien se han descrito diferentes procedimientos para

producirlos, el más utilizado consiste en el calentamiento radial ya sea mediante una resistencia eléctrica o mediante llama directa, de unos milímetros del tubo capilar relleno con un lecho de partículas de sílice, seguido de la remoción de las partículas de sílice no sinterizadas⁷⁵. Sin embargo, este método de obtención presenta desventajas⁷⁶:

- La dificultad de generar un frit confiable y reproducible (método poco robusto).
- La alteración de las características de la fase estacionaria (si hubiera) dentro del frit.
- Dificultad en el control de la permeabilidad del frit.
- Fragilidad en la pared del capilar en la cual se ubica el frit (por remoción del recubrimiento de poliimida que proporciona flexibilidad).
- Ensanchamiento de banda causada por la presencia del frit.
- Formación de burbujas y adsorción de analitos polares en el frit.

Para superar estos problemas, en el año 2014 S. Keunchkarian⁷⁷ y colaboradores desarrollaron un nuevo método por sinterizado térmico mediante transferencia axial de calor desde una mufla hacia las partículas de sílice contenidas en el extremo del capilar. El uso de una mufla provee un control más preciso de la temperatura y permite retirar el capilar inmediatamente, teniendo por lo tanto un mejor control en los tiempos de exposición y consecuentemente una mejora en la reproducibilidad. Además, el sinterizado de un lecho de partículas de sílice compactadas al final del tubo capilar, combinado con el uso de un aislante térmico externo de yeso provee protección del cubrimiento de poliimida y control en la penetración del calor, generando frits más cortos para menores tiempos de exposición, que producen una menor caída de presión, menor ensanchamiento de banda y disminuye la posibilidad de formación de burbujas.

1.3.6.2.2 Llenado con el material particulado

Se han empleado varios métodos para llenar capilares con material particulado en columnas para CEC. Estos métodos hacen uso de solventes o CO₂ supercrítico a alta presión sobre suspensiones de partículas, llenado electrocinético, por fuerza centrífuga y llenado por gravedad. Las columnas de CEC rellenas ya sea por métodos electrocinéticos o

por presión sobre suspensiones de las partículas, se encuentran disponibles comercialmente⁷⁸.

Llenado por gravedad

El llenado de capilares con partículas empleando la gravedad es un método relativamente simple de implementar. El tubo capilar con el frit terminal se llena con solvente y se conecta al dispositivo que se muestra en la Figura 1.8. El mismo consiste en una jeringa de 1 mL en la cual se coloca una suspensión de las partículas de fase estacionaria (10 mg mL^{-1}), cuya aguja se conecta con el capilar mediante un tramo de tubo de politetrafluoroetileno (PTFE).

Para asistir el proceso de llenado y evitar la evaporación del solvente de la suspensión, se coloca el émbolo de la jeringa y se aplica sobre el mismo una leve presión, asegurándolo en dicha posición. Luego de esto se permite que proceda la sedimentación durante unas 10hs⁷⁹.

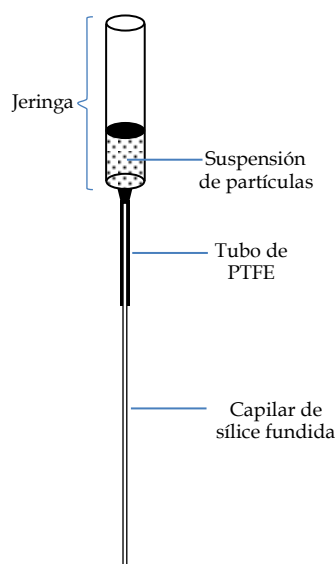


Figura 1.8. Diagrama esquemático del dispositivo empleado para rellenar capilares por gravedad.

Llenado por fuerza centrífuga

Para llenar con partículas las columnas capilares haciendo uso de fuerza centrífuga se

emplea un sistema al cual Fermier y Colon⁸⁰ denominaron “centripacker” y cuyo diagrama se presenta en la Figura 1.9.

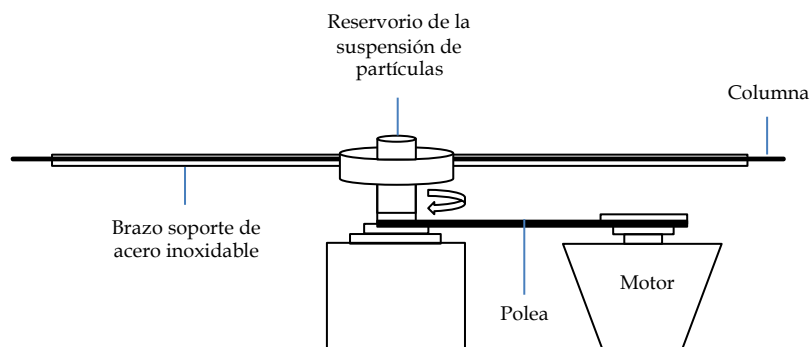


Figura 1.9. Diagrama esquemático del dispositivo empleado para rellenar capilares por fuerza centrífuga.

En el mismo, un reservorio de 1 mL se ubica en el centro del dispositivo. Dos brazos de acero inoxidable de 1 mm de diámetro interno se extienden desde el reservorio para proporcionar soporte a las columnas capilares. Dichos brazos se ajustan con ferrulas para asegurar el capilar dentro de los mismos y próximos al reservorio. Una vez que las columnas se encuentran aseguradas, una suspensión de las partículas de fase estacionaria ($20\text{-}50\text{ mg mL}^{-1}$) se coloca en el reservorio y se hace rotar el dispositivo durante 15 minutos a velocidades en el rango de 600 a 1500 rpm empleando un motor eléctrico de medio caballo de fuerza⁷⁸.

Llenado por presión con dióxido de carbono supercrítico

El llenado con CO_2 supercrítico se empleó originalmente para rellenar columnas para HPLC y cromatografía de fluidos supercríticos^{81,82} (SFC). Este método también se ha empleado para preparar columnas para CEC^{83,84}. En el mismo, un extremo del capilar se conecta a un reservorio de presión, el cual puede ser una columna de HPLC corta de 2 mm de diámetro interno conteniendo las partículas de fase estacionaria secas. El otro extremo del capilar se conecta a una unión con frit metálico que a su vez se conecta a un restrictor (pieza de capilar de sílice fundida con diámetro de $10\text{ }\mu\text{m}$) para mantener las presiones requeridas para las condiciones supercríticas. Durante el llenado, la columna capilar se mantiene inmersa en un baño de ultrasonido. La temperatura del baño se mantiene a 60-

70°C, es decir, por encima de la temperatura crítica del CO₂. Además se mantiene la presión constante por encima de la presión crítica del CO₂, típicamente a 3000-4500 psi. Para evitar alteraciones en el lecho relleno, la columna capilar se despresuriza en un período largo de tiempo (4-5 horas)⁷⁴.

Llenado mediante método electrocinético

El llenado mediante el método electrocinético involucra el uso de un flujo impulsado eléctricamente para transportar el material particulado. Las partículas son impulsadas hacia la columna capilar por el EOF, mientras que la columna y los reservorios se hacen vibrar. El dispositivo empleado se presenta en la Figura 1.10.

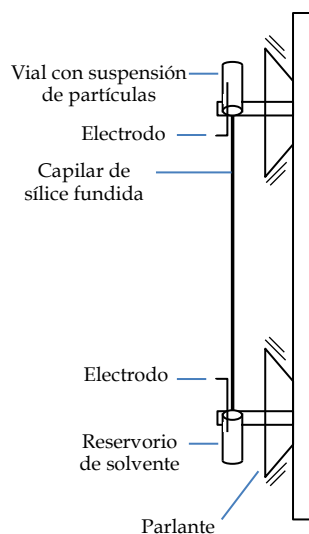


Figura 1.10. Diagrama esquemático del dispositivo empleado para el llenado electrocinético de capilares.

Una suspensión de las partículas en una mezcla de solventes conteniendo un electrolito se coloca en el reservorio superior manteniendo la posición vertical de arriba hacia abajo. El reservorio se cierra con una tapa con septum que se atraviesa con el capilar para que éste alcance la suspensión y también se coloca un electrodo que actuará como ánodo. El otro extremo de la columna, conteniendo el frit terminal, se inserta a través de la tapa con septum del reservorio inferior, el cual también contiene un electrodo que actúa como cátodo. Para favorecer el proceso de llenado, los reservorios se someten a vibración

mientras se aplica un voltaje constante de 30 kV^{74,78}.

Llenado por impulso con solvente a alta presión

El método empleado más comúnmente para llenar columnas capilares para CEC, es el método de llenado por aplicación de alta presión, usado típicamente en HPLC. En el mismo, el tubo capilar con el frit terminal se conecta a un reservorio metálico resistente a la presión, conectado a su vez a una bomba de alta presión para impulsar el solvente de empuje. La suspensión de partículas en un determinado solvente se prepara a una concentración aproximada de 50-100 mg mL⁻¹. La misma se agita por ultrasonido para favorecer la dispersión del material antes de ubicarla en el reservorio y se empuja dentro del capilar a presiones de unos 5000-10000 psi. Una vez llena la columna, se interrumpe el bombeo y para asegurar que no ocurran alteraciones en el lecho relleno al desconectar la columna del reservorio, la misma se deja escurrir por un periodo de tiempo. Esto significa que la columna no se desconecta hasta que el sistema alcanza la presión atmosférica^{74,78,85}.

1.4 ELECTROSEPARACIONES QUIRALES

Como se mencionó anteriormente, las electroseparaciones se logran como resultado de las diferencias en las movilidades de los componentes de las muestras bajo la acción de un campo eléctrico aplicado. Dado que los enantiómeros poseen la misma movilidad electroforética en solución libre, no es posible resolverlos en dichas condiciones. No obstante, es posible hacer uso de un **selector quiral** que es una molécula enantioméricamente pura que puede asociarse transitoriamente con preferencia a uno de los enantiómeros de la mezcla. La presencia de uno o más selectores quirales ya sea como parte de la fase estacionaria o como parte de la fase móvil puede proporcionar un reconocimiento estereoselectivo de ambos enantiómeros. De este modo, pueden observarse diferencias entre las movilidades aparentes de los enantiómeros, por ejemplo, como consecuencia de la formación de complejos diasterómicos transientes, y el tiempo que un analito pasa en el capilar de separación como tal depende de las propiedades termodinámicas (constantes de asociación) e hidrodinámicas (radio hidrodinámico de las especies involucradas) del sistema de separación así como también de algunas variables externas (concentración del selector quiral, pH, temperatura, etc).

1.4.1 Selectores quirales

El mecanismo de reconocimiento quiral, la naturaleza de las interacciones enantiómero-selector y consecuentemente, la enantioselectividad, varían enormemente entre los diferentes tipos de selectores quirales. Aunque la selección del selector en CE aún continúa basándose en un mecanismo de “prueba y error”, una gran parte del conocimiento existente en separaciones quirales realizadas por HPLC ha sido utilizado exitosamente en separaciones por CE.

Se puede encontrar una gran cantidad de trabajos donde se reportan métodos de separaciones quirales que emplean una amplia variedad de selectores quirales, entre los que se pueden mencionar surfactantes⁸⁶ (incluyendo ácidos biliares^{87,88}), antibióticos macrocíclicos^{89,90}, éteres corona^{91,92} y ciclodextrinas⁹³⁻⁹⁵.

Surfactantes quirales

Conforman un tipo de selectores quirales cargados. Habitualmente se los utilizan como aditivos en la solución de electrolito soporte, por encima de su concentración micelar crítica, es decir en el modo MEKC. Básicamente existen dos tipos de surfactantes quirales, los naturales y los sintéticos.

Los surfactantes naturales incluyen las saponinas que son glucósidos de esteroides o de triterpenoides, como la glicirricina cuya estructura se presenta en la Figura 1.11 (a), y las sales biliares, que son surfactantes producidos por el hígado y consisten en un núcleo esteroideo hidroxilado y una cadena lateral ionizable, como el taurodeoxicolato de sodio cuya estructura se presenta en la Figura 1.11 (b).

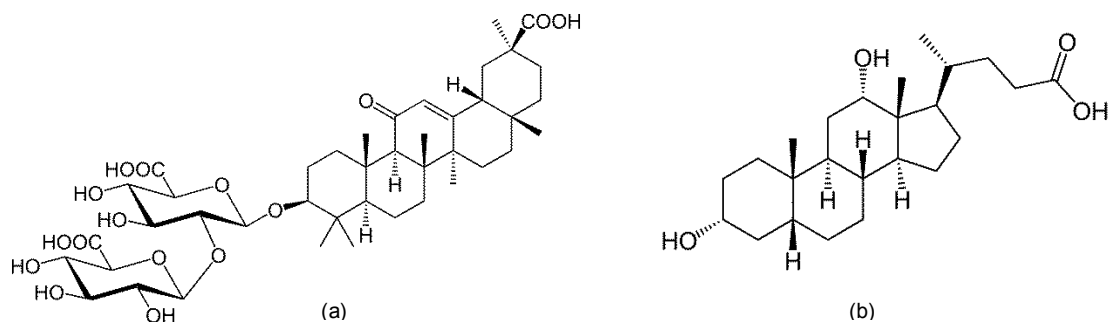


Figura 1.11. Estructuras químicas de surfactantes quirales naturales. (a) glicirricina y (b) taurodeoxicolato de sodio

Los surfactantes sintéticos, incluyen un grupo “cabeza” quiral que generalmente es un derivado de aminoácido, unido a una “cola” que consiste en una cadena alquílica larga. Un ejemplo típico de este tipo de surfactantes es el N-dodecanoilvalinato de sodio, cuya estructura química se presenta en la Figura 1.12.

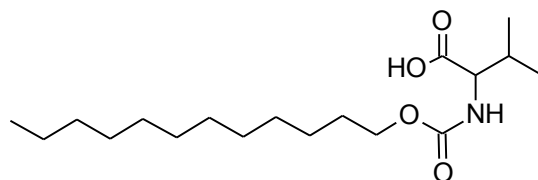


Figura 1.12. Estructura química del N-dodecanoilvalinato de sodio, un surfactante quiral sintético.

El principal problema con este tipo de selectores es que la enantioselectividad y la resolución son bajas, por lo que en general se emplean junto con otro selector quiral (generalmente éteres corona o ciclodextrinas).

Antibióticos macrocíclicos

Existen dos tipos de antibióticos que se han empleado en CE: las ansamicinas y los glicopéptidos oligofenólicos. Las ansamicinas empleadas son las rifamicinas y los glicopéptidos incluyen la vancomicina, ristocetina, y teicoplanina. Sus estructuras químicas se presentan en la Figura 1.13.

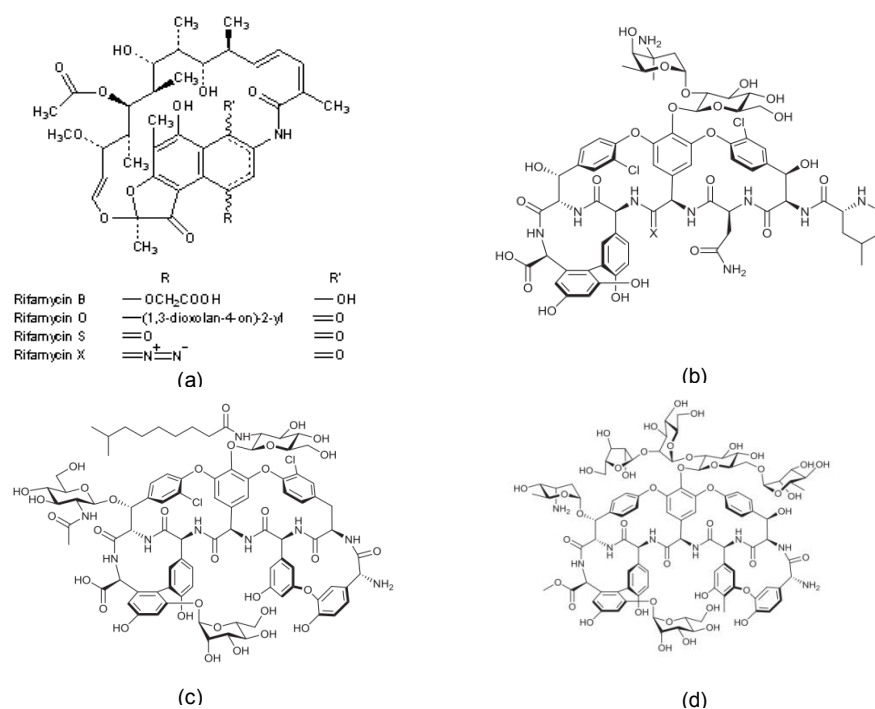


Figura 1.13. Estructuras químicas de antibióticos macrocíclicos típicos: (a) rifamicinas, (b) vancomicina, (c) ristocetina y (d) teicoplanina

Entre las características generales de estos selectores es importante destacar que, exceptuando las rifamicinas, poseen una absorptividad molar UV-Visible relativamente baja. Además, poseen múltiples estereocentros y grupos funcionales (grupos ácidos, básicos, derivados de hidratos de carbono, anillos aromáticos, etc) que permiten diversos tipos de interacciones con los analitos y son estables en los buffers acuosos empleados habitualmente en CE.

En cuanto a las características morfológicas que determinan la enantioselectividad de estos selectores, se destaca el hecho de que su estructura es la de una “canasta” con una apertura en forma de C que posee también sub-estructuras helicoidales.

Éteres Corona

Los éteres corona son poliéteres macrocíclicos que pueden formar complejos de coordinación estables con cationes inorgánicos pequeños o con alquilaminas catiónicas. Actualmente el éter corona mayormente empleado en separaciones quirales por CE es el ácido 18-corona-6-tetracarboxílico (Figura 1.14).

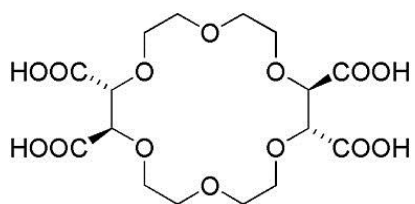


Figura 1.14. Estructura química de un éter corona, el ácido 18-corona-6-tetracarboxílico

Los 6 átomos de oxígeno dentro del anillo pueden interactuar con los grupos funcionales amonio o amino primarios mediante interacciones por puente de hidrógeno y/o dipolares. Dado que la inclusión no involucra interacciones entre los centros quirales del éter corona y los analitos, se cree que las interacciones de los grupos carboxílicos en el anillo del éter corona y los centros quirales, que están unidos directamente al grupo amino de la molécula huésped en el caso de las alquilaminas, juegan un rol muy importante en el reconocimiento quiral.

Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CD), también conocidas como dextrinas de Schardinger, cicloamilosas o ciclogucanos, son una serie de oligosacáridos producidos por la acción de la amilasa de *Bacillus macerans* sobre el almidón u otros compuestos relacionados y fueron descubiertas en 1891 por Villiers.

Las CDs son oligosacáridos cíclicos quirales que consisten en unidades de D-(+)-glucopiranosas unidas por enlaces α -(1,4')-glicosídicos, y cuyo nombre se designa mediante una letra griega según el número de unidades que conformen el anillo: α - para 6, β - para 7, γ - para 8 y así sucesivamente. Usualmente, a las α -, β - y γ -CD se las conoce como ciclohexaamilosa, cicloheptaamilosa y ciclooctaamilosa, respectivamente. Por un lado, no se sabe de la existencia de CDs con menos de 6 unidades de glucopiranosas, probablemente debido al impedimento estérico. Por el otro, la δ -CD también ha sido aislada y purificada, pero las siguientes en la serie ϵ -, ζ -, η -, y θ -CD, si bien han sido identificadas mediante cromatografía, se obtienen como mezclas con pequeñas cantidades de moléculas cíclicas ramificadas, o ramificadas de cadena abierta⁹⁶.

Estructuralmente, tal como se representa en la Figura 1.15, las ciclodextrinas tienen forma de cono truncado o toroide con una superficie exterior hidrofílica y una cavidad interna relativamente hidrófoba que puede alojar una gran variedad de compuestos, formando complejos de inclusión.

