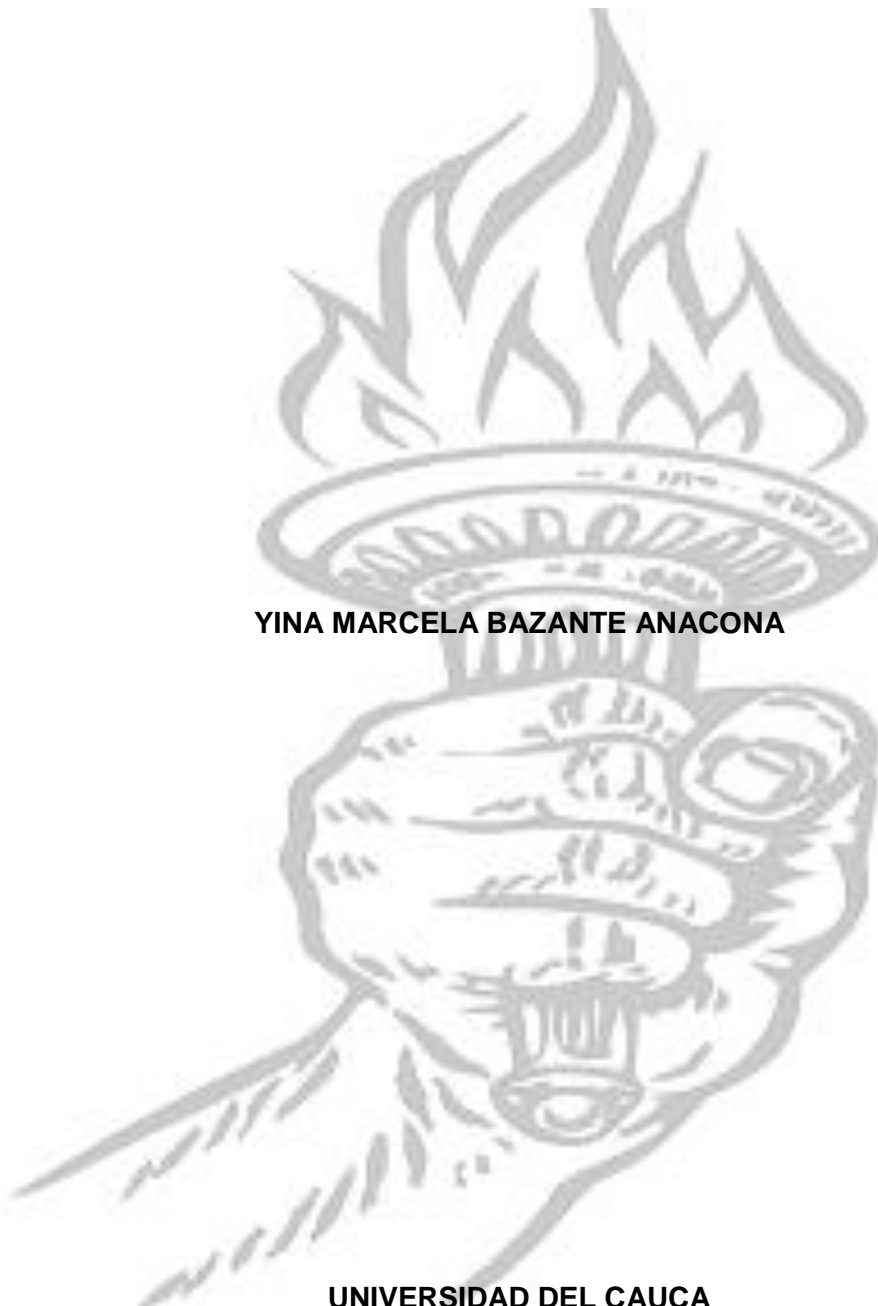


**DERIVATIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS LINEALES COMO FASES
ESTACIONARIAS QUIRALES**



YINA MARCELA BAZANTE ANACONA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2017**

**DERIVATIZACIÓN DE CARBOHIDRATOS LINEALES COMO FASES
ESTACIONARIAS QUIRALES**

Trabajo de Grado presentado como
requisito parcial para optar al título de Químico

YINA MARCELA BAZANTE ANACONA

Director:

ALFONSO ENRIQUE RAMÍREZ SANABRIA, Ph.D.
Grupo de Investigación en Catálisis

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2017**

Nota de Aceptación

Director _____
Ph.D. Alfonso Enrique Ramírez S.

Jurado _____

Jurado _____

Popayán, X de Septiembre de 2017 (Fecha de sustentación)

AGRADECIMIENTOS

El autor manifiesta sus agradecimientos a:

El profesor Alfonso E. Ramírez, director de trabajo de grado, por su gran apoyo y dedicación.

El profesor Daniel W. Armstrong, por el espacio y la oportunidad brindada en su laboratorio de investigación.

Diego A. López, Ingeniero científico de investigación de la empresa AZYP por su colaboración y acompañamiento a lo largo del proceso.

Al departamento de química de la Universidad del Cauca, por el espacio y la dedicación durante mi carrera profesional.

A todos los profesores del departamento de química y a aquellos que fueron parte de mi formación académica.

Al profesor Luis Alfonso Vargas, por sus valiosos aportes.

La Universidad de Texas en Arlington, por sus recursos, espacio y aceptación.

Mi familia, amigos y a mi novio Juan José, por su gran apoyo y colaboración durante toda esta experiencia.

CONTENIDO

	Pag.
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABLAS.....	9
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	10
LISTA DE ECUACIONES.....	11
RESUMEN.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. MARCO TEORICO.....	15
3.1. QUIRALIDAD Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	15
3.2. SEPARACIONES QUIRALES.....	17
3.3. HPLC COMO TÉCNICA DE SEPARACIÓN QUIRAL.....	18
3.3.1. Fases estacionarias quirales.....	19
3.3.2. Fases estacionarias quirales a base de polisacáridos.....	23
3.3.3. Grupos fenilcarbamato como derivatizantes y selectores quirales en FEQs a base de polisacáridos.....	24
4. METODOLOGÍA.....	27
4.1. Síntesis de FEQs-DFC a base de polisacáridos enlazadas y depositadas sobre APS.....	27
4.1.1. Preparación de 3-aminopropil sílica gel (APS).....	27
4.1.2. Método 1: FEQs-DFC enlazadas a APS en la posición 6.....	27
4.1.3. Método 2: Fases estacionarias depositadas sobre APS.....	28
4.2. Síntesis de FEQs-DFC a base del OL, enlazadas y depositadas sobre APS.....	29

4.3. Empacado de columnas.....	30
4.4. Enantioseparación de mezclas racémicas por HPLC.....	30
4.5. Caracterización de las fases estacionarias sintetizadas.....	31
4.5.1. Espectroscopia FT-IR.	31
4.5.2. Análisis elemental.....	31
4.5.3. Difracción de rayos X.....	31
4.5.4. Análisis termogravimétrico.....	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
5.1. Fases estacionarias a base de celulosa, almidón soluble y maltodextrina.....	33
5.1.1. Derivatización e inmovilización de los carbohidratos.....	33
5.1.2. Resolución de las mezclas racémicas en las fases estacionarias.....	41
5.2. Fases estacionarias a base del OL.....	44
5.2.1. Obtención del OL.....	45
5.2.2. Derivatización e inmovilización del OL.....	47
5.2.3. Resolución de las mezclas racémicas en las fases OL-DFC.....	53
5.2.4. Caracterización de la columna cromatográfica.....	58
6. CONCLUSIONES.....	62
7. ESTUDIOS FUTUROS.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	65

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Estructura estereoquímica de la Talidomida.	15
Figura 2. Ejemplo del modelo de tres puntos de interacción.	18
Figura 3. Fases estacionarias quirales típicas para HPLC.	19
Figura 4. Posibles interacciones entre el centro quiral y el analito.	20
Figura 5. Estructuras de celulosa, amilosa y dextrano.	23
Figura 6. Tipos de sustituyentes sobre el fenilcarbamato como selector quiral en fases estacionarias quirales a base de polisacáridos.	24
Figura 7. Estructuras de los derivados fenilcarbamato de a) celulosa y b) amilosa.	25
Figura 8. Posibles sitios de interacción de polisacáridos trifenilcarbamatos.	26
Figura 9. Esquema de la síntesis de las fases estacionarias por el método 1.	34
Figura 10. Esquema de la síntesis de las fases estacionarias por el método 2.	35
Figura 11. Espectros IR de a) celulosa, b) maltodextrina y c) almidón soluble.	36
Figura 12. Espectros IR de a) celulosa, b) maltodextrina y c) almidón soluble derivatizados.	36
Figura 13. Estructura del carbohidrato intermediario DFC con el hidroxilo en la posición 6 libre (método 1).	38
Figura 14. Comportamiento térmico de APS y las fases C-DFC, AS-DFC y M-DFC.	39
Figura 15. Estructura helicoidal de la amilosa.	44
Figura 16. Ilustración de la composición de maltodextrinas y sus enlaces α -glucopiranosídicos.	45
Figura 17. Esquema de la reacción enzimática para la obtención de oligosacáridos lineales a partir de maltodextrina.	46
Figura 18. Oligosacárido obtenido de la reacción entre maltodextrina y la enzima <i>pululanasa</i> .	47

Figura 19. Espectros IR del a) OL y del b) OL derivatizado.	48
Figura 20. Difractogramas de a) maltodextrina, b) OL y c) OL derivatizado.	49
Figura 21. Espectros IR de a) APS y b) OL-DFC.	51
Figura 22. Comportamiento térmico de APS y las fases OL-DFC3, OL-DFC4.	52
Figura 23. Resolución de a) TSO, b) TGB en y c) benzoína sobre OL-DFC4.	56

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Actividades biológicas de algunos compuestos isómeros.	16
Tabla 2. Tipos de selectores quirales y clasificación de fases estacionarias.	22
Tabla 3. Fases estacionarias sintetizadas con el uso de diferentes carbohidratos.	28
Tabla 4. Variaciones en la síntesis de las fases estacionarias a base del OL y fases obtenidas.	29
Tabla 5. Nombres y estructuras de las mezclas racémicas.	31
Tabla 6. Análisis elemental de celulosa, almidón soluble, maltodextrina y APS.	38
Tabla 7. Análisis elemental de sílica gel y APS	39
Tabla 8. Datos obtenidos del análisis termogravimétrico de las fases estacionarias C-DFC, M-DFC, AS-DFC y APS.	41
Tabla 9. Habilidad de reconocimiento quiral de Chiralpak IB, C-DFC, AS-DFC y M-DFC para TSO.	42
Tabla 10. Condiciones de la reacción de la <i>pululanasa</i> y rendimiento.	47
Tabla 11. Datos obtenidos del análisis termogravimétrico de las fases estacionarias a base del OL y APS.	52
Tabla 12. Habilidad de reconocimiento quiral de Chiralpak IB, OL-DFC1, OL-DFC2 para TSO.	53
Tabla 13. Habilidad de reconocimiento quiral de Chiralpak IB, OL-DFC3 para TSO, TGB y benzoína.	54
Tabla 14. Habilidad de reconocimiento quiral de Chiralpak IB, OL-DFC4 para TSO, TGB y benzoína.	55
Tabla 15. Tiempo muerto y tiempos de retención de TSO, TGB y benzoína sobre OL-DFC4 y Chiralpak IB.	59
Tabla 16. Parámetros de separación enantiomérica de TSO, TGB y benzoína sobre OL-DFC4 y Chiralpak IB.	59
Tabla 17. Áreas y porcentajes de área de los picos cromatográficos de TSO, TGB y benzoína sobre OL-DFC4.	60

LISTA DE ACRÓNIMOS

%T	Porcentaje de transmitancia
APS	3-Aminopropil sílica gel
AS-DFC	Fase estacionaria de almidón soluble 3,5-dimetilfenilcarbamato
ATR	Reflectancia total atenuada
C-DFC	Fase estacionaria de celulosa 3,5-dimetilfenilcarbamato
CE	Electroforesis capilar
CEC	Electrocromatografía capilar
DE	Equivalente de dextrosa
DFC	3,5-dimetilfenilcarbamato
DP	Grado de polimerización
DRX	Difracción de rayos X
FEQs	Fases estacionarias quirales
FT-IR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
GC	Cromatografía de Gases
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
K	Factor de retención
M-DFC	Fase estacionaria de maltodextrina 3,5-dimetilfenilcarbamato
OL	Oligosacárido lineal de amilosa
OL-DFC	Fase estacionaria de oligosacárido lineal 3,5-dimetilfenilcarbamato
R_s	Resolución
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos
t₀	Tiempo muerto
TGA	Análisis termogravimétrico
TGB	Base de Tröger
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografía líquida en capa fina
t_R	Tiempo de retención
TSO	Óxido de trans-estilbeno
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
A	Factor de separación

LISTA DE ECUACIONES

	Pag.
Ecuación 1. Factor de separación.	58
Ecuación 2. Resolución cromatográfica.	58
Ecuación 3. Factor de retención.	58

RESUMEN

En este trabajo se presenta la síntesis y caracterización de nuevas fases estacionarias quirales (FEQs) a base de polisacáridos con 3,5-dimetilfenilcarbamato (DFC) para la separación de mezclas racémicas. La síntesis de FEQs se realizó a partir de celulosa, almidón soluble, maltodextrina y un oligosacárido lineal de amilosa (OL). Para la obtención del OL se llevó a cabo una reacción enzimática con la enzima *pululanasa* (EC 3.2.1.41), la cual, tiene la función de cortar las ramificaciones, mediante ruptura de los enlaces α -1,6 glucopiranosídicos, en un polisacárido no lineal. El seguimiento de la síntesis y la caracterización de las FEQs se llevaron a cabo mediante diferentes técnicas tales como, espectroscopía infrarroja, análisis termogravimétrico, análisis elemental y difracción de rayos X.