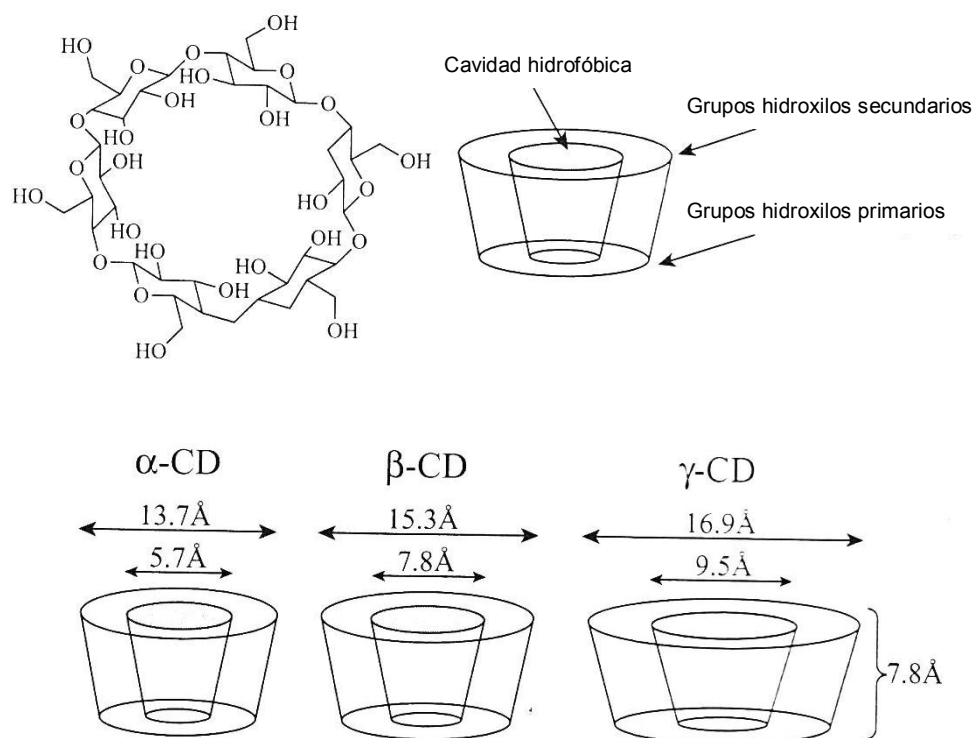


Figura 1.15. Estructura química y representación esquemática de las ciclodextrinas nativas más frecuentes.

Esta característica es la que hace que las ciclodextrinas nativas, de las cuales se presentan otras propiedades en la Tabla 1.2, como sus derivados sean los selectores quirales más empleados, tanto en HPLC y GC como en CE⁹⁷.

Tabla 1.2. Características físico-químicas de las ciclodextrinas nativas.

Características	α -CD	β -CD	γ -CD
Número de unidades de glucosa	6	7	8
Peso molecular (Da)	972	1135	1297
Diámetro externo (Å)	13.7	15.3	16.9
Diámetro interno (Å)	5.7	7.8	9.5
pK grupos hidroxilos	12.1-12.6	12.1-12.6	12.1-12.6
Solubilidad en agua (%p/v)	14.5	1.8	23.2
Molécula capaz de incluir	Benceno	Naftaleno	Antraceno

En relación a la solubilidad de las ciclodextrinas nativas, la misma resulta limitada en solución acuosa. Particularmente, la β -CD posee una solubilidad mucho menor, debida a la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares entre los grupos OH secundarios, que disminuyen la posibilidad de formar enlaces por puente de hidrógeno con las moléculas de agua circundantes. Como resultado, la entalpía de solución es poco favorable y la solubilidad en agua es baja. No obstante, una derivatización en la que se realice la sustitución de cualquier grupo hidroxilo que forme puentes de hidrógeno intramoleculares, aun con sustituyentes hidrofóbicos tales como metoxi o etoxi, resultará en un notable incremento en la solubilidad en agua. Por ejemplo, la solubilidad de la β -CD es de un 1,8 % p/v a temperatura ambiente, pero incrementa con el grado de metilación de la misma. La mayor solubilidad, superior al 50% p/v, se obtiene cuando dos tercios de los grupos hidroxilos (14 de 21) son metilados. Otros derivados de ciclodextrinas se obtienen por alquilación o hidroxialquilación de los grupos OH. La principal razón para el incremento de solubilidad en estos derivados se debe a que la manipulación química, frecuentemente transforma la ciclodextrina cristalina en mezclas amorfas de derivados isoméricos. Por ejemplo, la 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, cuya estructura química se presenta en la Figura 1.16, tiene una solubilidad en agua muy superior al 60 % p/v. El número de isómeros que se generan en una sustitución aleatoria es muy grande.

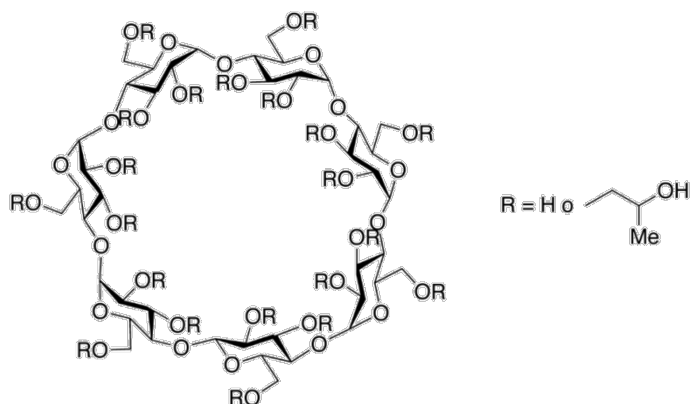


Figura 1.16. Estructura química de la 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina.

Estadísticamente, hay alrededor de 130000 derivados posibles, y la introducción del 2-hidroxipropilo también introduce un centro ópticamente activo haciendo que el número total de isómeros, es decir, geométricos y ópticos sea aún mucho mayor. No obstante, es importante destacar que tanto la alquilación como la hidroxialquilación de las ciclodextrinas no son totalmente aleatorias debido a las reactividades relativas de los grupos hidroxilos de la molécula⁹⁸.

1.5 OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES CONTINUAS

Para la optimización de cualquier variable experimental en un método analítico de separación, es necesario contar con un **criterio de calidad de la separación**. Dichos criterios pueden ser clasificados, por un lado, en aquellos que describen la separación de un sólo par de analitos, como la selectividad, resolución, etc.⁹⁹⁻¹⁰¹ y por otro en los que integran a muchos analitos dentro de una función de respuesta que puede depender de una o más variables operacionales¹⁰². Es importante destacar que en CE, a diferencia de las otras técnicas cromatográficas, es difícil medir y predecir la eficiencia de los picos (íntimamente relacionada con parámetros tales como la altura equivalente de plato teórico y la resolución), debido a la fuerte influencia de la naturaleza química de los componentes del BGE¹⁰³⁻¹⁰⁵. Las funciones de respuesta antes mencionadas, pueden resolverse ya sea de forma empírica, semiempírica o teórica; no obstante, es importante destacar que si la resolución es totalmente teórica, el número de experimentos a realizar se reduce al mínimo.

El primer factor de respuesta para cualificar las separaciones por CE fue propuesto por Giddings, quien sugirió el término de selectividad (p) para un par de analitos, definido como el cociente entre las diferencias de velocidades de los dos analitos (Δv) y la velocidad media entre ambos (\bar{v})¹⁰⁰:

$$p = \frac{\Delta v}{\bar{v}} \quad [1.11]$$

Tiempo después, Gebauer utilizó una expresión análoga empleando la movilidad del ion en vez de la velocidad, independizándose de esta forma, del campo eléctrico aplicado. Este parámetro fue utilizado para la predicción de la separación de iones por isotacoforesis:

$$p = \frac{\Delta \mu_{ef}}{\bar{\mu}_{ef}} \quad [1.12]$$

Donde p sigue siendo la selectividad y, $\Delta \mu_{ef}$ y $\bar{\mu}_{ef}$, son la diferencia de movilidades entre dos analitos y la movilidad promedio entre ambos, respectivamente. Si la ecuación [1.11] se multiplica y divide por el campo eléctrico, se alcanza la ecuación [1.12], por lo que puede concluirse que ambas son análogas y poseen las mismas limitaciones matemáticas, a saber:

- La imposibilidad de considerar analíticamente los cambios en el orden de migración de los iones, es decir cuando $\Delta\mu_e < 0$, la separación puede ser buena, pero $p < 0$ y por lo tanto la función no refleja una mejora en la separación.
- La expresión no contempla la separación entre los analitos respecto a un marcador de EOF, o de otros compuestos neutros que pueden formar parte de una muestra real. En esta situación el término p sería grande cuando la movilidad de uno de los analitos tendiera a cero, lo que implicaría una separación entre ambos, pero no de los compuestos que se desplazan con el EOF, hecho que impide la determinación de los mismos.

Otra alternativa fue propuesta considerando el análogo de la selectividad (α) para dos analitos en cromatografía, utilizando el cociente de movilidades en vez del factor de retención⁹⁹.

$$\alpha = \frac{\mu_{ef,1}}{\mu_{ef,2}} \quad [1.13]$$

Sin embargo, esta expresión falla nuevamente cuando una de las movilidades tiende a cero, pues la selectividad tiende a infinito, indicando que la separación es buena, pero siendo en realidad nula entre el compuesto y las sustancias neutras.

En 1994, Clark sugirió el uso de la movilidad diferencial (d)¹⁰⁶, que considera solamente la diferencia entre las movilidades de los dos analitos a separar:

$$d = \mu_{ef,2} - \mu_{ef,1} \quad [1.14]$$

Las limitaciones de esta expresión son, de manera similar, que no contempla la posible inversión en el orden de migración de los analitos y además la obtención de un máximo del parámetro cuando uno de los compuestos tiende a movilidad nula (ser neutro), que proporciona zonas de separación completa cuando en realidad no existe separación.

Hasta ese momento, sólo Jorgenson *et al.* señalaron la importancia de la presencia del EOF, adicionando al factor de respuesta un término denominador representando a la movilidad del flujo electroosmótico⁴¹.

$$p' = \frac{\mu_{ef,1} - \mu_{ef,2}}{\mu_{EOF} + \mu_{ef,2}} \quad [1.15]$$

Sin embargo, esta ecuación no resuelve el problema de la inversión del orden de migraciones, y presenta la desventaja de requerir el conocimiento de la dependencia del EOF en función de la variable a optimizar.

En el año 2016, Tascon *et al.*¹⁰⁷ diseñaron un nuevo parámetro de respuesta, denominado t' que supera las desventajas de los anteriores:

$$t' = [(\mu_{ef,2} - \mu_{ef,1})\mu_{ef,1}\mu_{ef,2}]^2 \quad [1.16]$$

La diferencia entre las movilidades $(\mu_{ef,2} - \mu_{ef,1})$, contempla la calidad de separación entre los dos compuestos, mientras que el producto individual de las movilidades es una medida de cuán grandes son estas y de cuán separados están de los compuestos neutros que migran con el EOF. Además, la potencia hace que los valores del parámetro t' sean siempre positivos.

Por lo tanto, si se dispone de un modelo teórico para calcular las movilidades de los analitos como una función de la variable a optimizar, es posible calcular el valor del parámetro t' en un dominio extenso. Luego, la maximización matemática de dicho parámetro puede emplearse para encontrar la condición óptima de la variable en estudio.

Este parámetro puede aplicarse a la separación de un único par de compuestos, pero también puede extenderse para optimizar la separación de muestras multicomponentes basándose en dos estrategias diferentes:

La primera estrategia consiste en componer la expresión de t' para todas las posibles combinaciones de compuestos tomados por pares con el fin de realizar un gráfico de ventanas, y aplicar un método de optimización similar al propuesto hace muchos años por Purnell *et al.*^{108,109}. En este tipo de gráficos, el par con la peor separación para cada valor de la variable en estudio, será aquel con menor valor de t' . Esto delimita dos áreas (inferior y superior), que generalmente suelen colorearse de blanco y negro, y generan zonas semejantes a “ventanas” que permiten una visualización completa del parámetro de separación en todo el dominio de la variable y facilitan la búsqueda de la condición óptima.

La segunda estrategia consiste en componer una **función escalar (T')** que cualifique simultáneamente la separación entre todos los analitos y entre estos y los compuestos neutros:

$$T' = [(\mu_{ef(1)}\mu_{ef(2)}\mu_{ef(3)} \dots \mu_{ef(n)}) (\mu_{ef(1)} - \mu_{ef(2)}) (\mu_{ef(1)} - \mu_{ef(3)}) \dots (\mu_{ef(1)} - \mu_{ef(n)}) \dots (\mu_{ef(n-1)} - \mu_{ef(n)})]^2 = \left[\left(\prod_{i=1}^n \mu_{ef(i)} \right) \left(\prod_{(i,j)(j<i)}^{n(n-1)} \Delta\mu_{ef(i,j)} \right) \right]^2 \quad [1.17]$$

Así, del mismo modo que con el parámetro t' , si se dispone de un modelo teórico para calcular las movilidades de los analitos como una función de la variable a optimizar, es posible calcular el valor del parámetro T' en un dominio extenso. Luego, la maximización matemática de dicho parámetro puede emplearse para encontrar la condición óptima de la variable analizada.

Si bien estos parámetros pueden ser empleados en forma general para la optimización de cualquier variable continua, en este trabajo de tesis serán empleados en particular para la encontrar la **concentración de selector quirál óptima** para la separación química y enantiomérica de una mezcla compleja fármacos quirales.

1.6 ANALITOS

Como se describió anteriormente, las aplicaciones más numerosas de las técnicas quirales se encuentran en la industria farmacéutica. Dado que actualmente una gran cantidad de principios activos farmacéuticos son quirales, se seleccionaron compuestos de esta categoría como analitos para el estudio.

1.6.1 Betabloqueantes

Los betabloqueantes, comúnmente conocidos por su nombre en inglés “ β -blockers” son fármacos utilizados para el tratamiento de diversas patologías cardíacas tales como hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca, angina de pecho, arritmias o miocardiopatías hipertróficas, entre otras¹¹⁰⁻¹¹³.

La regulación del sistema nervioso se realiza por medio de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). Para ejercer su acción, estas sustancias se unen a unos receptores, llamados receptores adrenérgicos, que se encuentran ubicados en la superficie de las células. Existen tres tipos de receptores beta, y se designan con los nombres de receptores β_1 , β_2 y β_3 adrenérgicos según el tipo de célula en la que se encuentren. Los receptores β_1 -adrenérgicos se ubican principalmente en el corazón y los riñones; los β_2 en pulmones, tracto gastrointestinal, hígado, útero, músculo liso vascular y músculo esquelético. Por último, los receptores β_3 -adrenérgicos se encuentran en las células adiposas.

Los β -bloqueantes funcionan bloqueando los receptores beta adrenérgicos, de tal forma que impide la unión de la catecolamina y evita su estimulación. Según el tipo de receptores beta adrenérgicos que bloqueen, pueden clasificarse en β -bloqueantes selectivos si bloquean un único tipo de receptor, o bien en β -bloqueantes no selectivos si bloquean más de un tipo de receptor (generalmente β_1 y β_2).

En este trabajo de tesis se emplearán β -bloqueantes no selectivos que actúan sobre receptores andrenérgicos β_1 y β_2 ^{114,115}. Los seleccionados fueron: pindolol, propranolol y oxprenolol. Las estructuras químicas de los mismos, se presentan en la Figura 1.17, indicando con un asterisco (*) el centro quiral.

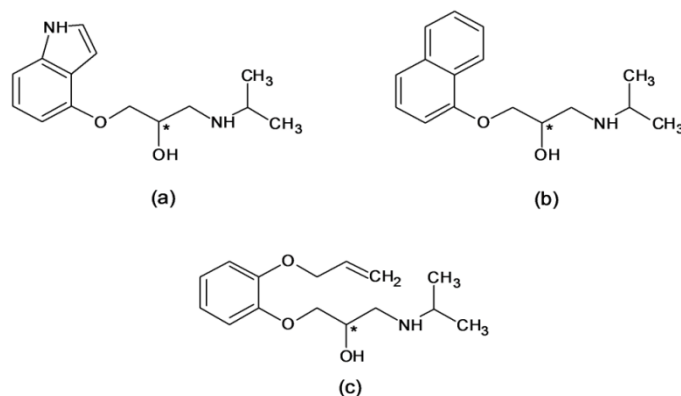


Figura 1.17 Estructura química de los β -bloqueantes estudiados: a) pindolol, b) propranolol, c) oxprenolol. El asterisco (*) indica el centro quiral.

1.6.2 Anticolinérgicos

Los fármacos anticolinérgicos son un tipo de medicamentos antiespasmódicos que atenúan los espasmos o contracciones musculares. Por este motivo, los mismos han sido utilizados en medicina para el tratamiento de diversas condiciones: diarrea, asma, incontinencia urinaria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), insomnio, cinetosis, síntomas de la enfermedad de Parkinson y desórdenes psiquiátricos, entre otros.

Estos fármacos actúan bloqueando selectivamente la unión del neurotransmisor acetilcolina con su receptor en las células neuronales^{113,116}, y se clasifican de acuerdo al receptor sobre el que actúan, en agentes antimuscarínicos o antinicotínicos, aunque la mayoría de los anticolinérgicos son antimuscarínicos, es decir, que actúan sobre receptores localizados mayormente en el músculo liso de algunos órganos y glándulas¹¹⁷. Asimismo, los anticolinérgicos pueden clasificarse según su estructura química en aquellos con estructura de amina terciaria o bien con estructura de amonio cuaternario. Ejemplos de anticolinérgicos de estructura terciaria son atropina, escopolamina, amikelina y dicicloverina; mientras que ejemplos de anticolinérgicos de estructura cuaternaria son bromuro de clidinio, bromuro de valetamato, bromuro de butilescopolamina y metilbromuro de homatropina.

Este último fue seleccionado como analito modelo en el presente trabajo de tesis, y su estructura química, indicando con un asterisco (*) el centro quiral se presenta en la Figura 1.18.

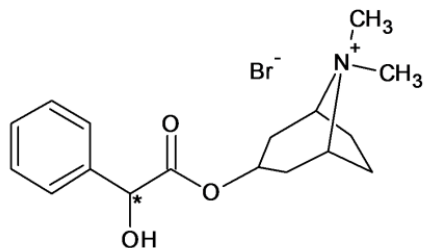


Figura 1.18. Estructura química del metilbromuro de homatropina. El asterisco (*) indica el centro quiral.

1.7 REFERENCIAS

- (1) Guijaro, A.; Yus, M. *The Origin of Chirality in the Molecules of Life. A Revision from Awareness to the Current Theory and Perspectives of this Unsolved Problem*, RSC Publis.; Cambridge, 2008.
- (2) Barron, L. D. *Molecular Light Scattering and Optical Activity*, 2nd ed.; Cambridge University Press: Cambridge, 2004.
- (3) Mason, S. F. *Chirality in Natural and Applied Science*, Blackwell.; Lough, W. J., Wainer, I. W., Eds.; Oxford, 2002.
- (4) Arago, D. F. *Mem. la Cl. des Sci. Math. Phys. l'Institut Imp. Fr.* **1811**, 1, 93-144.
- (5) Herschel, J. F. W. *Trans. Cambridge Philos. Soc.* **1822**, 1, 43-52.
- (6) Fresnel, A. *Rapport sur le microscope achromatique de M. Selligue*, J. Tastu.; 1824.
- (7) Biot, J. B. *Bull. Soc. Philomath.* **1815**, 190-192.
- (8) Biot, J. B. *Sur l'application des propriétés optiques à l'analyse quantitative des mélanges liquides ou solides, dans lesquels le sucre de canne cristallisable est associé à des sucres incristallisables.*, Bachelier.; 1843.
- (9) Pasteur, L. *Ann. Chim. Phys.* **1848**, 24, 442-459.
- (10) van't Hoff, J. H. *Arch Neerl. Sci Exact Natur* **1874**, 9, 445-454.
- (11) van't Hoff, J. H. *La chimie dans l'espace*, Bazendijk.; 1875.
- (12) Le Bel, J. A. *Bull. Soc. Chim. Fr* **1874**, 22, 337-347.
- (13) Gal, J. *Top Curr Chem* **2013**, 340, 1-20.
- (14) Morrison, R. T.; Boyd, R. N. *Química Orgánica 5ta edición*, Addison We.; 1998.
- (15) Roger Crossley. *Tetrahedron* **1992**, 48 (38), 8155-8178.
- (16) Martín Avalos, Reyes Babiano, Pedro Cintas, José L Jiménez, J. C. P. *Tetrahedron: Asymmetry* **2000**, 11 (14), 2845-2874.
- (17) Piutti, A. *Comptes Rendus l'Academie des Sci.* **1886**, 103, 134-138.
- (18) Cushny Arthur R. *J. Physiol.* **1904**, 31 (3-4), 188-203.
- (19) Crossley, R. *Chirality and the Biological Activity of Drugs*; Press, C., Ed.; Florida, 1995.
- (20) Ariëns, E. J.; Soudijn, W.; Timmermans, P. *Stereochemistry and biological activity of drugs*; Oxford, 1983.
- (21) Covington, C. L.; Raghavan, V.; Smuts, J. P.; Armstrong, D. W.; Polavarapu, P. L. *Chirality* **2017**, 29 (11), 670-676.