La derivatización e inmovilización de los carbohidratos se realizó sobre 3-aminopropil sílica gel (APS) para su posterior estudio por HPLC en columnas con tres racematos (óxido de *trans*-estilbeno (TSO), base de Tröger (TGB) y benzoína) obteniendo una separación de estos analitos sobre la nueva fase estacionaria OL-DFC4.

Palabras clave: *Quiralidad, fases estacionarias, HPLC, cromatografía, mezcla racémica, polisacáridos.*

1. INTRODUCCIÓN

Los enantiómeros de compuestos quirales contienen actividades farmacológicas completamente diferentes, por lo cual, es de vital importancia para los fabricantes farmacéuticos evaluar el comportamiento de los enantiómeros puros. La cromatografía quiral ha sido la técnica de separación estereoselectiva más usada tradicionalmente, donde se destacan las fases estacionarias quirales (FEQs) a base de polisacáridos. La demanda de separaciones quirales rápidas y eficientes ha impulsado a los investigadores a explorar nuevas vías de síntesis con el fin de aumentar el rendimiento de este tipo de análisis; por lo tanto, se requiere el estudio enfocado en la comprensión y optimización de nuevos selectores quirales mejorados estudiando su selectividad y retención, siendo de mayor importancia la elución de estos compuestos en poco tiempo y con la menor cantidad de solventes, una de las aplicaciones es la selección de enantiómeros no deseados en la medicina de una forma rápida y a bajo costo.

En el presente documento se describe el proceso investigativo para el estudio de FEQs, que consta de cuatro secciones principales. En la primera sección se revisan los antecedentes bibliográficos sobre el tema objeto de estudio. En la segunda sección se expone la metodología empleada, en donde se describe el método para llevar a cabo la síntesis de las FEQs, su caracterización y la resolución de los racematos sobre estas, también se describe la obtención del oligosacárido lineal de amilosa (OL) a partir de una reacción enzimática.

Seguidamente en la tercera sección se presentan los resultados y el análisis, se examina la efectividad del método de síntesis y la selectividad de las FEQs obtenidas, describiendo la obtención de un nuevo selector quiral a partir del OL. En la cuarta sección, se muestran que determinan los aspectos fundamentales que dan cuenta sobre el cumplimiento de esta investigación y las conclusiones obtenidas.

2. OBJETIVOS

Con base en lo expuesto, se fijan un objetivo general y tres objetivos específicos que fueron:

2.1.OBJETIVO GENERAL

Estudiar los carbohidratos lineales como precursores en la fabricación de fases estacionarias para la separación de mezclas racémicas usando la técnica de cromatografía líquida de alta resolución para su posible aplicación en la industria farmacológica.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Derivatizar carbohidratos lineales como por ejemplo, celulosa, amilosa o quitosano.
2. Desarrollar protocolos para el revestimiento de los carbohidratos derivatizados en partículas como sílica gel.
3. Analizar el comportamiento de los compuestos sintetizados como fases estacionarias quirales en la cromatografía líquida de alta resolución HPLC para la separación de racematos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. QUIRALIDAD Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los isómeros son compuestos diferentes que tienen la misma fórmula molecular. Estos isómeros se clasifican en isómeros estructurales y estereoisómeros. Los estereoisómeros pueden ser conformacionales o configuracionales y dentro de estos últimos existen aquellos compuestos que no se superponen con sus imágenes especulares y se conocen como isómeros ópticos o enantiómeros (Figura 1) y la mezcla de ambas formas moleculares, como mezcla racémica ⁽¹⁾.

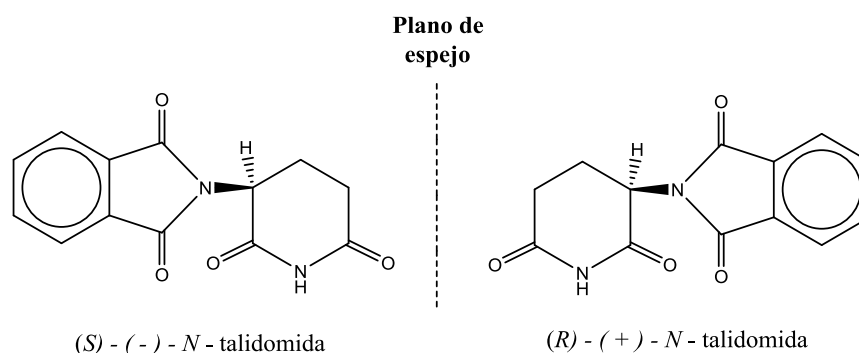


Figura 1. Estructura estereoquímica de la Talidomida.

Los enantiómeros tienen propiedades físicas y químicas idénticas excepto por la rotación en el plano de la luz polarizada, es decir, que tienen una señal de respuesta diferente para la rotación óptica. Solamente cuando una molécula se somete a una influencia quiral su quiralidad puede ser observada, como por ejemplo la interacción con la luz polarizada y los precipitantes quirales ⁽²⁾. Para obtener especies ópticamente puras, la separación de una mezcla enantiomérica es necesaria. Las proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos poseen características quirales ligadas a sus funciones como moléculas biológicas ⁽¹⁾. La

biosíntesis y el metabolismo están altamente controlados por la quiralidad; muchos de los enantiómeros son de uso esencial en industrias como la farmacéutica ⁽³⁾.

Además de la industria farmacéutica, dicha necesidad es igualmente patente en todos aquellos casos (como por ejemplo, en sectores relacionados con alimentos, aceites esenciales, aromas, herbicidas, fungicidas, residuos de plaguicidas, entre otros) ⁽⁴⁾ en los que la interacción de un sistema biológico con un compuesto quiral puede manifestarse de modo muy diferente dependiendo de si interviene una mezcla de los posibles enantiómeros o, en contraste, únicamente un enantiómero puro (homoquiral). Con base en lo anterior, ello supone que la estereoquímica de una molécula limita y restringe la efectividad de un fármaco, la percepción sensorial de un aroma, la enantioselectividad de un compuesto en el organismo humano o la persistencia ambiental de un agente contaminante ⁽⁵⁾. En la Tabla 1 se muestran algunos ejemplos de la diferencia de actividad de algunos isómeros.