- (22) Chi, Y.; Wu, Z.; Zhong, Y.; Dong, S. *Biomed. Chromatogr.* **2017**, *31* (8).
- (23) Fedick, P. W.; Bain, R. M.; Bain, K.; Cooks, R. G. *J. Chem. Educ.* **2017**, *94* (9), 1329–1333.
- (24) Wang, L.; Wang, Y.; Chai, Y.; Kang, Y.; Sun, C.; Zeng, S. *J. Mass Spectrom.* **2017**, *52* (7), 411–416.
- (25) Michalska, K.; Gruba, E.; Mizera, M.; Lewandowska, K.; Bednarek, E.; Bocian, W.; Cielecka-Piontek, J. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, *183*, 116–122.
- (26) Plainchont, B.; Pitoux, D.; Cyrille, M.; Giraud, N. *Anal. Chem.* **2018**.
- (27) Fumagalli, L.; Pucciarini, L.; Regazzoni, L.; Gilardoni, E.; Carini, M.; Vistoli, G.; Aldini, G.; Sardella, R. *J. Sep. Sci.* **2018**, No. November, 1–7.
- (28) Tao, Y.; Zheng, Z.; Yu, Y.; Xu, J.; Liu, X.; Wu, X.; Dong, F.; Zheng, Y. *Food Chem.* **2018**, *241* (August 2017), 32–39.
- (29) Bhatt, N. M.; Chavada, V. D.; Sanyal, M.; Shrivastav, P. S. *Chirality* **2017**, *29* (2), 80–88.
- (30) Menestrina, F.; Osorio Grisales, J.; Castells, C. B. *Microchem. J.* **2016**, *128*, 267–273.
- (31) Álvarez, G.; Montero, L.; Llorens, L.; Castro-Puyana, M.; Cifuentes, A. *Electrophoresis* **2017**, 136–159.
- (32) Hjertén, S. *Chromatogr. Rev.* **1967**, *9*, 122–219.
- (33) Hjertén, S. *Ark. Kemi* **1958**, *13*, 151–152.
- (34) Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, T. P. E. M. *J. Chromatogr. A* **1979**, *169*, 11–20.
- (35) Mikkers, F. E. P.; Everaerts, F. M.; Verheggen, T. P. E. M. *J. Chromatogr. A* **1979**, *169*, 1–10.
- (36) Virtanen, R.; Kivalo, P. *Suom. Kemistil.* **1969**, *42* (4), 182–188.
- (37) Virtanen, R.; Nanto, V. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1971**, *27*.
- (38) Virtanen, R. *Acta Polytech. Scand. Technol. Ser.* **1974**, *123*, 1–67.
- (39) Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. A. *Anal. Chem.* **1981**, *53* (8), 1298–1302.
- (40) Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. A. *J. Chromatogr. A* **1981**, *218* (C), 209–216.
- (41) Jorgenson, J. W.; Lukacs, K. D. *Anal. Chem.* **1981**, *53* (1), 1298–1302.
- (42) Li, S. F. Y. *J. Chromatogr. Libr.* **1992**, *52*, 4–12.
- (43) Chandra, D.; Tyagy, S.; Deka, R.; Chauhan, R.; Singh, J.; Deth, T.; Prasad Pati, H.;

- Saxena, R. *J. Appl. Hematol.* **2017**, 8 (4), 135–139.
- (44) Pont, L.; Benavente, F.; Sanz-nebot, V. *Electrophoresis* **2015**, 36, 1265–1273.
- (45) Fukushi, K.; Fujita, Y.; Nonogaki, J.; Tsujimoto, J.; Hattori, T.; Inui, H.; Beškoski, V. P.; Hotta, H.; Hayashi, M.; Nakano, T. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, 410 (6), 1825–1831.
- (46) Gao, R.; Wang, L.; Yang, Y.; Ni, J.; Zhao, L.; Dong, S.; Guo, M. *Biomed. Chromatogr.* **2015**, 29 (3), 402–409.
- (47) Bettonville, V.; Nicol, J. T. J.; Furst, T.; Thelen, N.; Piel, G.; Thiry, M.; Fillet, M.; Jacobs, N.; Servais, A. C. *Talanta* **2017**, 175, 325–330.
- (48) Tsioupi, D. A.; Stefan-van Staden, R.-I.; Kapnissi, C. P. *Electrophoresis* **2013**, 34, 178–204.
- (49) Scriba, G. K. E. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, 55 (4), 688–701.
- (50) Chankvetadze, B. **2007**, 1168, 45–70.
- (51) Dubský, P.; Müllerová, L.; Dvořák, M.; Gaš, B. *J. Chromatogr. A* **2015**, 1384, 142–146.
- (52) Hjertén, S. *J. Chromatogr. A* **1983**, 270, 1–6.
- (53) Hjertén, S.; Zhu, M. De. *J. Chromatogr. A* **1985**, 327 (C), 157–164.
- (54) Hjertén, S.; Zhu, M. De. *Protides Biol. Fluids* **1985**, 33, 537–540.
- (55) Hjertén, S.; Zhu, M. de. *J. Chromatogr. A* **1985**, 346, 265–270.
- (56) Shen, Y.; Smith, R. D. *J. Microcolumn Sep.* **2000**, 12 (3), 135–141.
- (57) Chang, W. W. P.; Bomberger, D. C.; Schneider, L. V. *Am. Biotechnol. Lab.* **2005**, 23, 2–5.
- (58) Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T. *Anal. Chem.* **1984**, 56 (1), 111–113.
- (59) Terabe, S.; Otsuka, K.; Ando, T. *Anal. Chem.* **1989**, 61 (3), 251–260.
- (60) Otsuka, K.; Terabe, S. *J. Microcolumn Sep.* **1989**, 1 (3), 150–154.
- (61) Bushey, M. M.; Jorgenson, J. W. *J. Microcolumn Sep.* **1989**, 1 (3), 125–130.
- (62) Terabe, S.; Utsumi, H.; Otsuka, K.; Ando, T.; Inomata, T.; Kuze, S.; Hanaoka, Y. *J. High Resolut. Chromatogr.* **1986**, 9 (11), 666–670.
- (63) Kapnissi, C. P.; Zhu, X.; Warner, I. M. *Electrophoresis* **2003**, 23, 3917–3934.
- (64) Rathore, A. S.; Horváth, C. *Anal. Chem.* **1998**, 70 (15), 3271–3274.
- (65) Carney, R. A.; Robson, M. M.; Bartle, K. D.; Myers, P. *HRC J. High Resolut. Chromatogr.* **1999**, 22 (1), 29–32.
- (66) Knox, J. H. *Chromatographia* **1988**, 26 (1), 329–337.

- (67) Rebscher, H.; Pyell, U. *Chromatographia* **1994**, 38 (11-12), 737-743.
- (68) Declerck, S.; Vander Heyden, Y.; Mangelings, D. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 130, 81-99.
- (69) Kato, M.; Sakai-kato, K.; Matsumoto, N.; Toyooka, T. **2002**, 74 (8), 1915-1921.
- (70) Allen, D.; El Rassi, Z. *Electrophoresis* **2003**, 24 (22-23), 3962-3976.
- (71) Liao, J. L.; Chen, N.; Ericson, C.; Hjertén, S. *Anal. Chem.* **1996**, 68 (19), 3468-3472.
- (72) Palm, A.; Novotny, M. V. *Anal. Chem.* **1997**, 69 (22), 4499-4507.
- (73) Svec, F.; Tennikova, T. B.; Deyl, Z. *Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications*, Elsevier.; Amsterdam, 2003.
- (74) Colón, L. A.; Maloney, T. D.; Fermier, A. M. *J. Chromatogr. A* **2000**, 887 (1-2), 43-53.
- (75) Smith, N.; Evans, M. *Chromatographia* **1994**, 38 (9/10), 649-657.
- (76) Chen, J.; Dulay, M. T.; Zare, R. N.; Svec, F.; Peters, E. **2000**, 72 (6), 1224-1227.
- (77) Keunchkarian, S.; Lebed, P. J.; Sliz, B. B.; Castells, C. B.; Gagliardi, L. G. *Anal. Chim. Acta* **2014**, 820, 168-175.
- (78) Colón, L. A.; Maloney, T. D.; Fermier, A. M. In *Capillary Electrochromatography*; Deyl, Z., Svec, F., Eds.; Amsterdam, 2001; pp 111-164.
- (79) Reynolds, K. J.; Maloney, T. D.; Fermier, A. M.; Colón, L. A. *Analyst* **1998**, 123, 1493-1495.
- (80) Fermier, A. M.; Colón, L. A. *J. Microcolumn Sep.* **1998**, 10 (5), 439-447.
- (81) Malik, A.; Li, W. B.; Lee, M. L. *J. Microcolumn Sep.* **1993**, 5 (4), 361-369.
- (82) Tong, D.; Bartle, K. D.; Clifford, A. A. *J. Microcolumn Sep.* **1994**, 6, 249-255.
- (83) Robson, M. M.; Roulin, S.; Shariff, S. M.; Raynor, M. W.; Bartle, K. D.; Clifford, A. A.; Myers, P.; Euerby, M. R.; Johnson, C. M. *Chromatographia* **1996**, 43 (5-6), 313-321.
- (84) Tang, Q.; Xin, B.; Lee, M. L. *J. Chromatogr. A* **1999**, 837, 35-50.
- (85) Colon, L. A.; Burgos, G.; Maloney, T. D.; Cintron, J. M.; Rodriguez, R. L. *Electrophoresis* **2000**, 21 (18), 3965-3993.
- (86) Wang, X.; Hou, J.; Jann, M.; Yi, Y.; Shamsi, S. A. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1271, 207-216.
- (87) Bielejewska, A.; Duszczak, K.; Kwaterczak, A.; Sybilska, D. *J. Chromatogr. A* **2002**, 977, 225-237.
- (88) Iuliano, A.; Félix, G. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1031, 187-195.
- (89) Jang, M. G.; Jang, M. D.; Park, J. H. *J. Chromatogr. A* **2017**, 1508, 176-181.
- (90) Aboul-Enein, H. Y.; Ali, I. *Chromatographia* **2000**, 52 (11), 679-691.

- (91) Lee, W.; La, S.; Choi, Y.; Kim, K. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, 24 (8), 1232-1234.
- (92) Adhikari, S.; Lee, W. *J. Pharm. Investig.* **2017**, 0 (0), 0.
- (93) Gogolashvili, A.; Tatumashvili, E.; Chankvetadze, L.; Sohajda, T.; Szeman, J.; Salgado, A.; Chankvetadze, B. *Electrophoresis* **2017**, 38, 1851-1859.
- (94) Saz, J. M.; Marina, M. L. *J. Chromatogr. A* **2016**, 1467, 79-94.
- (95) Szabó, Z.; Tóth, G.; Völgyi, G.; Komjáti, B.; Hancu, G.; Szente, L.; Sohajda, T.; Béni, S.; Muntean, D.; Noszál, B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, 117, 398-404.
- (96) Bender, M. L.; Komiyama, M. *Cyclodextrin Chemistry*; Springer-Verlag: Berlin, 1978.
- (97) Khaledi, M. G. *High Performance Capillary Electrophoresis: Theory, Techniques, and Applications*, John Wiley.; Winefordner, J. D., Ed.; New York, 1956.
- (98) Loftsson, T.; Brewster, M. E. *J. Pharm. Sci.* **1996**, 85 (10), 1017-1025.
- (99) Rawjee, Y. Y.; Staerk, D. U.; Vigh, G. *J. Chromatogr. A* **1993**, 635 (2), 291-306.
- (100) Giddings, J. C. *Sep. Sci.* **1969**, 4 (3), 181-189.
- (101) Gebauer, P.; Bocek, P. *J. Chromatogr.* **1985**, 320, 49-65.
- (102) Siouffi, A. M.; Phan-Tan-Luu, R. *J. Chromatogr. A* **2000**, 892 (1), 75-106.
- (103) Reijenga, J. C.; Kenndler, E. *J. Chromatogr. A* **1994**, 659 (2), 403-415.
- (104) Šustáček, V.; Foret, F.; Boček, P. *J. Chromatogr.* **1991**, 545, 239-248.
- (105) Xu, X.; Kok, W. T.; Poppe, H. *J. Chromatogr. A* **1996**, 742, 211-227.
- (106) Clark, B. K.; Nickles, C. L.; Morton, K. C.; Kovac, J.; Sepaniak, M. J. *J. Microcolumn Sep.* **1994**, 6, 503-513.
- (107) Tascon, M.; Benavente, F.; Castells, C. B.; Gagliardi, L. G. *J. Chromatogr. A* **2016**, 1460, 190-196.
- (108) Laub, R. J.; Purnell, J. H. *J. Chromatogr. A* **1978**, 161, 49-57.
- (109) Laub, R. J.; Pelter, A.; Purnell, J. H. *Anal. Chem.* **1979**, 51 (11), 1878-1880.
- (110) Wiysonge, C. S.; Bradley, H. A.; Volmink, J.; Mayosi, B. M.; Opie, L. H. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2012**, 11 (1).
- (111) Freemantle, N.; Cleland, J.; Young, P.; Mason, J.; Harrison, J. *BMJ* **1999**, 318 (7200), 1730-1737.
- (112) Yusuf, S.; Peto, R.; Lewis, J.; Collins, R.; Sleight, P. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **1985**, 27 (5), 335-371.
- (113) Mendoza Patiño, N. *Farmacología Médica/Medical Pharmacology*; Ed. Médica Panamericana: Mexico D.F., 2008.

- (114) Poole Arcangelo, V.; Peterson, A. M. *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2006.
- (115) Frishman, W. H.; Cheng-Lai, A.; Nawarskas, J. *Current Cardiovascular Drugs*; Current medicine: Philadelphia, 2005.
- (116) Andrejus, K.; Burckhalter, J. H. *Compendio esencial de química farmacéutica*, Ed. Revert.; Barcelona, 1983.
- (117) Mirakhur, R. K. *Br. J. Anaesth.* **1979**, 51 (7), 671-679.

Capítulo 2
Objetivos

2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo de tesis fue el desarrollo de herramientas para estudiar sistemas de asociación entre analitos y selectores quirales para su posterior utilización en la optimización de electroseparaciones enantioméricas

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar un modelo teórico para estudiar el equilibrio de asociación analito-selector quiral involucrado en la separación mediante electroforesis capilar. Emplear dicho modelo para obtener constantes termodinámicas de asociación.
- Proponer una metodología que permita elucidar las distintas contribuciones al mecanismo de separación.
- Desarrollar un método para optimizar la concentración de selector quiral para la separación simultánea de una mezcla compleja de analitos seleccionados como modelo.
- Elaborar columnas capilares particuladas de alta eficiencia. Estudiar diversas metodologías de llenado y desarrollar métodos para la fabricación de frits terminales.

Capítulo 3
Experimental

3.1 REACTIVOS Y MATERIALES

Solventes

El agua desionizada se obtuvo mediante purificación de agua destilada en un sistema Milli-Q® Simplicity 198 (EMD Millipore Corporation, Massachusetts, Estados Unidos) o Barnstead MicroPure® (Thermo Scientific, California, Estados Unidos).

El metanol empleado tanto para la preparación de soluciones como para la calibración de la curva de viscosidades fue de grado HPLC (Sintorgan, Buenos Aires, Argentina).

También se empleó acetona 98% (Biopack, Argentina), isopropanol grado HPLC (Sintorgan, Buenos Aires, Argentina), alcohol etílico absoluto 99.5% pro-Análisis (Cicarelli, San Lorenzo, Argentina) y dimetilsulfóxido para síntesis (Merck, Darmstadt, Alemania).

Soluciones para la activación y acondicionamiento de los capilares

Los reactivos utilizados para la preparación de soluciones de activación y acondicionamiento de capilares fueron hidróxido de sodio de grado analítico obtenido de Mallinckrodt (Saint Louis, Estados Unidos) con el cual se prepararon una solución 1 M y otra 0.1 M; y también ácido clorhídrico 36.5% p/p proporcionado por Anedra (San Fernando, Argentina) con el cual se preparó una solución 0.1 M.

Soluciones de electrolito soporte

Los reactivos utilizados tanto como componentes del BGE, como para preparar los buffers de calibración fueron de grado analítico o de calidad superior.

Selector quiral

La 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (peso molecular promedio 1460 Da) se obtuvo de Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Alemania). Dicho selector se añade al BGE por disolución en la solución buffer de la masa adecuada para obtener una concentración determinada.

Marcador de flujo electroosmótico

Como marcador de EOF se empleó alcohol bencílico para análisis 99.5%. El mismo se obtuvo de Biopack (Zárate, Argentina).

Analitos

Los analitos oxprenolol, pindolol y propanolol en sus formas racémicas fueron adquiridos en Sigma (Steinheim, Alemania), mientras que el metilbromuro de homatropina también en su forma racémica fue suministrado por USPC Inc (Maryland, Estados Unidos).

Filtros de membrana

Todas las soluciones se filtraron a través de filtros de membrana de Nylon de 0.22 μm obtenidos de Osmonics Inc. (Westborough, Massachusetts, Estados Unidos), y se desgasificaron por inmersión en baño de ultrasonido antes de ser utilizadas.

Capilares

Los capilares de sílice fundida de 50 μm y 100 μm de diámetro interno fueron suministrados por Polymicro Technologies (Phoenix, Arizona, Estados Unidos). Estos últimos, utilizados para la fabricación de columnas rellenas, fueron cortados en tramos de entre 12 y 15 cm de longitud, mientras que los primeros fueron cortados en segmentos de 60 cm, excepto para medidas de viscosidades en los que era imprescindible una longitud mayor y fue cortado en tramos de 100 cm.

Previo a su uso, los capilares de 60 cm de longitud se activaron haciéndoles fluir por aplicación de una presión de 1000 mbar: NaOH 1 M (20 minutos), agua desionizada (10 minutos), HCl 0.1 M (5 minutos), agua desionizada (5 minutos) y el BGE correspondiente (20 minutos). Entre análisis, el capilar se acondicionó haciendo fluir por aplicación de una presión de 1000 mbar: solución de NaOH 0.1 M durante 1 minuto, seguido de agua desionizada otro minuto y finalmente el BGE correspondiente durante 2 minutos. En caso

de capilares de otras longitudes, se adecuaron los tiempos de lavado para que fluya el mismo número de volúmenes de columna.

Material particulado

Para la preparación de frits por sinterizado térmico mediante transferencia axial del calor se utilizaron partículas de sílice Nucleosil de 5 μm de diámetro interno y 120 Å de tamaño de poro promedio, obtenidas de Macherey-Nagel GmbH & Co (Düren, Alemania).

Para el llenado de columnas capilares particuladas, el material empleado fueron partículas de octadecilsílice de 3,5 μm de diámetro y 80 Å de tamaño de poro promedio de uso cromatográfico (Agilent, Santa Clara, Estados Unidos).

Pieza aislante

Para la elaboración de la pieza aislante empleada para la preparación de frits, se utilizó arcilla gres de alta temperatura (1200°C) adquirida en un comercio local, y minas de grafito Plantec (Villa Ballester, Buenos Aires) para lápices mecánicos de 0,5 mm de espesor y dureza HB.

3.2 INSTRUMENTOS

El equipo de CE utilizado durante este trabajo de tesis fue un Lumex Capel 105M con detector UV de longitud de onda fija, en el rango de 190 a 400 nm (Lumex Ltd., San Petersburgo, Rusia). El mismo dispone de un sistema de regulación de temperatura muy preciso y efectivo, que funciona por circulación de líquido refrigerante ($\pm 0.1^{\circ}\text{C}$). En la Figura 3.1 se presenta una fotografía del mismo.

El procesamiento de datos se realiza mediante el software Elforun Version 3.2.2.



Figura 3.1. Fotografía del equipo de electroforesis capilar Lumex, modelo Capel 105M.

Las medidas de pH se realizaron empleando un electrodo combinado de vidrio Schott Blueline 11-pH (SI Analytics GmbH, Mainz, Alemania) conectado a un potenciómetro Accumet Research AR25 (Fischer Scientific, New Hampshire, Estados Unidos).

Para la elaboración de la pieza de arcilla aislante empleada para la preparación de frits, se utilizó un minitorno Dremel Serie 100 (Illinois, Estados Unidos) y una mufla eléctrica digital Barnstead-Thermolyne F6000 Serie 1060 (Minnesota, Estados Unidos)

La mufla eléctrica analógica empleada para preparar los frits fue una Jacobo Rapoport (Buenos Aires) de temperatura máxima 1200°C con control de temperatura analógico, la cual presenta una ventana de observación la puerta (Figura 3.2).



Figura 3.2. Fotografía ilustrativa de la mufla empleada en la preparación de frits.

Las partículas de fase estacionaria se dispersaron empleando un sonicador Bransonic 5 (Branson, Dansbury, Estados Unidos).

En relación al llenado de las columnas por fuerza centrífuga, se empleó una centrífuga de mesa Luguimac LC-20 (Buenos Aires, Argentina).

El llenado por gravedad se asistió empleando un mezclador de vórtice Vortex-Genie 2 (Scientific Industries Inc., Nueva York, Estados Unidos).

En cuanto al llenado por impulso con solvente a alta presión, se empleó un sistema de llenado de columnas de HPLC Alltech modelo 1666 (Alltech, Estados Unidos) modificado en el laboratorio para el llenado de tubos capilares, el cual se presenta en la Figura 3.3 y consiste en una bomba impulsora tipo Haskel capaz de amplificar presiones de solventes hasta 10000 psi mediante la acción de aire comprimido y un reservorio metálico para alojar la suspensión de partículas resistente a tales presiones.

Para lavar los frits y para probar su resistencia a la presión, se empleó una bomba de HPLC Agilent 1100 (Waldbron, Alemania).



Figura 3.3. Fotografía del sistema de llenado de columnas capilares a alta presión Alltech modelo 1666.

Los lechos de partículas y longitudes de frits se evaluaron haciendo uso de una lupa binocular estereoscópica Arcano ST 30 2L (Buenos Aires, Argentina), con aumentos totales 20x/60x y haciendo uso de una cámara de recuento Neubauer mejorada Marienfeld de 0.100mm de profundidad (Lauda-Königshofen, Alemania).

3.3 PROCEDIMIENTOS

3.3.1 Estudio del equilibrio de asociación analito-ligando

Se preparó un set de soluciones BGE con contenido variable de selector quirál, obteniendo los siguientes valores de $p[X]$: 1.22, 1.30, 1.40, 1.52, 1.70, 2.00 y 2.30, correspondientes a concentraciones 60 , 50 , 40 , 30 , 20 , 10 y 5 mM respectivamente, disolviendo las cantidades necesarias de 2-HP- β -CD en una solución buffer de H_3PO_4/NaH_2PO_4 100 mM, pH=2.50. También se preparó un BGE sin selector quirál ($[X]=0$ mM) al cual se le asignó un valor de $p[X]=10$.

Se prepararon soluciones individuales de cada analito modelo en su forma racémica disolviendo el sólido en una mezcla de metanol:agua 50:50 v/v a una concentración aproximada de 0.5 mg/mL. Cada una de estas se analizó mediante CE por triplicado en cada uno de los BGE. Las condiciones experimentales fueron las siguientes: capilar de sílice fundida de 50 μ m de diámetro interno, de 60 cm de longitud total (L_t) con ventana de detección ubicada a 51 cm respecto de la entrada del capilar (L_d), termostatzado a 25°C. La inyección de los analitos se realizó hidrodinamicamente por aplicación de 30 mbar de presión durante 2 segundos. El análisis se realizó aplicando un potencial de 25 kV y la detección UV se fijó en 214 nm. Para cada análisis se registró el tiempo de migración (t_m) para cada enantiómero; con el mismo se calculó la movilidad aparente según:

$$\mu_a = \frac{L_d L_t}{t_m V} \quad [3.1]$$

También se registró la corriente establecida (i) para obtener la movilidad electroforética según se detalla a continuación.

Dado que a pH 2.50 el EOF es extremadamente lento, la movilidad de un marcador neutro como el alcohol bencílico resulta muy baja. Como alternativa para medir el EOF, se aprovechó la relación lineal entre la movilidad del flujo electroosmótico y la corriente cuando las dimensiones del capilar, la composición del buffer y la fuerza iónica del BGE se mantienen constantes. Experimentalmente, se analizó mediante CE por triplicado, una solución de alcohol bencílico en BGEs con diferentes viscosidades; los valores registrados se ajustaron linealmente para calcular la relación entre corriente y movilidad del EOF (Figura 3.4).

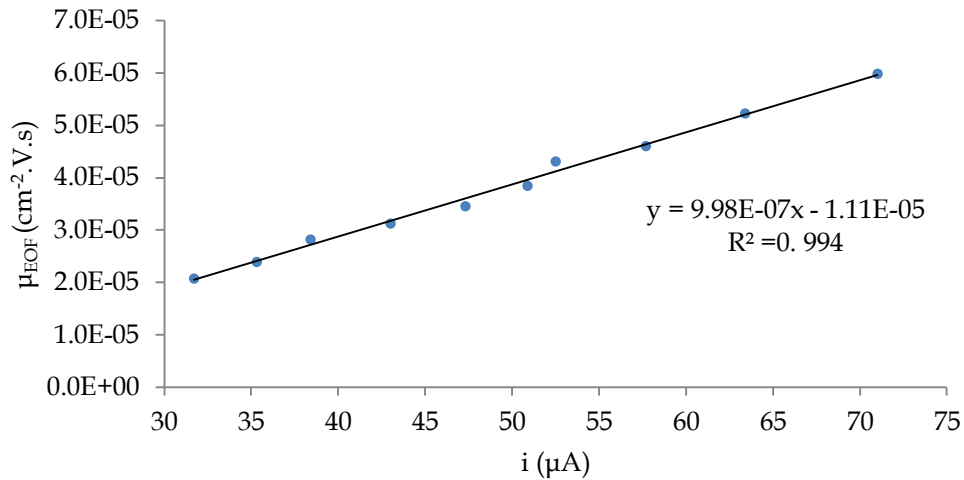


Figura 3.4. Relación entre la movilidad electroforética del flujo electroosmótico, empleando alcohol bencílico como marcador, y la corriente establecida

Determinación de las viscosidades de los BGEs

Las viscosidades a 25°C de todos los BGEs se obtuvieron haciendo uso del instrumento de CE. Se determinó por triplicado el tiempo de elución requerido para que un pequeño pulso de inyección de una solución 1000 ppm de alcohol bencílico alcance la ventana de detección cuando se aplica una presión constante de 99 mbar. El capilar empleado en este caso fue uno de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno ($L_t=100.5$ cm, $L_d=91.0$ cm). Para contemplar el hecho de que el instrumento de CE solo controla la temperatura de la zona central del tupo capilar y no los extremos, las viscosidades no se calcularon mediante la ecuación de Hagen-Poiseuille sino que se obtuvieron por medio de una curva de calibración de viscosidad vs tiempo de elución, la cual se obtuvo empleando solventes de viscosidades conocidas (agua, isopropanol, metanol, etanol y dimetilsulfóxido). Con dicha curva, que se presenta en la Figura 3.5, los tiempos de elución del alcohol bencílico en cada BGE fueron convertidos fácilmente a viscosidades.

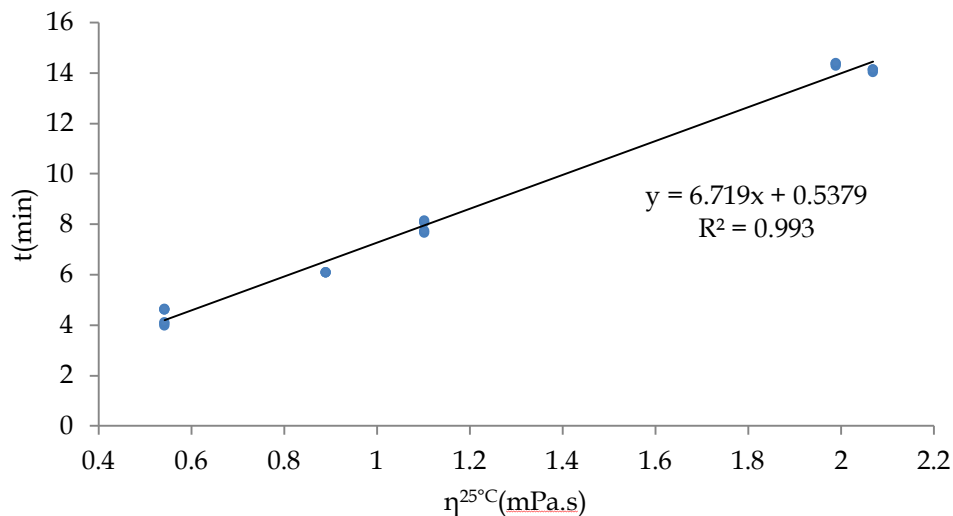


Figura 3.5. Curva de calibración de viscosidad en función del tiempo de elución obtenida empleando solventes de viscosidades conocidas (agua, isopropanol, metanol, etanol y dimetilsulfóxido).

3.3.2 Optimización de la concentración de selector quiral

Se preparó una solución BGE con contenido variable de selector quiral, obteniendo los siguientes valores de $p[X]$: 1.30, 1.75 y 2.00, correspondientes a concentraciones 50.00 mM, 17.78 mM y 10.00 mM respectivamente, disolviendo las cantidades necesarias de 2-HP- β -CD en una solución buffer de $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 100 mM, pH=2.50.

También se preparó una solución estándar conteniendo los cuatro pares de enantiómeros por mezcla de iguales volúmenes de cada solución individual preparada para la determinación de constantes, la cual se analizó mediante CE en cada uno de los BGEs. Las condiciones experimentales fueron las mismas que se detallaron en la sección 3.3.1.

3.3.3 Fabricación de columnas capilares particuladas

3.3.3.1 Preparación de frits

El procedimiento consistió en introducir las partículas de sílice mediante el método húmedo, "golpeando" el extremo del capilar en una mezcla de partículas de sílice y agua desionizada con consistencia de pasta (60 mg de partículas con 5-6 gotas de agua) hasta alcanzar una longitud de 1 mm. La misma se evaporó por calentamiento en estufa a 140°C

durante 45 minutos. El sinterizado se realizó por exposición frontal del capilar al calor (720°C durante 60 segundos) en una mufla cuya puerta se encuentra perforada, colocando el capilar en una pieza cilíndrica de arcilla de gres de alta temperatura que actúa como aislante especialmente diseñada para la introducción justa del capilar, así como para la colocación de este dispositivo en la ventana de observación de la mufla (Figura 3.6). Finalizado el tiempo de sinterizado, se retira la barra de arcilla de la mufla y se saca el capilar de su interior para su rápido enfriado. Por último, se lava el frit con metanol a contracorriente haciendo uso de una bomba de HPLC.

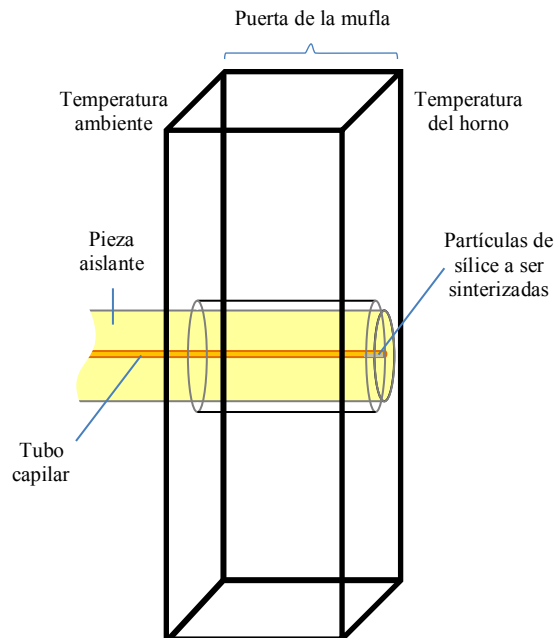


Figura 3.6. Representación esquemática de la etapa de sinterizado: tubo capilar con partículas de sílice en su extremo, ubicado en una barra aislante expuesto frontalmente al calor de una mufla por inserción del mismo en la ventana de observación.

3.3.3.2 Llenado con el material particulado

Llenado por fuerza centrífuga

Se desarrolló un dispositivo alternativo al descrito anteriormente (Sección 1.3.6.2.2), el cual debe colocarse en una centrífuga para lograr el llenado del capilar. La representación

esquemática del dispositivo se presenta en la Figura 3.7.

Las columnas se llenaron empleando una suspensión de concentración 10 mg mL^{-1} empleando acetona como solvente. El capilar se llena inicialmente con acetona y a continuación se carga la punta plástica con $300 \mu\text{L}$ de la suspensión previamente sonicada y se somete el dispositivo a 2000 rpm durante 5 minutos, repitiendo el proceso hasta alcanzar la longitud de columna deseada.

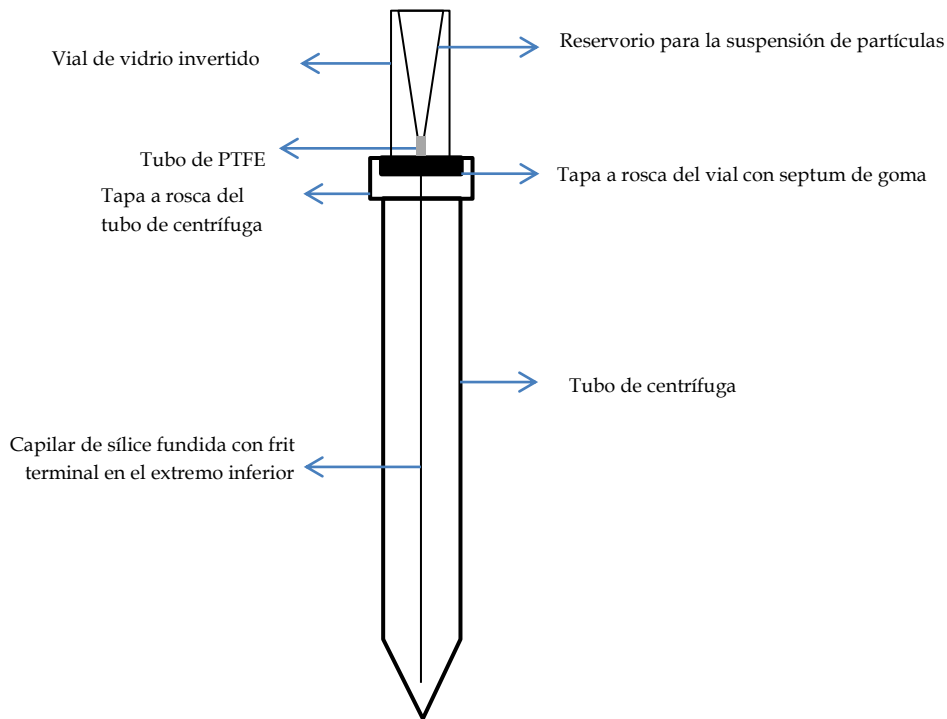


Figura 3.7. Representación esquemática del dispositivo diseñado para empaquetar capilares por fuerzas centrífugas.

Llenado por gravedad

El llenado por gravedad se realizó replicando el dispositivo de la Figura 1.8, y acoplado el extremo del capilar con el frit terminal a un reservorio de plástico colocado en un mezclador de vórtice, con el fin de tener la columna sometida a vibración durante todo el proceso.

Las columnas se llenaron empleando una suspensión de concentración 10 mg mL^{-1} empleando acetona como solvente. El capilar se llenó inicialmente con acetona y a continuación se cargó la jeringa con $800 \text{ }\mu\text{L}$ de la suspensión previamente sonicada, se aplicó una leve presión sobre el émbolo, se encendió el mezclador de vórtice en una baja velocidad y se permitió que la sedimentación proceda durante toda la noche.

Llenado por impulso con solvente a alta presión

Debido que el equipo para rellenar columnas por presión está diseñado para fabricar columnas convencionales para HPLC, los diámetros de las tuberías debieron ser adaptados a tamaños acordes al de los tubos capilares. Del mismo modo, el reservorio original de la suspensión de partículas de relleno, consistente en un recipiente de acero inoxidable de 20 mL de capacidad, se reemplazó por una columna de HPLC vacía de 4.6 mm de diámetro interno y 10 cm de longitud. El sistema completo se presenta en la Figura 3.8.

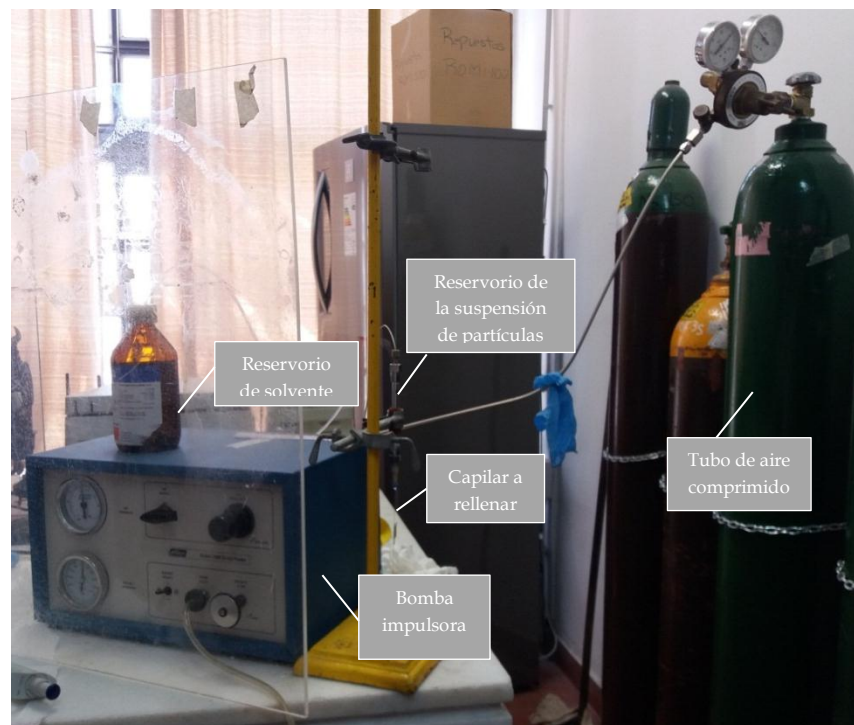


Figura 3.8. Fotografía del sistema completo de empaque por presión, en el cual puede observarse el tubo de aire comprimido, el reservorio de la suspensión de partículas, el capilar con el frit terminal, la bomba impulsora y el reservorio de solvente.

Las columnas se llenaron empleando una suspensión de partículas de concentración 30 mg mL^{-1} en isopropanol como solvente. El capilar se llenó inicialmente con isopropanol y a continuación se cargó el reservorio con $750 \text{ }\mu\text{L}$ de la suspensión previamente sonicada durante 30 minutos. Se aplicó una presión de solvente inicial de 2000 psi hasta observar el inicio del llenado y la resistencia del frit terminal, y luego se aplicaron presiones de solvente más elevadas (8000 psi), hasta alcanzar la longitud de columna deseada.

Capítulo 4
Resultados y discusión

En este capítulo se presentan y se discuten en detalle los resultados obtenidos a partir del desarrollo experimental realizado para concretar los objetivos propuestos.