Tabla 1. Actividades biológicas de algunos compuestos isómeros ⁽²⁾

Categoría	Nombre	Actividad
Fármacos	Anfetamina	El isómero-(<i>d</i>) es un potente estimulante del sistema nervioso central, mientras que el isómero-(<i>l</i>) tiene muy poco efecto.
	Epinefrina	El isómero-(<i>l</i>) es 10 veces más activo, actuando como vasoconstrictor, que el isómero-(<i>d</i>).
	Talidomida	Compuesto racémico usado como medicamento. El isómero-(<i>l</i>) es teratogénico y el isómero-(<i>d</i>) es un sedante (induce el sueño)
Alimentos	Asparagina	El isómero (<i>d</i>)-asparagina tiene un sabor dulce, mientras que la (<i>l</i>)-asparagina tiene un sabor amargo.
	Carvona	El isómero (<i>d</i>)-carvona tiene un olor a comino, mientras que el isómero (<i>l</i>)-carvona tiene un olor a menta verde.
Insecticidas	Permetrina	El isómero-(<i>d</i>) es mucho más tóxico que el isómero-(<i>l</i>).
Vitaminas	Ácido ascórbico	El isómero-(<i>d</i>) es un buen antiescorbútico, mientras el isómero-(<i>l</i>) no tiene muchas propiedades.

3.2. SEPARACIONES QUIRALES

A mediados del siglo XIX, Pasteur estableció el que se considera el primer método de separación de enantiómeros mediante la cristalización diastereomérica del ácido tartárico. Desde entonces los mecanismos de reconocimiento quiral han sido estudiados por las diferencias de energías de enlace entre los enantiómeros y un selector quiral ⁽¹⁾. El hecho de que los enantiómeros de un compuesto quiral puedan tener diferente actividad biológica, toxicología o metabolismo hace evidente la necesidad de disponer de métodos eficaces para la separación y obtención de enantiómeros, tanto a escala analítica como preparativa. Los métodos cromatográficos tales como cromatografía de gases (GC) ⁽⁶⁾, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ^(1; 7), cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) ^(8; 9) y cromatografía en capa fina (TLC) ⁽¹⁰⁾, han desarrollado métodos de separación quiral utilizando diferentes principios. Recientemente, se ha demostrado que la electroforesis capilar (CE) ⁽¹¹⁾ y la electrocromatografía capilar (CEC) son también poderosas alternativas; varios principios de separación utilizados con éxito en HPLC han sido transferidos a CE y CEC para la separación de enantiómeros ⁽¹²⁾.

En general, la separación cromatográfica de enantiómeros se puede llevar a cabo por varios métodos, sin embargo, siempre es necesario usar un tipo de discriminador quiral o selector. Este tipo de separaciones pueden llevarse a cabo, ya sea indirectamente utilizando reactivos de derivatización quiral para formar derivados diastereoméricos (los cuales pueden ser separados por un método cromatográfico no quiral), o directamente usando selectores quirales, que pueden incorporarse tanto en la fase estacionaria como en la fase móvil ⁽⁴⁾.

En este contexto, el método directo se ha ido desarrollando con la síntesis de fases estacionarias y estudiando el mecanismo de reconocimiento quiral. El selector será capaz de discriminar entre los dos compuestos si hay al menos tres

puntos de interacción entre este y uno o ambos de los enantiómeros ⁽¹³⁾ (Figura 2). Este modelo surgió con el fin de racionalizar las diferencias observadas entre los enantiómeros en cuanto a su actividad farmacodinámica ⁽¹⁴⁾ como base de las interacciones enantioselectivas droga-receptor. Con base en lo anterior, el modelo se basa en que si tres grupos de la molécula de un enantiómero interactúan con tres sitios complementarios en el selector quiral, el otro enantiómero no podrá interactuar del mismo modo con el receptor, resultando entonces en interacciones y, por ende, en efectos biológicos diferentes para ambos enantiómeros. Este modelo fue ampliado luego para explicar la enantioselectividad biológica de fármacos quirales en general ⁽¹⁵⁾, y también se extendió su aplicación para justificar la retención enantioselectiva en cromatografía ⁽¹⁶⁾.

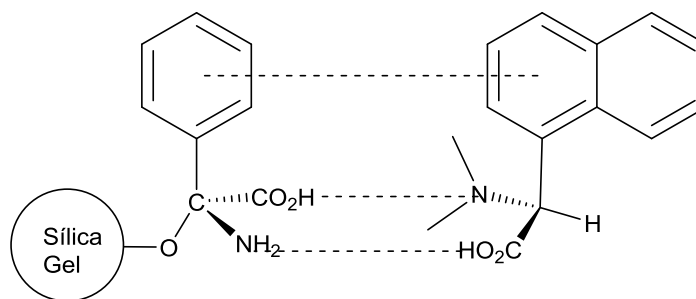


Figura 2. Ejemplo del modelo de tres puntos de interacción

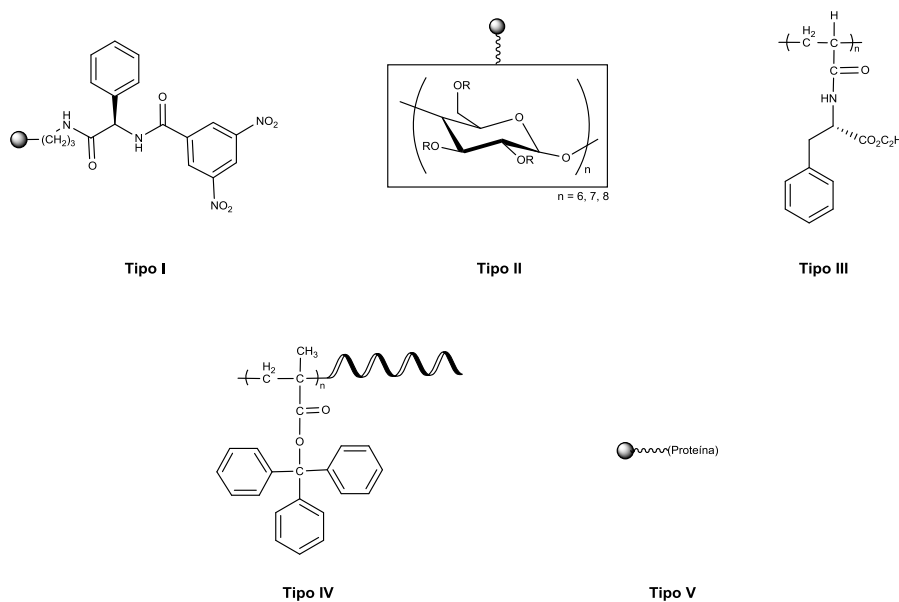
3.3. HPLC COMO TÉCNICA DE SEPARACIÓN QUIRAL

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica reconocida para el aislamiento y purificación de drogas quirales y productos naturales a larga escala ⁽¹⁷⁾. Esta técnica compite con otros métodos sintéticos y de separación tales como síntesis asimétrica y resolución cinética con biocatálisis ⁽¹⁸⁾. A principios de los años setenta, la primera separación inicial de los enantiómeros por cromatografía líquida fue descrita por Davankov ⁽⁵⁾ y en 1981 se comercializaron por primera vez las fases estacionarias quirales para HPLC desarrolladas por Pirkle ⁽¹⁹⁾. En los

años ochenta, la instrumentación para HPLC había avanzado notablemente, y también se habían desarrollado muchas fases estacionarias quirales eficaces para HPLC ⁽¹⁾. Hoy en día, la mayoría de los compuestos quirales parecen ser resueltos por HPLC.

3.3.1. Fases estacionarias quirales

Los objetivos alcanzados en el desarrollo de selectores quirales han permitido impulsar las separaciones enantioméricas. Sin embargo, cabe destacar el interés durante los últimos años en cuanto a la síntesis de nuevas fases estacionarias quirales adecuadas para su aplicación en el análisis de muestras de variada complejidad ⁽²⁰⁾. Las FEQs suelen ser versátiles, de modo que una misma fase puede permitir el análisis de una cantidad relativamente alta de compuestos quirales de distinta naturaleza. Dependiendo del tipo de interacción existente entre el selector y el analito que interviene en el proceso de reconocimiento quiral, podemos distinguir cinco tipos de fases estacionarias ⁽⁵⁾ (Figura 3).



* Las esferas grises representan la sílica gel. La línea ondulada representa un polímero

Figura 3. Fases estacionarias quirales típicas para HPLC.

- **Tipo I:** son aquellas fases cuyo selector quiral establece interacciones por enlaces de hidrógeno, ácido-base, transferencia de carga, dipolo-dipolo con un determinado compuesto quiral (Figura 4) ⁽¹⁾. Los selectores inmobilizados en la fase pueden ser aminoácidos, amidas, alcoholes, amidas o grupos fenilo. Las más conocidas son las fases tipo Pirkle ⁽²¹⁾, cuya estructura se basa en largas cadenas de selectores quirales con grupos aromáticos π -dadores o π -aceptores unidas a un soporte silíceo.

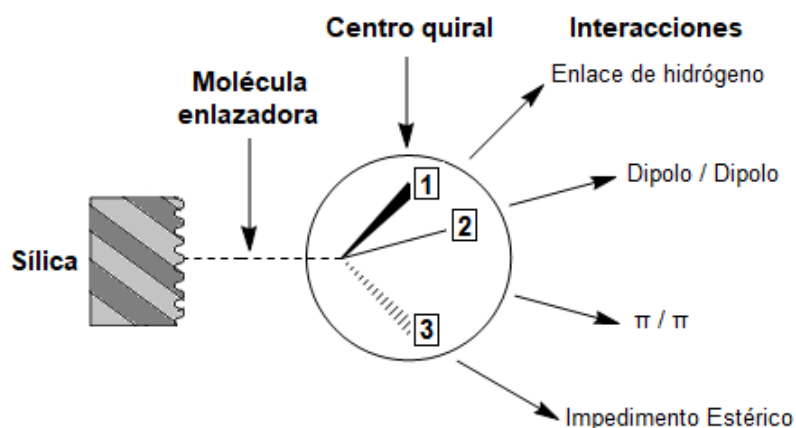


Figura 4. Posibles interacciones entre el centro quiral y el analito

- **Tipo II:** son las denominadas fases poliméricas. Están formadas por polisacáridos de amilosa o celulosa. La selectividad viene determinada por interacciones π - π , dipolo inducido, enlaces de hidrógeno y formación de complejos de inclusión ⁽¹⁾. Dichas fases permiten la separación enantiomérica de gran número de compuestos y, en general, el uso de eluyentes de diversas polaridades.

- **Tipo III:** son aquellas en las que se logra la discriminación quiral mediante la formación de complejos de inclusión, es decir, inclusión del soluto en una cavidad quiral. Las más destacadas son los derivados de fenilmetacrilatos y las Ciclodextrinas ⁽²²⁾.

- **Tipo IV:** son aquellas en las que el reconocimiento quiral se basa en la formación de complejos de coordinación ⁽¹⁾. Para ello es necesario que los enantiómeros a separar consten de átomos con pares de electrones libres (O, S, N, P), de modo que sea posible formar un equilibrio reversible con un complejo metálico quiral ⁽²³⁾.

- **Tipo V:** La complejidad de la estructura de las proteínas produce sitios de unión muy específicos, comúnmente encontrados en enzimas ⁽¹⁾. Se ha demostrado que un número de proteínas se unen a enantiómeros específicos de un soluto a través de una combinación de interacciones electrostáticas o hidrófobas; se adquiere selectividad cuando proteínas, como el suero bovino, se enlazan a sílica gel ⁽²⁴⁾ y son usadas para la separación de algunos enantiómeros.

En este sentido, la mayoría de los polímeros naturales, tales como proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos, son quirales y ópticamente activos ^(18; 25); a menudo poseen una conformación específica asociada con su quiralidad. Algunos de los polímeros naturales se han utilizado para la diferenciación enantiomérica in vitro como catalizadores quirales, huéspedes quirales y adsorbentes quirales ⁽²⁶⁾.

Hoy en día existen varios tipos de selectores quirales y fases estacionarias, mencionadas anteriormente, para HPLC ⁽²⁷⁾ que tienen diferentes mecanismos e interacciones para la resolución de diferentes analitos, algunos ejemplos se señalan en la Tabla 2.