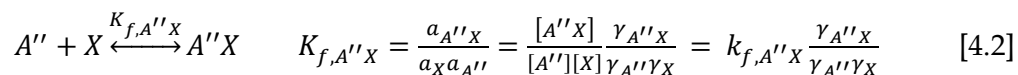
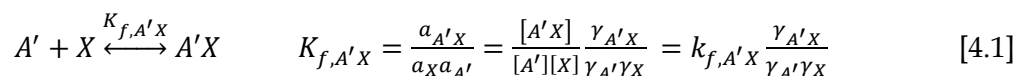
En primer lugar se presenta el **estudio del equilibrio de asociación analito-ligando** mediante la propuesta de un modelo teórico y su utilización para la determinación de constantes termodinámicas de asociación. A continuación, el empleo de dicho modelo como base para interpretar y elucidar las contribuciones que actúan como **fuerza impulsora de las separaciones quirales por electroforesis capilar** como así también para desarrollar y poner a prueba un método predictivo para **optimizar la concentración de ligando**.

Por último se aborda la **fabricación de columnas capilares particuladas**, haciendo especial hincapié en la preparación de frits terminales y en la evaluación de distintos métodos de llenado.

4.1 ESTUDIO DEL EQUILIBRIO DE ASOCIACIÓN ANALITO-LIGANDO

4.1.1 Modelo teórico

Considerando el equilibrio de asociación para cada forma enantiomérica de un compuesto racémico, A, y asumiendo una relación estequiométrica 1:1



Donde A' y A'' representan los dos enantiómeros del compuesto considerado, X es un selector quiral, A'X y A''X son los complejos de asociación, con constantes termodinámicas $K_{f,A'X}$ y $K_{f,A''X}$ o estequiométricas $k_{f,A'X}$ y $k_{f,A''X}$ de formación, respectivamente.

a indica la actividad y γ indica el coeficiente de actividad de la especie que se detalla en el subíndice. Los coeficientes de actividad iónica pueden estimarse haciendo uso de la teoría

de Debye-Hückel, cuya ecuación en forma extendida puede emplearse en soluciones con fuerza iónica de hasta 0.10m:

$$-\log \gamma_{\pm z} = p\gamma_{\pm z} = \frac{z^2 A\sqrt{I}}{1 + \alpha_0 B\sqrt{I}} = z^2 p\gamma_{\pm 1} \quad [4.3]$$

Donde z es la carga del ión considerado; A , α_0 y B son parámetros de la ecuación e I es la fuerza iónica de la solución, calculada como es habitual.

Las movilidades electroforéticas efectivas de cualquier analito distribuido bajo dos especies diferentes, es el resultado de una función lineal ponderada de las movilidades de cada una de las formas[1,2]. Matemáticamente, puede expresarse como:

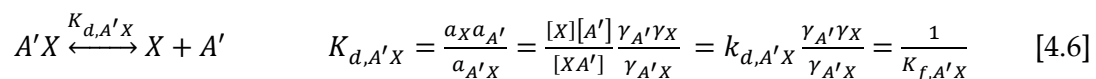
$$\mu_{ef} = \frac{[A]\mu_A}{[A]+[AX]} + \frac{[AX]\mu_{AX}}{[A]+[AX]} \quad A = A'; A'' \quad [4.4]$$

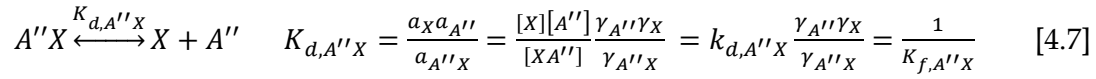
En donde μ_A y μ_{AX} denotan las movilidades electroforéticas de las formas libre y complejada, respectivamente. Teniendo en cuenta las ecuaciones [4.1] y [4.2], la expresión puede ser reordenada a:

$$\mu_{a,A} = \frac{\mu_A}{1+10^{-(p[X]+pK_{f,AX})}} + \frac{\mu_{AX}10^{-(p[X]+pK_{f,AX})}}{1+10^{-(p[X]+pK_{f,AX})}} \quad A = A'; A'' \quad [4.5]$$

Donde "p" indica, como es usual, la operación matemática de aplicar el logaritmo negativo, y $[X]$ se encuentra expresada en unidades de molaridad.

Los equilibrios de disociación ácido-base han sido y continúan siendo los más estudiados en química, y el tratamiento matemático de dichos equilibrios y su resolución completa considerando diferentes condiciones iniciales, empleando tanto métodos de aproximación como resolución exacta, son ampliamente conocidos, dado que los mismos se estudian habitualmente en cursos de química analítica, los tratamientos son familiares y relativamente simples. Por este motivo es conveniente tratar el equilibrio de sistemas analito-ligando en el sentido de disociación. Es decir, considerar los equilibrios en la dirección de disociación de los complejos $A'X$ y $A''X$, con constantes termodinámicas ($K_{d,A'X}$ y $K_{d,A''X}$) o estequiométricas ($k_{d,A'X}$ y $k_{d,A''X}$) de disociación, respectivamente.





empleando como variable $p[X] = -\log[X]$ en analogía al $pH = -\log[H_3O^+]$ que se emplea en cualquier estudio de disociación de un ácido débil HA. Así, las movilidades efectivas se expresan como:

$$\mu_{ef A} = \frac{\mu_A}{1+10^{pK_{d,AX}-p[X]}} + \frac{\mu_{AX} 10^{pK_{d,AX}-p[X]}}{1+10^{pK_{d,AX}-p[X]}} \quad A = A'; A'' \quad [4.8]$$

Y se mantiene la analogía, como puede observarse en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Analogía entre los equilibrios de disociación de un ácido débil HA y de un complejo AX.

	Ácido débil	Complejo
Equilibrio de disociación	$HA + H_2O \xrightleftharpoons{K_a} H_3O^+ + A^-$	$AX \xrightleftharpoons{K_{d,AX}} A + X$
Constantes termodinámica y estequiométrica de equilibrio	$K_a = \frac{a_{H_3O^+} a_{A^-}}{a_{HA}} = k_a \frac{\gamma_{H_3O^+} \gamma_{A^-}}{\gamma_{HA}}$	$K_{d,AX} = \frac{a_X a_A}{a_{AX}} = k_{d,AX} \frac{\gamma_A \gamma_X}{\gamma_{AX}}$
Movilidad electroforética efectiva	$\mu_{ef A} = \frac{[A^-] \mu_A + [HA] \mu_{HA}}{[A^-] + [HA]}$ $= \frac{\mu_A + 10^{pK_a - pH} \mu_{HA}}{1 + 10^{pK_a - pH}}$	$\mu_{ef A} = \frac{[A] \mu_A + [AX] \mu_{AX}}{[A] + [AX]}$ $= \frac{\mu_A + 10^{pK_{d,AX} - p[X]} \mu_{AX}}{1 + 10^{pK_{d,AX} - p[X]}}$

La principal diferencia entre equilibrios de complejación y equilibrios ácido-base es que en estos últimos el pH se determina mediante un electrodo que proporciona un valor estrictamente en términos de actividades; mientras que en el modelo propuesto X representa un ligando y su concentración no se mide, sino que se calcula a partir de expresiones deducidas a partir de los balances de masa y electroneutralidad. Sin embargo, si la concentración analítica de ligando se mantiene dos órdenes de magnitud por encima de la concentración de analito ($[X] > 100[A]$), la aproximación de Henderson-Hasselbach

que se aplica a equilibrios ácido-base es válida y puede asumirse que la concentración de ligando en el equilibrio es similar a su concentración analítica, definida en la preparación de la solución ($pC \approx p[X]$). Por otro lado, si la aproximación no es válida ($[X] < 100[A]$) se deben emplear ecuaciones que consideren el balance de masa.

4.1.2 Determinación de constantes termodinámicas de asociación

La determinación de constantes de equilibrio es un tema de especial importancia en diferentes disciplinas de la química. Su conocimiento es útil para el desarrollo de agroquímicos, alimentos, fármacos y cosméticos, fisiología, medicina, bioquímica, medioambiente, entre otros.

Se ha empleado una amplia variedad de técnicas instrumentales para la determinación de constantes de equilibrio, ya sea de asociación como de disociación de especies químicas. Básicamente el método consiste en fijar la/s concentraciones de alguna/s de la/s especie/s involucrada/s en el equilibrio, y permitir que el mismo proceda generando ciertas cantidades de las demás especies que también forman parte del equilibrio, para finalmente determinar cuantitativamente la nueva condición alcanzada, utilizando una técnica instrumental. Una condición necesaria es que el instrumento debe tener la capacidad analítica de determinar las concentraciones generadas en la situación final, lo que constituye la principal limitación en la determinación de constantes ya sea porque:

- Las especies no generan una señal analítica que pueda ser detectada, por ejemplo, no poseen absorción óptica, no presentan propiedades redox, no tienen carga neta para obtener señales por electroforesis capilar, no presentan retenciones diferenciales en cromatografía, no existe un electrodo selectivo para caracterizarlas potenciométricamente, etc.
- No es posible fijar experimentalmente una condición inicial adecuada para generar la cantidad requerida de especies dentro del rango de detección del instrumento, debido por ejemplo a una baja solubilidad de los componentes, disponibilidad insuficiente de reactivos, etc.

En los últimos años, la CE se ha posicionado como una herramienta útil para el estudio de equilibrios químicos. No obstante, se ha utilizado mayormente para determinar constantes de disociación ácidas, con el objetivo de caracterizar moléculas o bien para optimizar separaciones empleando el pH como variable.

El modelo teórico descrito anteriormente permite determinar constantes termodinámicas de asociación analito-ligando por CE así como también movilidad electroforética del analito tanto libre como asociado. En el presente trabajo de tesis el mismo se desarrolló para determinar constantes de asociación entre un selector y un analito quiral: como modelo de selector se seleccionó la 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (2-HP- β -CD), y como analitos quirales modelo, cuatro fármacos: oxprenolol, pindolol, propanolol y metilbromuro de homatropina.

Un aspecto práctico a tener en cuenta en las determinaciones de constantes, es que para obtener valores confiables, la única condición que cambia entre experimentos debe ser la concentración de ligando, mientras que cualquier otra propiedad tanto física como química, debe permanecer constante. En relación a esto, para la determinación de constantes de asociación, la fuerza iónica puede mantenerse fácilmente constante, sin embargo la presencia de diferentes concentraciones de ligando genera cambios en la viscosidad del medio. A pesar del hecho de que esto tiene lugar cuando se modifica la concentración de cualquier especie en solución, el efecto es notablemente significativo cuando se trata de moléculas grandes, tales como proteínas o polisacáridos (entre los que se incluye la celulosa o las ciclodextrinas), especialmente a elevadas concentraciones. Dado que la movilidad electroforética es inversamente proporcional a la viscosidad, las movilidades electroforéticas corregidas, μ_{ef}^* , pueden calcularse como:

$$\mu_{ef}^* = \mu_{ef}^{exp} \left(\frac{\eta_{exp}}{\eta_w} \right) \quad [4.9]$$

Donde μ_{ef}^* corresponde a la movilidad que se observaría si el medio de separación tuviera la viscosidad del agua pura, μ_{ef}^{exp} a la movilidad obtenida en experimentos reales, y η_{exp} y η_w son las viscosidades del medio de separación y de agua pura, respectivamente. Si esta

corrección no se tiene en cuenta, la curva obtenida tendría valores de movilidades menores que los corregidos y como consecuencia el parámetro pK_d sería mayor que el real.

Algunos autores[3] proponen corregir el efecto de la viscosidad basados en la relación inversa entre ésta y la corriente:

$$\frac{\eta_{exp}}{\eta_w} = \frac{i_w}{i_{exp}} \quad [4.10]$$

Sin embargo este método no se empleó porque si bien es cierto que la viscosidad está relacionada con la corriente y con el EOF, también es cierto que la corriente está sujeta a una variabilidad significativa, similar a la del EOF, que no es producida solo por cambios en las viscosidades sino también por el cambio en el potencial zeta producido por adsorción de contaminantes a la pared del capilar, por ejemplo. Por otro lado, la corrección de la viscosidad a aquella correspondiente a agua pura, requeriría poder determinar un valor confiable de corriente en agua pura (desionizada), lo cual es imposible en la práctica.

Como segunda opción, se puede realizar una corrección robusta e independiente del EOF, basada en datos de viscosidad obtenidos mediante experimentos de fluidodinámica. Allmendinger et al.[4] propusieron usar el instrumento de CE para determinar las viscosidades considerando la ley de Poiseuille para tubos abiertos, haciendo fluir una solución a través del capilar por presión. Este método no considera el hecho de que el tubo capilar tiene zonas con diferentes temperaturas que afectan significativamente los valores de viscosidad, ni las inhomogeneidades del diámetro interno del tubo capilar, y tampoco el error sistemático en la determinación gravimétrica del caudal causado por la evaporación del solvente.

En el presente trabajo de tesis, las viscosidades a 25°C de todos los BGEs se obtuvieron haciendo uso del instrumento de CE mediante el método alternativo descrito en el capítulo anterior.

En la Figura 4.1 se presenta el gráfico del set de datos obtenido para cada enantiómero luego de calcular la movilidad aparente, sustraer la movilidad del EOF y realizar la corrección por viscosidad, como función de $p[X]$. La línea sólida representa la regresión no lineal de los datos según la ecuación [4.8], y los parámetros obtenidos de la misma se presentan en la Tabla 4.2.

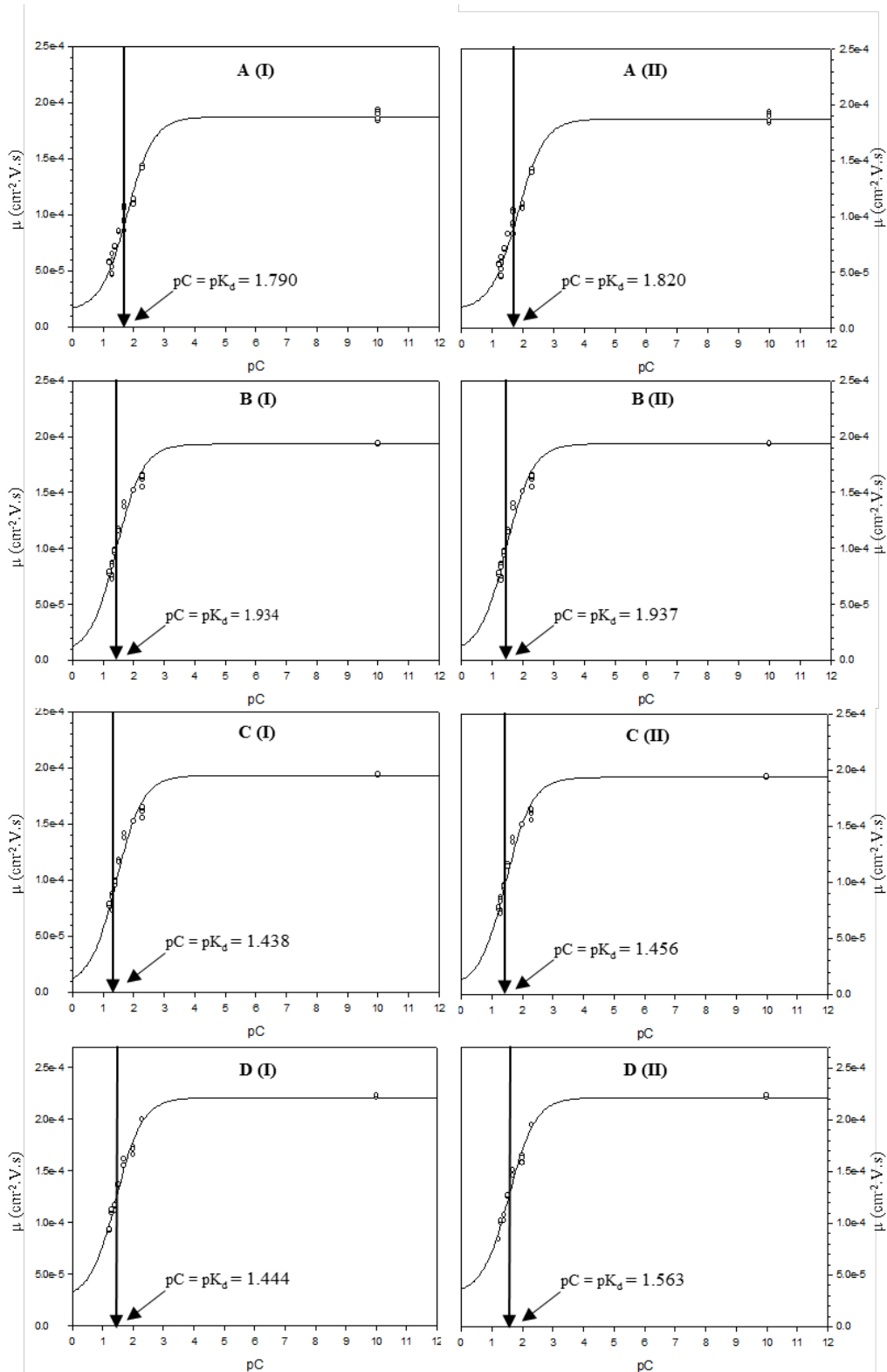


Figura 4.1. Gráficos de movilidades electroforéticas corregidas como función de $pC = p[X]$. Los puntos representan los valores experimentales, mientras que la línea sólida representa la regresión no lineal de los mismos. A: Propranolol, B: Pindolol, C: Oxprenolol, D: Metilbromuro de homatropina. (I) y (II) representan a cada enantiómero.

Tabla 4.2. Parámetros obtenidos por el ajuste no lineal de los datos experimentales de movilidades corregidas como una función de $p[X]$. Movilidades expresadas en $\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{s}^{-1}$

Analito	$10^4\mu_{A'}$	$10^4\mu_{A''}$	$10^4\mu_{A'X}$	$10^4\mu_{A''X}$	$pK_{d,A'X}$	$pK_{d,A''X}$	$K_{f,A'X}$	$K_{f,A''X}$
Propranolol	1.874	1.875	0.142	0.163	1.790	1.820	61.69	66.11
Pindolol	1.934	1.937	0.057	0.065	1.438	1.456	27.43	28.58
Oxprenolol	1.858	1.857	0.215	0.230	1.290	1.301	19.51	20.00
Metilbromuro de homatropina	2.210	2.214	0.256	0.313	1.444	1.563	27.82	36.58

Los valores de $pK_{d,AX}$ obtenidos como parámetros de las regresiones se encontraron en el rango entre 1.29 y 1.82, indicando una asociación muy débil, o una tendencia muy fuerte hacia la disociación del complejo. Este rango de $pK_{d,AX}$ puede ser traducido en constantes de unión con valores en el intervalo de 19.5 a 66.1, los cuales son valores típicos para estos complejos[1].

Una forma alternativa de interpretar los valores de $pK_{d,AX}$ es considerar la concentración de selector quiral requerida para que el enantiómero más fuerte de cada par se encuentre asociado en un 50%. De acuerdo con esto, el complejo con la constante de inclusión más fuerte es la del segundo enantiómero del propranolol, el cual requiere una concentración de $[2\text{-HP-}\beta\text{-CD}] = 15.1 \text{ mM}$ para estar asociado un 50%, mientras que a la misma concentración la otra forma enantiomérica está incluida en un 48.3%. Esta fuerte constante de inclusión es razonable si se tiene en cuenta que la cavidad de la 2-HP- β -CD es hidrofóbica y el propranolol es el compuesto con el grupo hidrofóbico más grande (naftilo). El siguiente compuesto teniendo en cuenta el orden creciente de la concentración de 2-HP- β -CD necesaria para alcanzar el 50% de inclusión es el segundo enantiómero del metilbromuro de homatropina, el cual requiere $[2\text{-HP-}\beta\text{-CD}] = 27.3 \text{ mM}$, mientras el otro enantiómero se encuentra incluido en un 42.3%. El siguiente compuesto es el segundo enantiómero del pindolol, el cual requiere una solución con una concentración de 2-HP- β -CD 35 mM para estar incluido en un 50% mientras que a esta concentración de ligando el otro enantiómero está incluido en un 49.0%. En último lugar se encuentra el segundo enantiómero del oxprenolol, el cual requiere una solución 50 mM de 2-HP- β -CD para estar

incluido en un 50%, mientras que a esta concentración de ligando el otro enantiómero se encuentra incluido en un 49.4%.

El análisis de las diferencias en los grados de asociación entre formas enantioméricas cuando uno de ellos está incluido en un 50% resulta un buen indicador de la contribución termodinámica a la separación. Por lo tanto, el metilbromuro de homatropina es el compuesto con una mayor diferencia de inclusión (7%) cuando uno de los enantiómeros está incluido en un 50%. Esto podría deberse a que el primer átomo alejado del grupo hidrofóbico es el carbono quiral, mientras que en los otros compuestos en los que la diferencia en el grado de disociación es del 2% respecto al enantiómero incluido al 50%, los átomos quirales están a dos átomos de distancia del grupo hidrofóbico que ingresa a la cavidad.

4.1.3 Elucidación de contribuciones al mecanismo de separación

En las técnicas de electroseparación enantioméricas, la separación puede deberse a dos contribuciones principales:

- 1) Diferencias entre las constantes de asociación analito-ligando, a las que se puede considerar una **contribución termodinámica**.
- 2) Diferencias en el radio hidrodinámico del complejo de asociación analito-selector, a las que se puede denominar **contribución hidrodinámica**.

Sin embargo, las diferencias de movilidades entre enantiómeros en general son más pequeñas que la variabilidad del EOF, por lo tanto, los ajustes no lineales individuales de los datos experimentales que exhiben comportamiento sigmoideo no son suficientes para describir dichas diferencias adecuadamente. Dado que el EOF afecta en la misma extensión a las movilidades de ambos enantiómeros que poseen tiempos de migración muy similares, surge como estrategia plantear una expresión para la diferencia de movilidad entre enantiómeros, $\Delta\mu_e$, eliminando así el problema de la variabilidad. Esta idea fue propuesta inicialmente por Wren[5] en el año 1992:

$$\Delta\mu_e = \frac{\mu_A + \mu_A K_{f,A'}[X]}{1 + K_{f,A'}[X]} - \frac{\mu_A + \mu_{AX} K_{f,A''}[X]}{1 + K_{f,A''}[X]} = \frac{[X](\mu_A - \mu_{AX})(K_{f,A''} - K_{f,A'})}{1 + [X](K_{f,A'} + K_{f,A''}) + K_{f,A'}K_{f,A''}[X]^2} \quad [4.11]$$

Sin embargo las ecuaciones propuestas por este y otros autores [6,7] para explicar las diferencias en las movilidades, consideran que las movilidades de los analitos libres son iguales, $\mu_{A'} = \mu_{A''} = \mu_A$, lo cual es correcto. No obstante, también consideran iguales a las movilidades de los analitos asociados, $\mu_{A'X} = \mu_{A''X} = \mu_{AX}$, que no es necesariamente cierto, esto obliga a describir las diferencias de movilidades solo a través de la contribución termodinámica.

La expresión para $\Delta\mu_e$ obtenida empleando las movilidades con el modelo propuesto según la ecuación [4.8], es la siguiente:

$$\Delta\mu_e = \mu_{a,A'} - \mu_{a,A''} = \frac{\mu_{A'} + \mu_{A'X} 10^{pK_{d,A'X} - p[X]}}{1 + 10^{pK_{d,A'X} - p[X]}} - \frac{\mu_{A''} + \mu_{A''X} 10^{pK_{d,A''X} - p[X]}}{1 + 10^{pK_{d,A''X} - p[X]}} \quad [4.12]$$

En la Figura 4.2 se presentan una serie de simulaciones siguiendo las ecuaciones [4.8] y [4.12] del modelo. Las mismas se describen a continuación:

El gráfico A-I corresponde a las curvas de μ_e como función de $pC = p[X]$ para la situación hipotética en la que dos enantiómeros difieren solo en las constantes de unión con el selector quiral. La diferencia en $pK_{d,AX}$ se encuentra representada en el eje x mediante la distancia entre los puntos de inflexión de ambas curvas, mientras que la diferencia entre las movilidades de los complejos se observa por extrapolación de las curvas hacia valores de $p[X]$ tendiendo a cero. De la misma manera, la diferencia entre las movilidades de los enantiómeros libres está dada por la tendencia de las curvas hacia valores de $p[X]$ elevados (es decir, $[X] \rightarrow 0$ mM). Se puede observar en este gráfico que no existe diferencia entre ellos.

Es importante destacar que la diferencia entre $pK_{d,AX}$ se encuentran magnificadas con el objetivo de facilitar la visualización, pero usualmente las mismas son muy pequeñas. Por este motivo, el análisis de $\Delta\mu_e$ resulta más útil para analizar las contribuciones termodinámica e hidrodinámica a la separación. En el gráfico A-II, se presenta la curva de $\Delta\mu_e$ también como función de $pC = p[X]$ para la misma situación hipotética que en A-I. La curva de $\Delta\mu_e$ vs $p[X]$ presenta forma de campana Gaussiana, centrada en el valor promedio de $pK_{d,AX}$ de los dos enantiómeros. Este valor central es el valor de $p[X]$ óptimo para obtener la mejor separación de este par de enantiómeros.

En los gráficos B-I y B-II se presenta el caso inverso al anterior, es decir, aquel en el que ambos enantiómeros presentan exactamente el mismo valor de $pK_{d,AX}$ pero diferentes movilidades de los complejos. En el gráfico B-I se observa que los puntos de inflexión de ambas curvas se encuentran ubicados en el mismo valor de $p[X]$, mientras que a $p[X] \rightarrow 0$ las curvas se van separando. Este caso solo es posible observarlo en técnicas en las que la separación depende del radio hidrodinámico de los complejos; por este motivo se decidió denominarla separación controlada hidrodinámicamente. En el gráfico B-II, se presenta la diferencia entre las curvas sigmoideas del gráfico B-I, donde se hace evidente que la separación es mejor a menores valores de $p[X]$ y, de hecho, este es el escenario en el que es válido el concepto intuitivo de que a mayor concentración de selector quirral, mejor es la separación.

En los gráficos C-I y D-I, se presentan las dependencias de las movilidades electroforéticas de dos enantiómeros que poseen ambas contribuciones al mecanismo de separación, es decir, tanto la termodinámica como la hidrodinámica. Siguiendo la misma línea de análisis, en los gráficos C-II y D-II se representan las diferencias de movilidades de los analitos cuyos comportamientos se muestran en las gráficas C-I y D-I. En dichas separaciones, que denominaremos de control mixto o termo-hidrodinámicas, hay dos situaciones posibles:

En una de ellas, un complejo con menor $pK_{d,AX}$, de menor tamaño y por lo tanto, mayor movilidad que el otro enantiómero para cualquier valor de $p[X]$. La situación se muestra en el gráfico C-I como movilidades vs $pC = p[X]$, y gráfico C-II como diferencia de movilidades vs $pC = p[X]$. La máxima diferencia de movilidad se alcanza para un valor de $p[X]$ no exactamente igual pero, alrededor del valor de $pK_{d,AX}$ promedio, $\langle pK_{d,AX} \rangle$. A esta concentración, la separación se encuentra controlada por la contribución termodinámica, y queda definida a través del $pK_{d,AX}$ como una diferencia en la movilidad. Hacia valores de concentraciones mayores, o menores valores de $p[X]$, hay una reducción abrupta en ambas movilidades y se puede decir que en esta situación la separación tiene contribución hidrodinámica. Además se puede observar que la diferencia de movilidades es siempre positiva.

En la otra situación, en la cual las movilidades electroforéticas y las diferencias entre ellas vs $p[X]$ se describen en los gráficos D-I y D-II, respectivamente, se tiene un complejo con menor valor de $pK_{d,AX}$ y mayor tamaño, y con una movilidad electroforética menor que la del otro enantiómero para el valor de $p[X] = pK_{d,AX}$. Este tipo de sistema es fácil de identificar dado que de sus gráficos surgen dos características muy notorias:

- La diferencia de movilidad máxima se alcanza para un valor de $p[X]$ que se encuentra desplazado respecto del valor promedio de $pK_{d,AX}$.
- A valores de $p[X]$ menores que $< pK_{d,AX} >$ existe una reducción en las diferencias de movilidades hasta un valor de $p[X]$ en el cual se alcanza la co-elución ($p[X]_{co}$), es decir, una situación en la que las diferencias de movilidades se vuelven negativas o las curvas de movilidades electroforéticas se intersectan. En ese valor, la contribución termodinámica de uno de los enantiómeros se ve compensada por la contribución hidrodinámica del otro. En otras palabras, a valores de $p[X]$ menores que $p[X]_{co}$, existe una inversión del orden de elución de los picos observado para la zona de $p[X] > p[X]_{co}$, en la cual la separación está controlada por la contribución hidrodinámica.

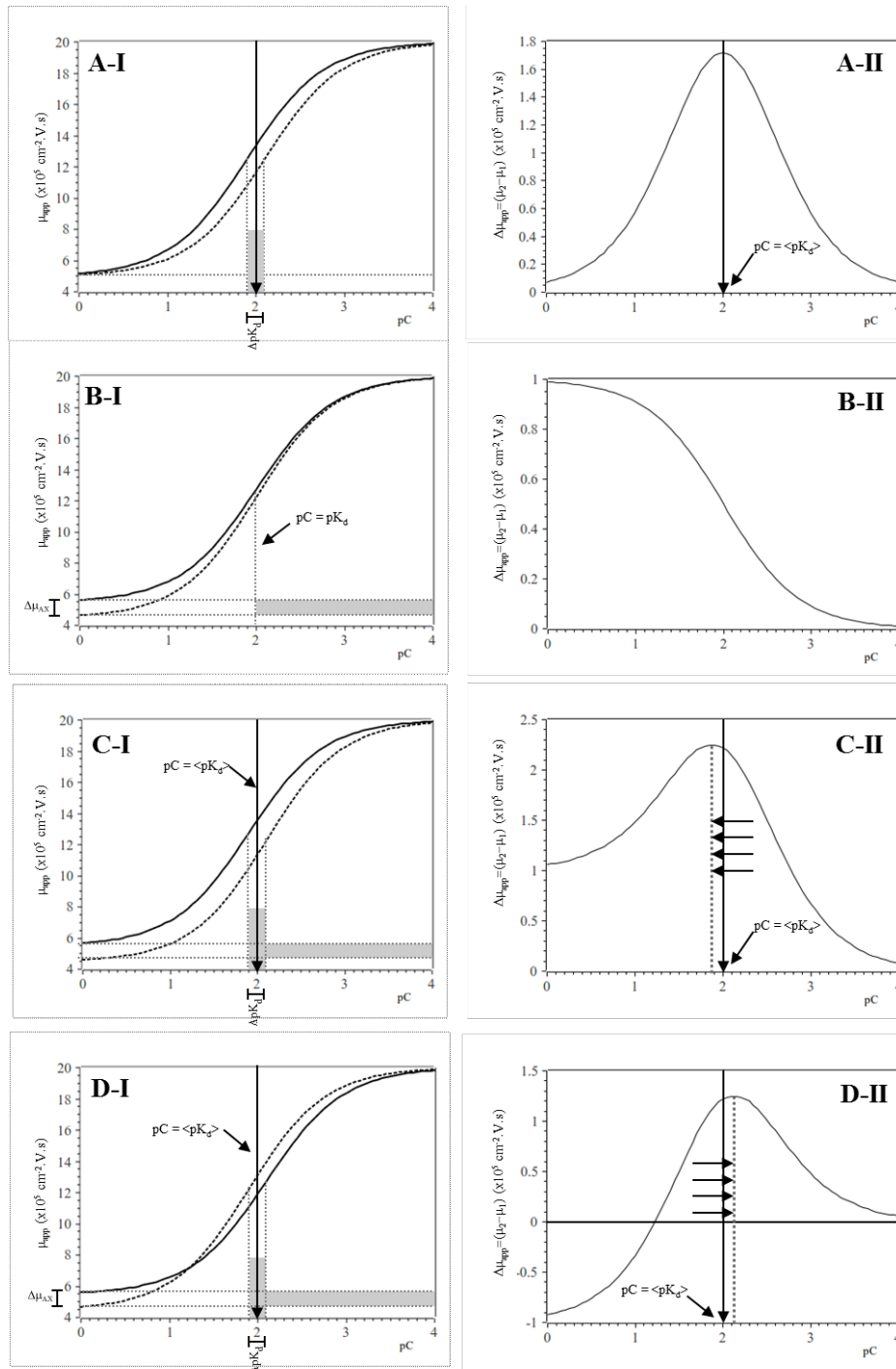


Figura 4.2. Simulaciones de (I) movilidades electroforéticas y (II) diferencias de movilidades electroforéticas como función de $pC = p[X]$ para diferentes situaciones: (A) dos enantiómeros difieren solo en las constantes de asociación, (B) ambos enantiómeros presentan exactamente el mismo valor de pK_d pero movilidades de los complejos diferentes, (C) un complejo con menor pK_d , de menor tamaño (mayor movilidad) que el complejo del otro enantiómero y (D) un complejo con menor valor de pK_d y mayor tamaño (menor movilidad) que el complejo del otro enantiómero.

En relación al selector quiral y los analitos racémicos seleccionados como modelo, la elucidación del mecanismo de separación se realiza por comparación de las gráficas experimentales de movilidad electroforética vs $p[X]$ ya presentadas en la Figura 4.1 y las de la diferencia de movilidad vs $p[X]$ que se presentan en la Figura 4.3, con las gráficas simuladas descriptas anteriormente (Figura 4.2).

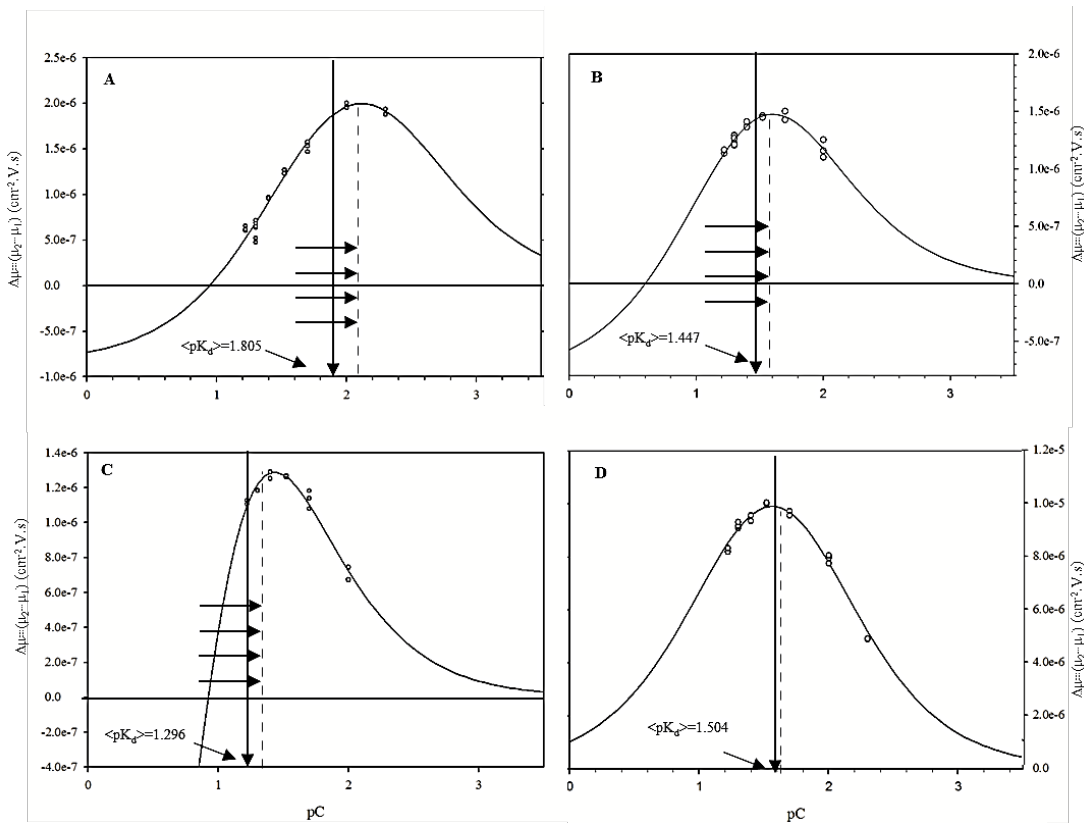


Figura 4.3. Gráfico de las diferencias de movilidad entre dos formas enantioméricas en función de $p[X]$. Los símbolos representan los valores experimentales y la línea sólida la regresión no lineal. A: Propranolol, B: Pindolol, C: Oxprenolol, D: Metilbromuro de homatropina.

El análisis comparativo indica que la enantioseparación para el caso de propranolol, pindolol y oxprenolol se encuentra controlada termo-hidrodinámicamente, dado que en los tres gráficos, la curva $\Delta\mu_e$ vs $p[X]$ se encuentra centrada en un valor de $p[X]$ notoriamente desplazado, en mayor o menor medida, con respecto al valor $\langle pK_{d,AX} \rangle$. Adicionalmente se puede observar que existe una inversión en el orden de elución de los enantiómeros a determinados valores de $p[X]$. Todas estas características indican que correspondería a la situación representada en el gráfico D-II de la Figura 4.2.

A diferencia de los tres analitos antes mencionados, para el metilbromuro de homatropina la curva $\Delta\mu_e$ vs $p[X]$ presenta forma de campana Gaussiana centrada en un valor de $p[X]$ mínimamente desplazado con respecto al valor promedio de $pK_{d,AX}$, mostrando similitud con el gráfico AII representado en la Figura 4.2 y pudiendo concluir que correspondería a una enantioseparación cuya fuerza impulsora se debe exclusivamente a la diferencia entre las constantes de asociación analito-ligando de cada enantiómero; en otras palabras, se puede decir que la enantioseparación se encuentra controlada termodinámicamente. Este caso particular de separación, permite establecer que la misma podría ser llevada a cabo mediante alguna técnica cromatográfica, dado que la movilidad electroforética no representa contribución alguna a la separación.

4.2 OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SELECTOR QUIRAL

Como se mencionó en la Introducción de la presente tesis, es posible optimizar una variable continua, en este caso, la concentración de selector quiral, $[X]$, empleando un criterio o parámetro que proporcione una estimación de cuán buena es la separación, como el parámetro t' . Con el objetivo de minimizar el número de experimentos a realizar, es importante disponer del modelo teórico previamente descrito para calcular dicho parámetro en un amplio rango de valores de la variable a optimizar. De esta forma, resulta sencillo componer el parámetro de optimización t' . En este caso particular, es posible realizarlo empleando las ecuaciones [4.5] o [4.8], para lo cual es necesario emplear las movilidades electroforéticas del analito libre y asociado, como también las constantes de asociación de cada enantiómero con el selector quiral obtenidas y presentadas en la Tabla 4.2.

En la Figura 4.4 se presentan las movilidades electroforéticas teóricas de cada enantiómero en función de $p[X]$, calculadas con el modelo descrito anteriormente. Para cada analito racémico se empleó el mismo color con líneas sólidas y líneas punteadas con el objetivo de facilitar la visualización del comportamiento individual de cada enantiómero.

Las movilidades predichas con la ecuación [4.5] y [4.8] se emplearon a su vez para componer el parámetro t' como función de $p[X]$ (ecuación [1.16]) para todos los pares posibles, considerando los 8 analitos (las dos formas enantioméricas de los cuatro analitos modelo), es decir, un total de 28 pares posibles.