Tabla 2. Tipos de selectores quirales y clasificación de fases estacionarias ⁽⁴⁾

	Mecanismo	Interacción primaria	Tipo de fase
Selectores sintéticos ^a			
Intercambio de ligandos	Selector diastereoisomérico/ión metálico/complejo con el analito	Coordinación de par electrónico (ión-dipolo)	Intercambiadores de ligando
Complejos-π	Asociación del analito	Interacción π - π	Inclusión
Polímeros de impresión molecular	Acoplamiento molecular "llave-cerradura"	Interacción de forma selectiva	
Éteres de corona	Formación de complejos de inclusión	Ión (grupo amina primaria)-dipolo	
Polímeros	Selector diastereoisomérico/complejo con el analito	Puentes de hidrógeno	
Selectores naturales ^a			
Proteínas	Múltiples sitios de interacción	Variable	Proteínas
Polisacáridos	Inserción en estructuras helicoidales	Puentes de hidrógeno o dipolo-dipolo o estéricas	Esteres y carbamatos de polisacáridos
Ciclodextrinas	Formación de complejos de inclusión	Puentes de hidrógeno	Inclusión
Ciclofrutasas	Inclusión del grupo NH ₂ /múltiples sitios de interacción	Variable	
Glicopéptidos macrocíclicos	Múltiples sitios de interacción	Variable	Tipo <i>Brush</i> (donor-aceptor)

^a La mayoría de selectores de intercambio de ligando y complejos- π contienen aminoácidos naturales y han sido derivatizados para mejorar su rendimiento

3.3.2. Fases estacionarias a base de polisacáridos

Las primeras resoluciones cromatográficas de enantiómeros se llevaron a cabo con adsorbentes quirales naturales tales como lana y los polisacáridos ⁽¹⁸⁾. Los polisacáridos están entre los biopolímeros naturales más importantes y abundantes con actividad óptica, y usualmente funcionan como una unidad estructural o una fuente de energía en sistemas vivos ^(18; 27). Los polisacáridos típicos de celulosa, almidón (amilosa) y dextrano ⁽²⁸⁾ (Figura 5) tienen una unidad repetitiva regular de D-glucosa, difiriendo en sus enlaces glucosídicos, en todo su polímero y se usan como adsorbentes quirales para la separación cromatográfica de enantiómeros debido a su fácil disponibilidad. Estos polisacáridos asocian monómeros quirales de hidratos de carbono individuales en una estructura secundaria helicoidal de largo alcance, también quiral ⁽¹³⁾. Se encontró que esta asociación es altamente efectiva para separaciones de enantiómeros por HPLC.

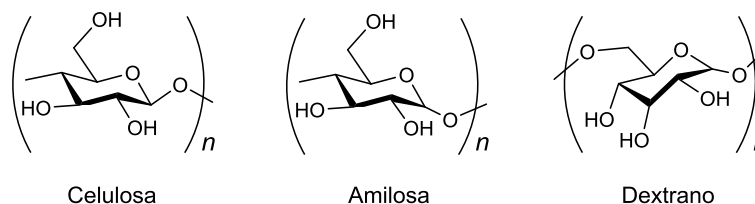


Figura 5. Estructuras de una unidad de celulosa, amilosa y dextrano

Las FEQs derivatizadas basadas en polisacáridos muestran propiedades cromatográficas y enantioselectivas mucho mejores que los propios polisacáridos nativos ⁽²⁶⁾. Los derivados de celulosa y amilosa depositados sobre sílica fueron desarrollados por el profesor Okamoto y comercializados por la compañía Daicel ⁽²⁹⁾. Hoy en día existe una diversidad de fases estacionarias quirales a base de celulosa y amilosa comercialmente disponibles. Con estas fases estacionarias se han realizado estudios de separación sobre un rango alto de racematos con diferentes estructuras químicas obteniendo muy buenos resultados; las fases estacionarias con un resultado sobresaliente en la resolución de racematos son

Chiralcel OD (derivado celulosa 3,5-dimetilfenilcarbamato), Chiralcel OJ (Derivado *para*-metilbenzoil amilosa) y Chiralpak AD (derivado amilosa 3,5-dimetilfenilcarbamato) ⁽¹⁾.

3.3.3. Grupos fenilcarbamato como derivatizantes y selectores quirales en FEQs a base de polisacáridos

Los derivados de fenilcarbamato de polisacáridos tales como celulosa y amilosa muestran altas capacidades de reconocimiento quiral, para una variedad de racematos, como fases estacionarias quirales para HPLC ⁽³⁰⁾. Las capacidades de reconocimiento quiral de los polisacáridos derivados dependen en gran medida de la naturaleza y posición de los sustituyentes introducidos en los grupos fenilo de los derivados de carbamato ⁽³¹⁾ (Figura 6).

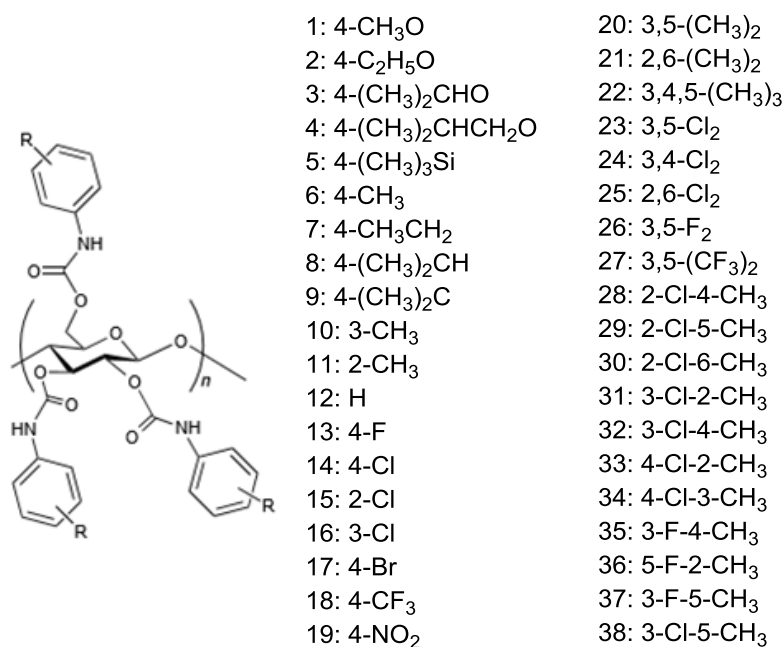


Figura 6. Tipos de sustituyentes sobre el fenilcarbamato como selector quiral en fases estacionarias quirales a base de polisacáridos ⁽³¹⁾

Considerados en su conjunto, los 3,5-dimetilfenilcarbamatos tanto de celulosa ⁽³²⁾ como de amilosa ⁽²⁷⁾ (Figura 7) muestran un reconocimiento quiral particularmente alto para una gran variedad de racematos y parecen estar entre las fases estacionarias quirales más útiles en la práctica ⁽³¹⁾.