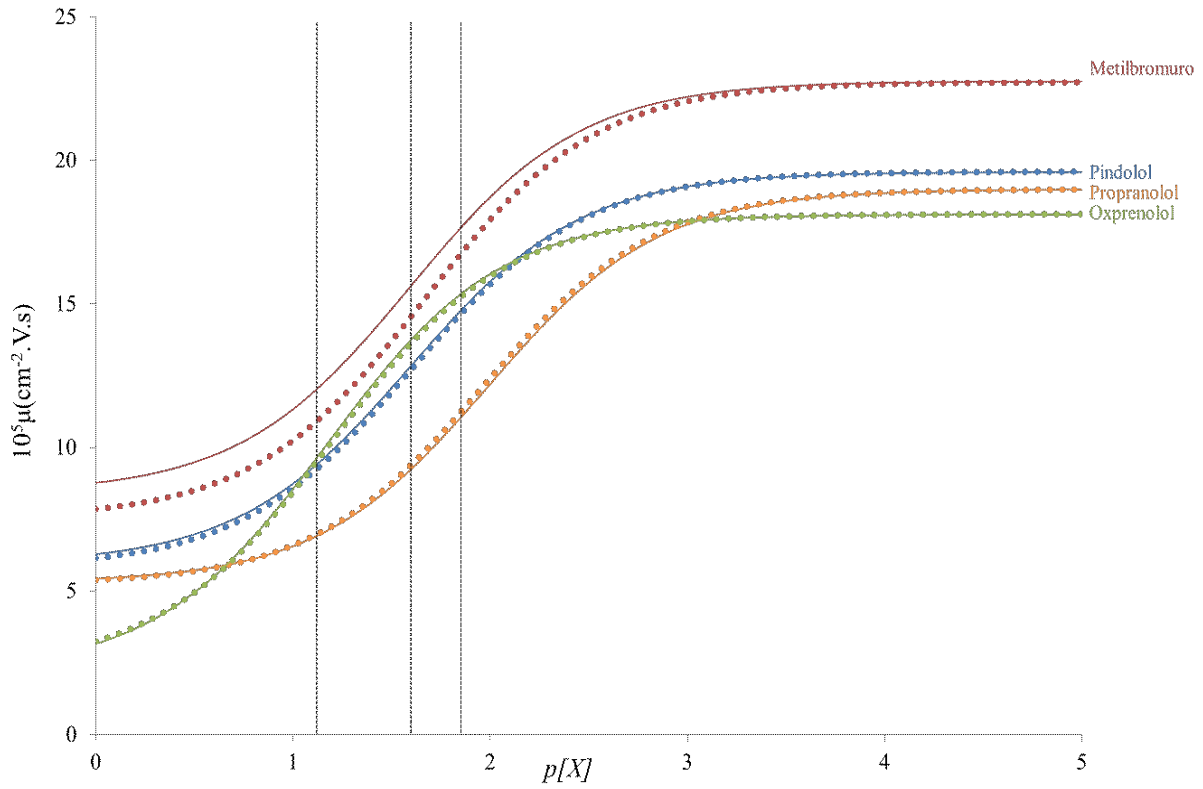


Figura 4.4. Gráfico de las movilidades electroforéticas teóricas para ambos enantiómeros de cada analito modelo en función de $p[X]$. Las líneas punteadas verticales indican los valores de $p[X]$ estudiados experimentalmente.

En la Figura 4.5 se presenta el **gráfico de ventana**, construido mediante la superposición de cada una de las curvas de t'_{ij} .

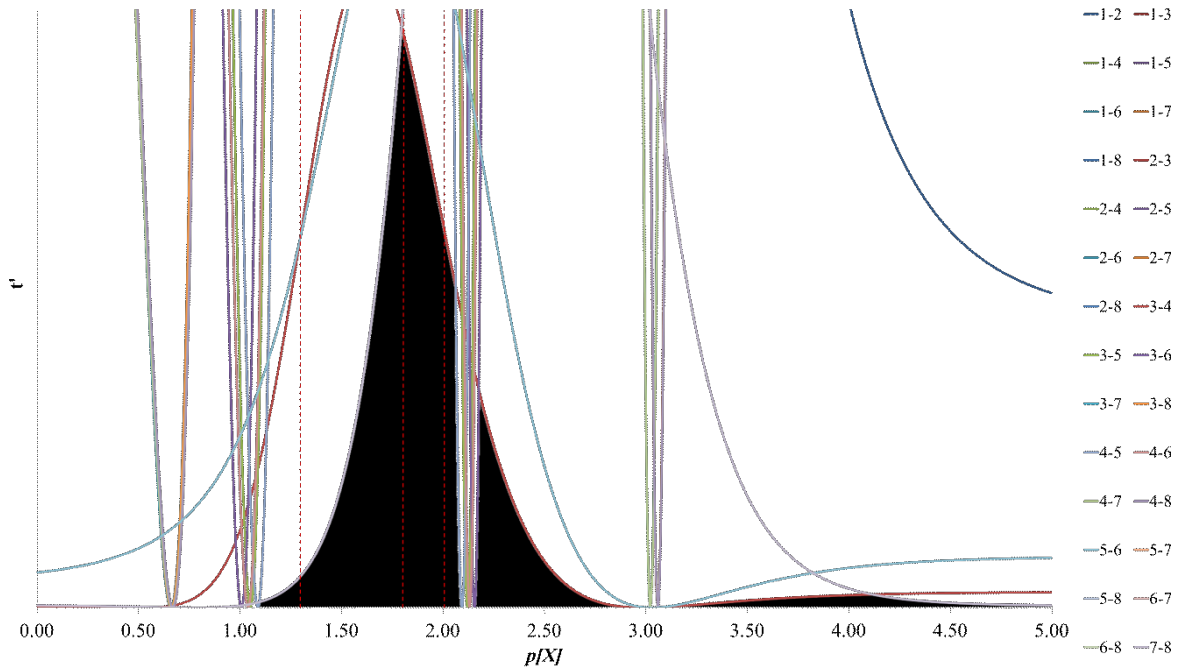


Figura 4.5. Gráficos del parámetro t'_{ij} para cada analito modelo en función de $p[X]$ para los enantiómeros de (1,2) metilbromuro de homatropina, (3,4) oxprenolol, (5,6) pindolol y (7,8) propranolol. Las líneas punteadas verticales indican los valores de $p[X]$ estudiados experimentalmente.

Si bien el gráfico puede resultar confuso debido al elevado número de curvas, solo es importante prestar atención a aquellas en las que t'_{ij} presentan menor valor, las cuales corresponden al par de analitos crítico para cada condición de $p[X]$. Estas curvas delimitan áreas que pueden pintarse en blanco (zona superior) o negro (zona inferior). Estas últimas son conocidas como “ventanas” y en el gráfico pueden visualizarse dos: una de ellas en el rango de $p[X]$ que va desde 1.05 a 2.85 ($[X] = 1.4 - 89.0$ mM) y se encuentra delimitada por los enantiómeros del propranolol (t'_{78}) y oxprenolol (t'_{34}), al mismo tiempo que se observan dos interrupciones agudas que llegan a un valor de $t'=0$ a $p[X] \approx 2.10$ y 2.20 , y corresponden a la inversión en el orden de migración de cada uno de los enantiómeros de los analitos pindolol y oxprenolol; hecho que puede ser observado también en la Figura 4.4 alrededor de los valores de $p[X]$ mencionados. Es decir, que estas interrupciones agudas de la Figura 4.5 no son dos sino una superposición de cuatro curvas de t'_{ij} . La segunda ventana se ubica en el rango de $p[X]$ que va desde 3.05 a 5.00 ($[X] = 0.01 - 0.89$ mM). Sin embargo el parámetro t'_{ij} es más grande en el máximo de la primera ventana en un valor de $p[X] = 1.75$ ($[X] = 17.78$ mM). Este valor, que denominaremos $p[X]_{opt}$, corresponde a la

concentración de selector quiral que proporciona la mejor separación para todos los analitos de acuerdo a este procedimiento.

Alternativamente, las movilidades calculadas pueden emplearse para obtener el valor de $p[X]_{opt}$ mediante la composición de la **función escalar multicomponente T'** para todo el rango de $p[X]$ (ecuación [1.17]). El gráfico correspondiente se presenta en la Figura 4.6, en el cual se indica el valor de $p[X]_{opt}$ que es igual a 1.75.

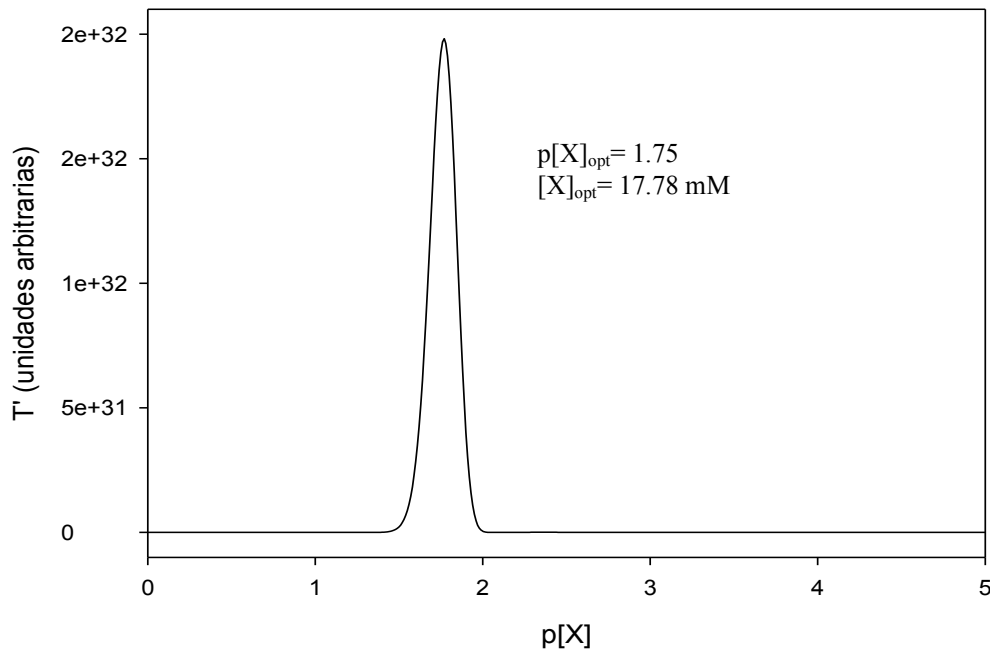


Figura 4.6. Gráfico de la función escalar T' para todo el rango de $p[X]$, predicha para la separación simultánea de los cuatro pares de enantiómeros seleccionados como analitos modelo.

Dado que la aplicación de la estrategia de construir un gráfico de ventanas se enfoca en encontrar el par crítico, y la estrategia de componer la función escalar T' se enfoca en una evaluación de la calidad de la separación entre todos los picos; los valores de $p[X]_{opt}$ obtenidos por ambos procedimientos podrían diferir levemente. No obstante, en el presente caso el resultado es altamente satisfactorio, pues coinciden perfectamente.

En la Figura 4.7A se presenta el electroferograma obtenido al separar química y enantioméricamente la solución estándar conteniendo los cuatro pares de enantiómeros empleando el BGE con la concentración óptima de 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina. En la misma se puede observar que no todos los pares se encuentran separados a la línea de base, sin embargo la resolución general puede considerarse satisfactoria y, de acuerdo con el modelo, es la mejor posible en términos de la concentración de selector quiral.

Las condiciones experimentales de separación fueron las siguientes: capilar de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno, de 60 cm de longitud total y con ventana de detección ubicada a 51 cm respecto de la entrada del capilar, termostaticado a 25°C. La inyección de los analitos se realizó hidrodinámicamente por aplicación de 30 mbar de presión durante 2 segundos. El análisis se realizó aplicando un potencial de 25 kV y la detección UV se fijó en 214 nm.

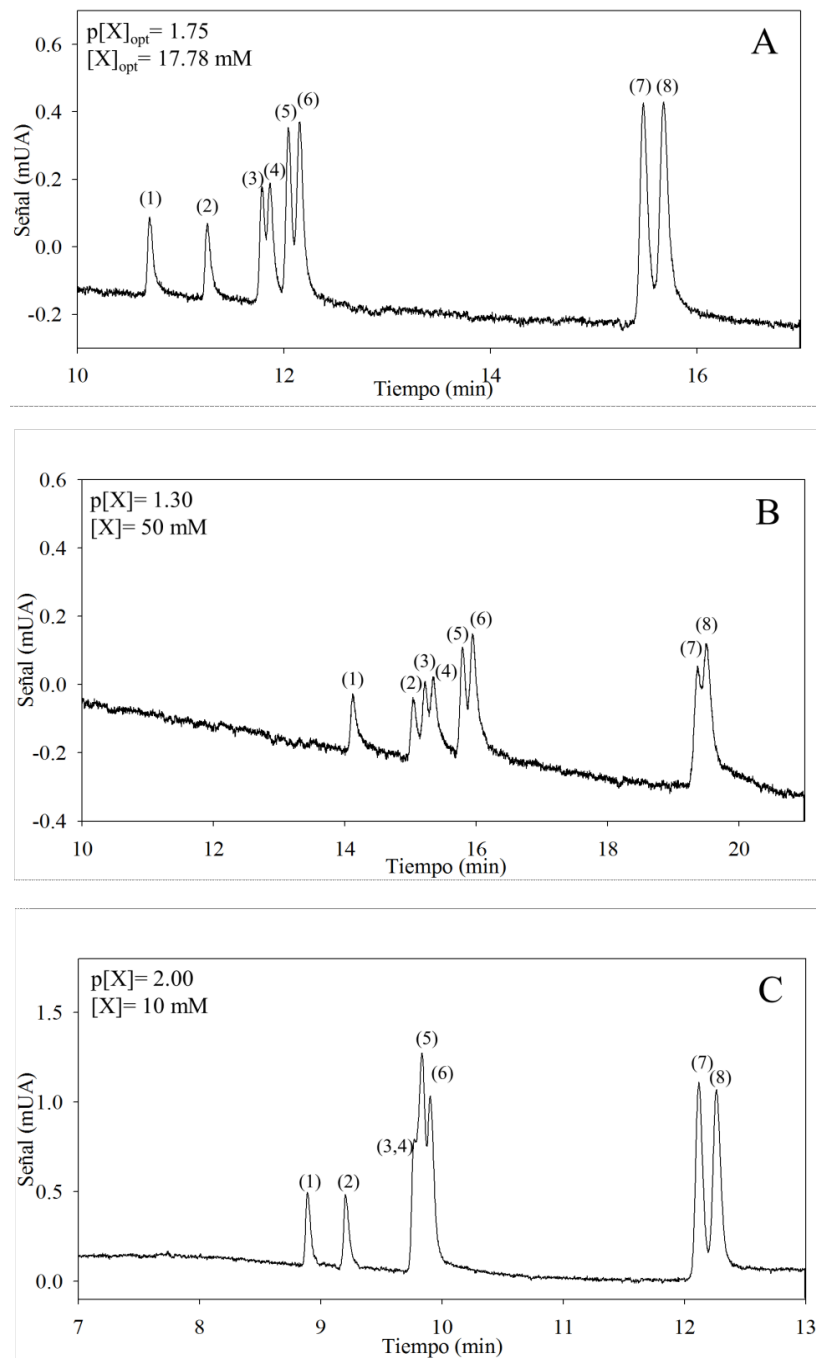


Figura 4.7. Electroferogramas de una mezcla racémica de (1,2) metilbromuro de homatropina, (3,4) oxprenolol, (5,6) pindolol y (7,8) propranolol. Temperatura: 25 °C; voltaje 25 kV; capilar: 50 μ m i.d., 60 cm longitud total, 50 cm longitud al detector; detección UV a 214 nm; inyección hidrodinámica 30 mbar durante 2 segundos. Buffer 100 mM H_3PO_4/NaH_2PO_4 , pH = 2.5. A) $p[X]_{opt} = 1.75$ ([2-HP- β -CD] = 17.78 mM), B) $p[X] = 1.30$ ([2-HP- β -CD] = 50.00 mM), C) $p[X] = 2.00$ ([2-HP- β -CD] = 10.00 mM).

Con el fin de verificar experimentalmente si la concentración de selector quiral encontrada con ambos procedimientos es realmente la óptima para el sistema propuesto, se realizaron una serie de análisis de una solución conteniendo todos los analitos empleando dos BGE: uno conteniendo una concentración de selector quiral inferior y otro una concentración de selector quiral superior a la óptima. Las condiciones experimentales fueron las mismas que en el análisis anterior.

Inicialmente se preparó un BGE conteniendo 2-HP- β -CD en una concentración 50 mM ($p[X] = 1.30$, $p[X] < p[X]_{opt}$), y el electroferograma obtenido se muestra en la Figura 4.7B. Una interpretación integral de los resultados se puede realizar en vista de los comportamientos mostrados en las Figuras 4.4 y 4.5, en las que el valor de $p[X] = 1.30$ fue intencionalmente indicado con líneas verticales punteadas. En dicho electroferograma, se puede observar claramente que la separación es peor que aquella obtenida a $p[X]_{opt}$. El par crítico (aquel con menor resolución) está compuesto por los picos identificados con los números 7 y 8, que son aquellos, que poseen mayores tiempos de migración y corresponden a los enantiómeros del propranolol. Este hecho es consistente con el gráfico de ventanas de la Figura 4.5, en la que se puede observar que el lado izquierdo de la ventana de mayor altura está limitada por el valor de t' de estos enantiómeros, y también con la Figura 4.4, en la que puede observarse que a $p[X] = 1.30$ la menor diferencia de movilidades corresponde también al par con menores movilidades.

También se preparó un BGE conteniendo 2-HP- β -CD en una concentración 10 mM ($p[X] = 2.00$, $p[X] > p[X]_{opt}$), y el electroferograma obtenido se muestra en la Figura 4.7C. Nuevamente resulta claro que la separación es peor que la de la Figura 4.7A obtenida a $p[X]_{opt}$. El electroferograma de la Figura 4.7C muestra que los picos 3-6 están fuertemente solapados, y no es totalmente claro cuál es el par crítico, aunque la línea divisoria de la ventana de mayor altura del gráfico de ventana de la Figura 4.5 a $p[X] = 2.00$ indica que el par crítico es el 3-4, que corresponde a los enantiómeros del oxprenolol.

4.3 FABRICACIÓN DE COLUMNAS CAPILARES PARTICULADAS

4.3.1 Preparación de frits

Si bien ya existía un trabajo previo desarrollado en el laboratorio para la preparación de frits por sinterizado térmico de partículas de sílice contenidas en el extremo de un capilar mediante exposición frontal a la temperatura, con el cual es posible obtener frits con excelentes características tanto de resistencia mecánica como buena eficiencia cromatográfica; el mismo emplea un aislante térmico externo de yeso que debe perforarse y muchas veces ser rellenado para compensar la diferencia de tamaño entre el orificio generado y la dimensión del capilar. Además, la vida útil de estas piezas aislantes es muy limitada dado que se disgregan fácilmente con los cambios bruscos de temperatura, por lo que deben reemplazarse con una elevada frecuencia.

En el presente trabajo de tesis, y como mejora al método antes mencionado, se abordó el desarrollo de una pieza aislante reutilizable. Para dicho fin se empleó como material arcilla gres de alta temperatura (1200°C), la cual fue tamizada empleando un tamiz mesh 140 con el fin de tener la menor cantidad de rugosidades que pueden resultar en el daño o remoción del recubrimiento de poliimida que presenta el capilar. Una característica particular de la arcilla, es que durante el secado y cocción, el tamaño de las piezas disminuye como consecuencia de la pérdida de agua, así como también por la fusión de los componentes plásticos que ocupan los espacios libres entre los componentes refractarios de la arcilla. Como resultado, dicha contracción debe ser tenida en cuenta para determinar el tamaño justo del orificio a realizar para que el capilar pueda introducirse dentro del mismo una vez finalizada la cocción de la pieza aislante.

Para cuantificar la contracción, se realizaron piezas cilíndricas con material preparado con diferentes cantidades de arcilla y agua, empleando como molde una jeringa descartable de 10 mL (1.965 cm de diámetro interno). A las piezas resultantes se las dejó secar durante un día y se les midió el diámetro con calibre, luego se procedió a su cocción realizando el calentamiento de forma paulatina, como se muestra en la figura 4.8, evitando cambios de temperatura superiores a 5°C/min para evitar que el cambio térmico dañe las piezas.