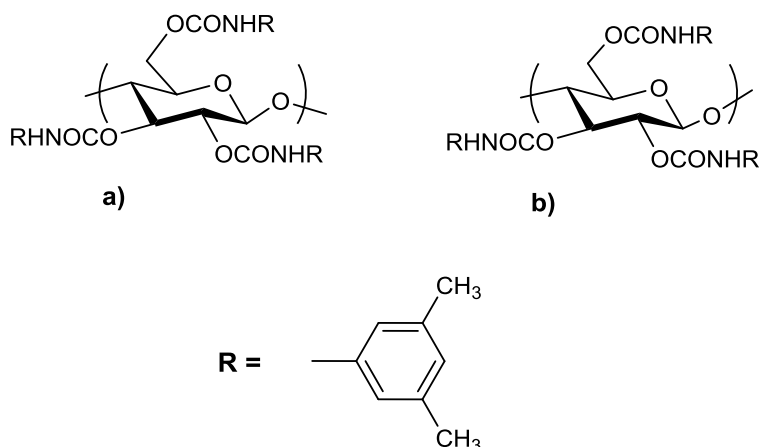


Figura 7. Estructuras de los derivados fenilcarbamato de a) celulosa y b) amilosa

Debido a la relevancia de este tipo de FEQs se han realizado estudios sobre el mecanismo de acción de este tipo de selectores quirales. En comparación con los derivados de celulosa y amilosa no sustituidos, los fenilcarbamatos que llevan sustituyentes que atraen electrones, como halógenos, o sustituyentes donadores de electrones, como grupos alquilo, presentan mejores reconocimientos quirales ⁽²⁹⁾. Estudios espectroscópicos que se han realizado ^(26; 18) indican que los principales sitios de interacción quiral son los grupos polares del carbamato (Figura 8), que pueden interactuar con un racemato mediante puentes de hidrógeno a través de los grupos NH y C=O e interacciones dipolo-dipolo sobre los grupo carbonilo ⁽²⁾. Los fenilcarbamatos de polisacáridos también pueden separar varios compuestos aromáticos no polares, que no pueden interactuar con el grupo carbamato a través de una interacción polar. Esto significa que, además de las interacciones polares, una interacción no polar, como la interacción entre los grupos fenilo de fenilcarbamatos y un grupo aromático de un racemato, juega un

papel importante en el reconocimiento quiral, particularmente bajo condiciones de HPLC en modo de fase reversa ⁽²⁶⁾ (utilizando eluyentes polares).

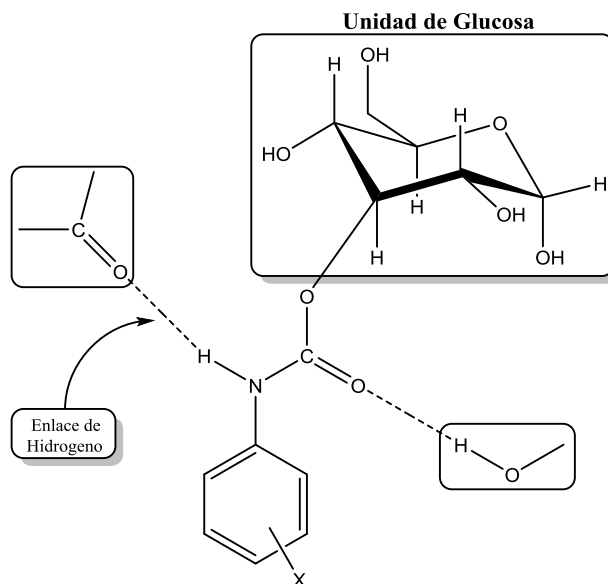


Figura 8. Posibles sitios de interacción de polisacáridos trifenílcarbamatados

Algunas de las FEQs basadas en polisacáridos para HPLC han estado comercialmente disponibles; sin embargo, estas FEQs pueden usarse con un número limitado de disolventes, debido a que algunos disolventes orgánicos, tales como THF, cloroformo, tolueno, acetato de etilo y acetona, disuelven o hinchan los derivados polisacáridos y destruyen sus columnas empaquetadas ⁽¹⁹⁾. Estas limitaciones en la selección de la fase móvil son a veces un serio problema para la resolución analítica de los enantiómeros ⁽³³⁾. Este problema se puede resolver mediante la inmovilización de los derivados de polisacáridos sobre soportes cromatográficos, de esta manera las columnas cromatográficas adquieren una mayor estabilidad; una vez que las FEQs se inmovilizan sobre un soporte, pueden usarse una serie de disolventes como fases móviles ⁽²⁷⁾.

4. METODOLOGIA

4.1. Síntesis de FEQs-DFC a base de polisacáridos enlazadas y depositadas sobre APS

4.1.1. Preparación de 3-aminopropil sílica gel (APS) ⁽³⁴⁾: Se disolvieron 30,0 g de sílica gel (Daisogel 100 Å, tamaño de partícula: 5 µm) en 320,0 mL de Tolueno y se llevan a reflujo para eliminar la cantidad de agua que contenga la muestra (se recogieron aproximadamente 50,0 mL de agua/tolueno y se desecharon). Posterior a esto se llevó la solución de sílica a 40°C y se adicionaron 2,80 mL de 3-aminopropiltrietoxisilano y 0,250 g de hidrosulfito de sodio y se calentó la mezcla a 85°C durante 16 horas. Finalmente se dejó enfriar a 40°C y se filtró haciendo lavados (3x100mL) con tolueno, acetona y metanol.

4.1.2. Método 1 ⁽³⁴⁾: **FEQs-DFC enlazadas a APS en la posición 6**: La síntesis se llevó a cabo añadiendo el carbohidrato (3,0 g) y cloruro de trifenilmetilo (10,0 g) a una solución de piridina (80,0 mL) y se hizo reaccionar a 90°C durante 24 horas. Después, se añadió 3,5-dimetilfenil isocianato (10,0 mL) al residuo carbamato y se dejó reaccionar durante otras 24 horas. La solución se vertió en un matraz con metanol (300,0 mL) el cual contenía una pequeña cantidad de ácido clorhídrico (0,05 mL) y se llevó a agitación durante 5 horas. La solución se filtró y el sólido obtenido se secó y se almacenó. La sustancia sólida obtenida (0,150 g) se disolvió en THF y se revistió sobre APS (3,0 g) dejando la mezcla en agitación durante una hora y así se obtuvo una mezcla homogénea. Posteriormente la solución se sometió con nitrógeno (flujo de 4,72 L/min) en el roto-evaporador durante 5 horas para eliminar el solvente. El derivado obtenido sobre APS se dispersó en una mezcla de tolueno anhidro y piridina (30:10 respectivamente) la cual contenía una cantidad de 0,022 g de 4,4'-difenilmetano diisocianato y se dejó reaccionar durante 5 h a 90°C. En seguida, se adicionó un exceso de 3,5- difenilmetil

isocianato dejando la reacción por 12 h. Luego de obtener el producto por filtración al vacío haciendo lavados (3x50mL) con THF y metanol se procede a empacar la columna.