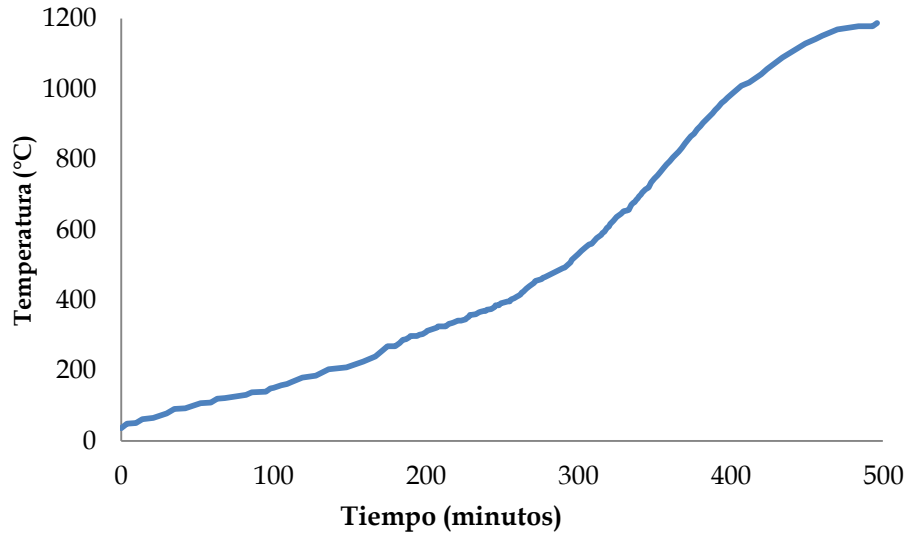


Figura 4.8. Rampa de temperatura para la cocción de las piezas aislantes de arcilla.

A continuación se apagó la mufla y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente (aproximadamente 18 horas) para finalmente tomar la medida final del diámetro de las piezas, necesaria para calcular el porcentaje de contracción. Esta información se presenta en la tabla 4.3.

Tabla 4.3. Porcentaje de contracción en el diámetro de las piezas cilíndricas, preparadas con diferentes composiciones de arcilla gres y agua.

	Pieza 1	Pieza 2	Pieza 3	Pieza 4	Pieza 5	Pieza 6
Masa de arcilla (g)	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1	21.1
Masa de agua (g)	7.20	6.85	6.60	6.30	6.15	6.00
% p/p arcilla	74.6	75.5	76.2	77.0	77.4	77.9
Diámetro Húmeda (cm)	1.965	1.965	1.965	1.965	1.965	1.965
Diámetro Seca (cm)	1.350	1.354	1.370	1.372	1.375	1.378
Diámetro Cocida (cm)	1.230	1.250	1.255	1.250	1.260	1.260
% Contracción Húmeda-Cocida	37.4	36.4	36.1	36.4	35.9	35.9
% Contracción Seca-Cocida	8.9	7.7	8.4	8.9	8.4	8.6

Se pudo concluir que en promedio, las piezas de arcilla se contraen un 36.3% durante el proceso total (secado y cocido) y un 8.5% en el de la cocción propiamente dicha, de modo que para lograr un orificio final del mismo diámetro que el diámetro externo del capilar (375 μm) es necesario realizar en húmedo un orificio de 589 μm o de 410 μm en seco.

Para realizar el orificio, se disponía de alambres con diámetros 350, 450 y 600 μm . Inicialmente se empleó el alambre de 350 μm como mecha de un minitorno para perforar las piezas en seco. No obstante, el capilar no lograba atravesar toda la pieza cilíndrica de lado a lado. El procedimiento se repitió empleando el alambre de 450 μm , pero el orificio resultó demasiado grande. Una alternativa fue emplear el alambre de 600 μm e introducirlo y retirarlo de la pieza húmeda, aunque el resultado fue el mismo que con el alambre de 450 μm .

Finalmente, se optó por emplear minas de grafito comerciales que poseen un diámetro de 550 μm y presentan la ventaja de poder gastarse fácilmente y obtener de este modo diferentes diámetros. De los ensayos realizados el que otorgó buenos resultados fue el de gastar cónicamente la mina de grafito hasta un diámetro de 410 μm en el extremo, introducirla casi hasta el final de la pieza de arcilla en húmedo, permitir su secado y luego gastar toda la pieza hasta exponer el extremo de la mina de grafito para finalmente realizar la cocción (sin retirar la mina), siguiendo el perfil de temperatura ya descrito en la figura 4.8 durante el cual el grafito combustiona completamente sin dejar residuos. En la figura 4.9 se presentan fotografías de la pieza de arcilla.



Figura 4.9. Fotografía de la pieza de arcilla gres de alta temperatura. (a) Ensayos iniciales, orificio de diámetro mayor que el diámetro externo del capilar (375 μm). (b) Pieza de arcilla final, orificio de igual diámetro que el externo del capilar.

Con respecto al método desarrollado por Keunchkarian y colaboradores[8], otra diferencia es que las condiciones de sinterizado fueron seleccionadas para generar frits en capilares de 50 μm de diámetro interno, mientras que en el presente trabajo los capilares empleados fueron de 100 μm de diámetro interno, motivo por el cual debieron ensayarse diferentes condiciones para encontrar la más adecuada. En primer lugar se seleccionó la temperatura, para esto se elaboraron frits ensayando tres condiciones de temperatura de sinterizado (640, 680, 720 μm) y dos tiempos de exposición (20 y 120 segundos) y se evaluó si los mismos soportaban diferencias de presión de entre 50 y 60 bares durante el lavado; considerando “frits exitosos” a aquellos que resistían tales presiones. La información recabada se muestra en la figura 4.10.

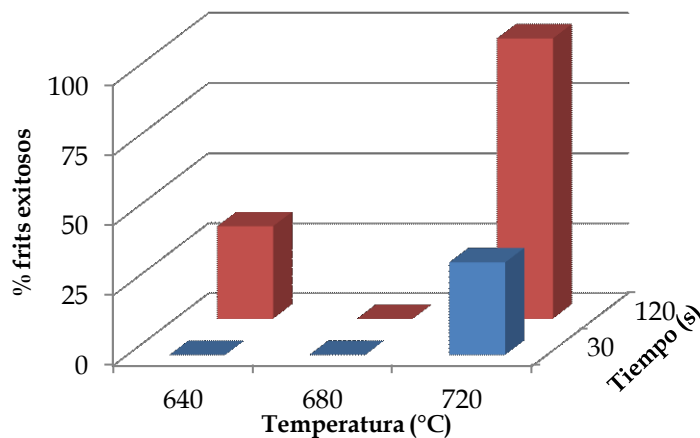


Figura 4.10. Resultado de los ensayos de tres temperaturas de sinterizado a dos tiempos de exposición diferentes, para preparar frits en capilares de 100 μm de diámetro interno.

A partir de los resultados observados, se opta por trabajar a 720 °C y se ensayan a dicha temperatura, condiciones intermedias de tiempo (30, 60, 90 120 segundos) para seleccionar la más adecuada. En la figura 4.11 se representa el porcentaje de frits exitosos para cada tiempo de exposición, donde puede observarse un 100% de éxitos para 60 y 120 segundos de sinterizado. Se concluye que es conveniente emplear el menor tiempo, no solo porque así se optimiza el proceso, sino porque también de esta forma el recubrimiento de poliimida permanece inalterado, mientras que con 120 segundos de exposición comienza a ennegrecerse y el capilar se vuelve más frágil.

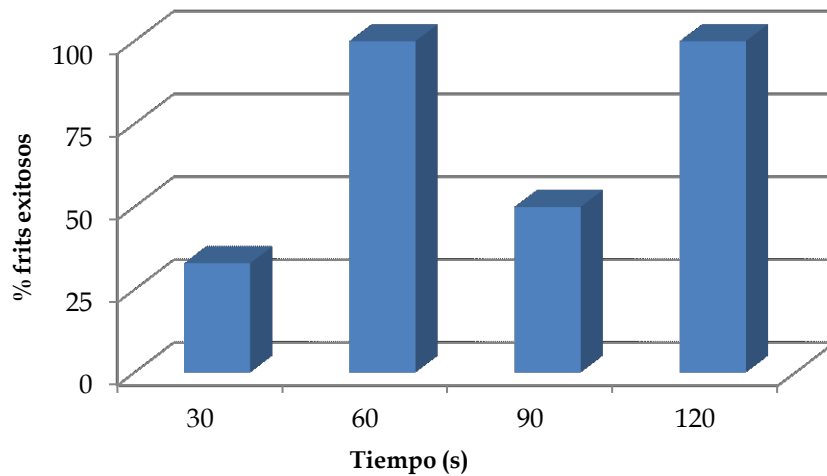


Figura 4.11. Ensayos de sinterizado a 720°C y a dos tiempos de exposición diferentes, para preparar frits en capilares de 100 μm de diámetro interno.

4.3.2 Llenado con el material particulado

Llenado por fuerza centrífuga

Las variables experimentales evaluadas en el método de llenado por fuerza centrífuga fueron el tipo de solvente de la suspensión de partículas y velocidad de centrifugación. Inicialmente se empleó metanol como solvente de la suspensión de las partículas y se aplicaron velocidades de rotación entre 1000 y 2500 rpm. De estos ensayos, se concluyó que una velocidad de 2000 rpm tiene como resultado lechos más largos. Manteniendo la velocidad de centrifugación en 2000 rpm durante 5 minutos, se evaluó usar isopropanol y acetona como solventes de la suspensión de partículas. Como resultado de estos ensayos, se continuó empleando acetona, dado que con este solvente se obtuvieron mayores longitudes del lecho relleno.

La máxima longitud del lecho relleno alcanzada (8 mm) se obtuvo luego de cinco repeticiones del proceso de centrifugación. En la Figura 4.12 se presenta una imagen de la columna obtenida, amplificada mediante binoculares.

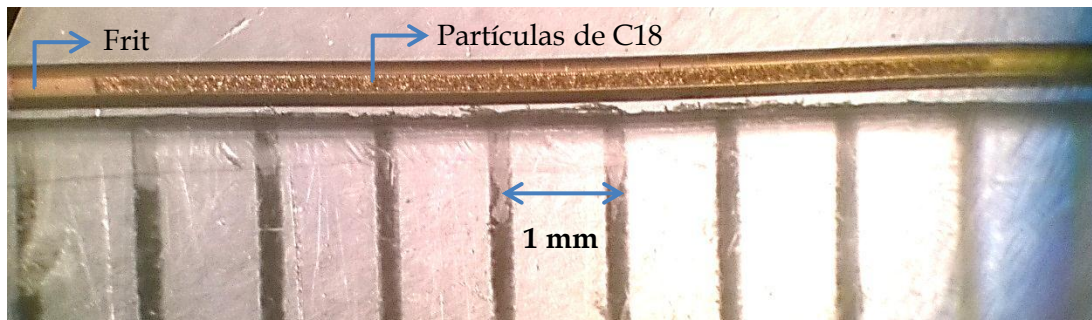


Figura 4.12. Fotografía de un capilar de 100 μm de diámetro interno con frit terminal, llenado mediante fuerza centrífuga con partículas de octadecilsilíce de 3,5 μm de diámetro.

Llenado por gravedad

Al igual que en el llenado por fuerzas centrífugas, se evaluó el uso de metanol, isopropanol y acetona como solvente de la suspensión de partículas. Por un lado, en los ensayos con metanol, no se observó el ingreso de las partículas al lumen del capilar; mientras que al emplear isopropanol, sí se observó el ingreso de partículas al interior del capilar, aunque las mismas no descendían hasta alcanzar el frit terminal y se observaron espacios vacíos. Por otro lado, la acetona resultó el solvente más adecuado ya que se obtuvo un lecho de partículas homogéneo, sin huecos visibles de 8 cm que es la longitud mínima necesaria para poder ser utilizada en el cassette del equipo. No obstante este método no resultó reproducible, dado que solo fue posible rellenar una única columna.

Esta columna se instaló en el cassette y luego de acondicionarla con BGE se procedió a aplicar voltaje (fritless). Sin embargo, a pesar de colocarla de manera vertical se generaron huecos y se descompactó la única columna lograda. Como consecuencia, se confirmó la necesidad de utilizar el segundo frit para retener el relleno.

Llenado por impulso con solvente a alta presión

Las columnas se llenaron empleando inicialmente una suspensión de partículas de concentración 30 mg mL^{-1} empleando metanol como solvente. El capilar se llenó inicialmente con isopropanol y a continuación se cargó el reservorio con 750 μL de la

suspensión previamente sonicada durante 30 minutos. Seguidamente se aplicó una presión de solvente inicial de 2000 psi hasta observar el inicio del llenado y también la resistencia del frit terminal, luego se aplicaron presiones de solvente más elevadas (8000 psi), hasta alcanzar la longitud de columna deseada. Luego de repetir el proceso tres veces, se alcanzó una longitud de relleno de 10,2 cm.

Al repetir el procedimiento empleando isopropanol como solvente de la suspensión de partículas de concentración 30 mg mL^{-1} , se alcanzó una longitud de lecho relleno de 18,0 cm sin necesidad de repetir el proceso; motivo por el cual se seleccionó al isopropanol tanto como solvente de la suspensión como solvente para la presurización.

A los tubos capilares rellenos con dicho método, se los cortó a la longitud deseada (8,2 – 8,5 cm) y se les colocó un segundo frit empalmándola con otro tubo capilar con un frit terminal. El empalme se realizó empleando un tubo de PTFE de $300 \mu\text{m}$ de diámetro interno de 2 mm de longitud, sobre el cual se depositó pegamento siliconado para proporcionarle rigidez. Previamente al empalme, se debió realizar la ventana de detección en el segmento de capilar vacío, por remoción del recubrimiento de poliimida del capilar. La misma se trata de ubicar lo más cerca posible del frit, de modo de no adicionar volumen muerto.

De esta forma se concreta la construcción de columnas capilares particuladas, con un lecho relleno homogéneo, compacto y sin huecos aparentes, originalmente elaboradas para su utilización en CEC aunque también aptas para ser operadas en micro-HPLC.

4.4 REFERENCIAS

- [1] S.A. C Wren, Z. Pharmaceuticals, Chiral separation in capillary electrophoresis, *Electrophoresis*. 16 (1995) 2127–2131. doi:<https://doi.org/10.1002/elps.11501601343>.
- [2] V. Solínová, H. Mikysková, M.M. Kaiser, Z. Janeba, V. Kasicka, Hana Mikyskov a Estimation of apparent binding constant of complexes of selected acyclic nucleoside phosphonates with B-cyclodextrin by affinity capillary electrophoresis, *Electrophoresis*. 37 (2016) 239–247. doi:10.1002/elps.201500337.
- [3] S.G. Penn, E.T. Bergstrijm, I. Knights, G. Liu, A. Ruddick, D.M. Goodall, Capillary Electrophoresis as a Method for Determining Binding Constants: Application to the Binding of Cyclodextrins and Nitrophenolates, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 3875–3880. doi:10.1021/j100011a065.
- [4] A. Allmendinger, L.-H. Dieu, S. Fischer, R. Mueller, H.-C. Mahler, J. Huwyler, High-throughput viscosity measurement using capillary electrophoresis instrumentation and its application to protein formulation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 99 (2014) 51–58. doi:10.1016/j.jpba.2014.07.005.
- [5] S.A.C. Wren, R.C. Rowe, Theoretical aspects of chiral separation in capillary electrophoresis: I. Initial evaluation of a model, *J. Chromatogr. A.* 603 (1992) 235–241. doi:10.1016/0021-9673(92)85366-2.
- [6] S.G. Penn, E.T. Bergström, D.M. Goodall, J.S. Loran, Capillary Electrophoresis with Chiral Selectors: Optimization of Separation and Determination of Thermodynamic Parameters for Binding of Tioconazole Enantiomers to Cyclodextrins, *Anal. Chem.* 66 (1994) 2866–2873. doi:10.1021/ac00090a012.
- [7] M. V. Rekharsky, Y. Inoue, Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1875–1918. doi:10.1021/cr970015o.
- [8] S. Keunchkarian, P.J. Lebed, B.B. Sliz, C.B. Castells, L.G. Gagliardi, New method for sintering silica frits for capillary microcolumns, *Anal. Chim. Acta.* 820 (2014) 168–175. doi:10.1016/j.aca.2014.02.022.

Capítulo 5
Conclusiones

Las conclusiones que se pueden extraer de los resultados obtenidos en este trabajo de tesis son las siguientes:

- Se desarrolló un modelo teórico para el estudio de equilibrios de asociación analito/ligando con relación estequiométrica 1:1 (extensible a otras estequiometrias), involucrados en la separación mediante electroforesis capilar. El mismo se aplicó al caso particular de las separaciones enantioméricas empleando como selector quiral 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina, y como analitos modelo cuatro fármacos en su forma racémica: oxprenolol, pindolol, propranolol y metilbromuro de homatropina.
- Empleando como base dicho modelo, se obtuvieron mediante electroforesis capilar, los valores de las constantes termodinámicas de asociación analito/ligando así como también las movilidades electroforéticas de cada analito tanto en sus formas libre como asociada.
- Se propusieron dos contribuciones posibles como fuerza impulsora de las separaciones quirales por electroforesis capilar: La contribución termodinámica, atribuible a diferencias en las constantes de asociación; y la contribución hidrodinámica, atribuible a diferencias en el radio hidrodinámico del complejo de asociación analito/ligando. Como resultado de esto, se estableció que el mecanismo de separación podía ser controlado termodinámica, hidrodinámica o termo-hidrodinámicamente y se propuso una metodología para elucidarlo, describiendo detalladamente todos los comportamientos posibles de las movilidades electroforéticas y las diferencias de movilidades como una función de la concentración del selector quiral.
- Se aplicó la metodología propuesta a la elucidación del mecanismo de separación entre el selector quiral y los analitos modelos mencionados anteriormente, permitiendo concluir que para los analitos en los que la separación está controlada termodinámicamente es conveniente realizarla por algún método cromatográfico, dado que la movilidad electroforética no representa contribución alguna la separación.

- Se desarrolló un método predictivo para optimizar la concentración de ligando en separaciones por electroforesis capilar, explicando dos estrategias alternativas para conseguirlo: Una estrategia gráfica basada en la construcción de gráficos de ventana y otra analítica basada en la maximización matemática de una función de optimización multicriterio. Se demostró el potencial de dichos procedimientos aplicándolos a la optimización de la concentración de selector quiral para la separación simultánea de los cuatro analitos racémicos seleccionados como modelo y se confirmó su validez por evaluación de la separación, empleando concentraciones por encima y por debajo de aquella hallada como óptima.
- Se desarrolló un dispositivo de arcilla de gres de alta temperatura reutilizable para su utilización en la preparación de frits por sinterizado térmico de partículas de sílice mediante exposición térmica frontal. El mismo es fundamental para exponer al calor el frente del capilar manteniendo aisladas sus paredes y obtener robustez en la preparación de los frits.
- Se optimizaron las condiciones de sinterizado de frits terminales para su fabricación en capilares de 100 μm de diámetro interno, por exposición frontal de partículas de sílice de 5 μm de diámetro.
- Se evaluaron diversos métodos de llenado de capilares con partículas: llenado por fuerzas centrífugas, llenado por gravedad y llenado por impulso con solvente a elevada presión.
 - Para el llenado con fuerzas centrífugas, se diseñó un dispositivo para poder llevarlo a la práctica. Se evaluaron diferentes solventes para la preparación de la suspensión de partículas y diferentes velocidades de centrifugación; no obstante se obtuvieron lechos de longitudes insuficientes para su instalación en el equipo de electroforesis capilar.

- Para el llenado por gravedad, se montó un sistema replicando el reportado en bibliografía. Se evaluaron diferentes solventes para la preparación de la suspensión de partículas. Mediante este método de llenado, se alcanzó por única vez un lecho de partículas homogéneo, sin huecos visibles con la mínima longitud necesaria para poder ser utilizada en el cassette del equipo.
- Se evaluó la utilización de la columna rellena mediante gravedad en el modo fritless. Sin embargo, pese a colocarse de manera vertical, al aplicar voltaje se generaron huecos y se descompactó la única columna lograda. Como consecuencia, se confirmó la necesidad de utilizar el segundo frit para retener el relleno.
- Se adaptaron las conexiones de un sistema de llenado de columnas convencionales de HPLC por impulso con solvente a alta presión para poder emplearlo en el llenado de columnas capilares particuladas. Se emplearon diferentes solventes en la preparación de la suspensión de partículas, resultando más adecuado el isopropanol. Con este método resultó posible alcanzar en forma repetida, longitudes de lecho relleno que superan ampliamente la longitud mínima para instalarlo en el cassette del equipo de electroforesis capilar.