4.1.3. Método 2 ⁽³⁵⁾: FEQs-DFC depositadas sobre APS: La síntesis se llevó a cabo añadiendo el carbohidrato (3,0 g) a solución de piridina (60,0 mL) y se agitó y calentó a 90°C hasta su disolución, luego se añadieron 10,0 mL de 3,5-difenilmetil isocianato y se hizo reaccionar a 90°C durante 30 horas. Después, se añadió 3,5-dimetilfenil isocianato (10,0 mL) al residuo carbamato y se dejó reaccionar durante otras 30 horas. La solución se vertió en un matraz con metanol (300,0 mL) el cual tendrá una pequeña cantidad de ácido clorhídrico y se llevó a a agitación durante 24 horas. La solución se filtró y el sólido obtenido se secó y se almacenó.

La sustancia sólida (2,0 g) se disolvió en THF y se revistió sobre APS (6,0 g) dejando la mezcla en agitación durante una hora y así se obtuvo una mezcla homogénea. Posteriormente la solución se sometió con nitrógeno (flujo de 4,72 L/h) en el roto-evaporador durante 5 horas para eliminar el solvente. Finalmente se dejó el producto secando en el horno a 80°C y luego se procedió al empacado de la columna.

Tabla 3. Fases estacionarias sintetizadas con el uso de diferentes carbohidratos

Carbohidrato	Método	Fase estacionaria obtenida	Código
Celulosa	1	Celulosa 3,5-dimetilfenilcarbamato	(C-DFC)
Almidón soluble	1	Almidón soluble 3,5-dimetilfenilcarbamato	(AS-DFC)
Maltodextrina (DE 9-14)	2 ^a	Maltodextrina 3,5-dimetilfenilcarbamato	(M-DFC)

^a Se utilizó como solvente para la derivatización N,N'-dimetilformamida con una pequeña cantidad de piridina como base

4.2. Síntesis de FEQs-DFC a base del OL, enlazadas y depositadas sobre APS

Mediante la reacción enzimática con α -1,6-glucano hidrolasa [EC 3.2.1.41] (pullulanase M2, proveniente de *Bacillus licheniformis*), que es específica para la hidrólisis de los enlaces α -1,6 en pululano y otros oligosacáridos ramificados, se obtuvo el oligosacárido lineal de amilosa (OL) a partir de maltodextrina y se prepararon las FEQs.

Reacción enzimática: La reacción enzimática se realizó en un vaso de precipitado, que contiene 6,0 g de maltodextrina (DE 4-7) disuelto en 20,0 mL de una solución buffer 0,10M de acetato de sodio a pH 5. Luego se adicionó 0,25 mL de la enzima y 0,010 mg de albúmina de suero bovino; la reacción se llevó a cabo a 50°C durante 15 horas.

Luego de obtener el OL se realizó la síntesis de la fase estacionaria a base de este carbohidrato siguiendo el procedimiento descrito en el punto 4.1, por el método 1 y método 2, realizando unas modificaciones en las cantidades del 4,4'-difenílmetano diisocianato y en la relación utilizada entre el carbohidrato y la APS mostradas en la Tabla 4.

Tabla 4. Variaciones en la síntesis de las fases estacionarias a base del OL y fases obtenidas

Método ^a	4,4'-difenílmetano diisocianato (g)	Cantidad de OL sobre APS (g)	Fase estacionaria obtenida
1	0,015	0,150	OL-DFC1
1	0,020	0,150	OL-DFC2
1	0,015	0,300	OL-DFC3
2	0,000	0,300	OL-DFC4

^a La cantidad de DFC que se utilizó para la síntesis de OL-DFC fue tres veces menor en comparación con la cantidad utilizada para la síntesis de C-DFC, M-DFC y AS-DFC

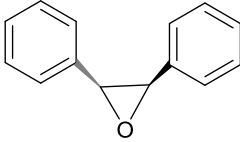
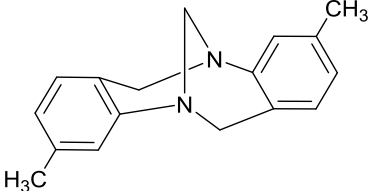
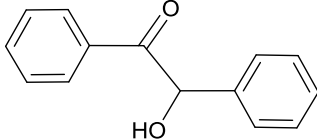
4.3. Empacado de columnas

El empaquetamiento de las columnas se realizó por la técnica de empaquetamiento convencional por suspensión a alta presión utilizando columnas de tipo modular de dimensiones 15x0,46 cm (largo/diámetro) en base a la metodología utilizada por la empresa *AZYP separations & analytics*. Para llevar a cabo el proceso se suspende la fase estacionaria en una mezcla de metanol/ciclohexanol (80/20) y posterior a este se presuriza con metanol a 10.000 psi hasta coleccionar 150,0 mL de solvente.

4.4. Enantioseparación de mezclas racémicas por HPLC

Todos los estudios cromatográficos se llevaron a cabo en un cromatógrafo Agilent (1200 Series) con detección UV-vis (254 nm) a temperatura ambiente (23°C) con un flujo de 1.0 mL/min, una fase móvil de hexano/isopropanol en relación 90/10 y un volumen de inyección de muestra de 2,0 µL. Los análisis se llevaron a cabo en todas las columnas sintetizadas (15x0,46 cm) y en una columna CHIRALPAK IB 15x0,46cm (*Daicel chiral technologies corporation*) como referencia. Para los experimentos se utilizaron mezclas racémicas de óxido *trans*-estilbeno, base de Tröger y Benzoína (*Sigma Company*) presentados en la Tabla 5.

Tabla 5. Nombres y estructuras de las mezclas racémicas

Nombre común	Estructura
Óxido de <i>trans</i> -estilbeno	
Base de Tröger	
Benzoína	

4.5. Caracterización de las fases estacionarias sintetizadas

4.5.1. Espectroscopia FT-IR: Los espectros IR fueron tomados con un espectrofotómetro Bruker FT-IR alfa P con ATR de diamante y capacidad de modo de transición. Se tomaron las medidas en la región comprendida entre 4000 y 500 cm^{-1} . Las muestras fueron sometidas a una temperatura de 90°C toda la noche para eliminar rastros de humedad y de solventes.

4.5.2. Análisis elemental (C,H,N): Para llevar a cabo el análisis elemental de los compuestos se utilizó un 2400 CHNS/O *Series II System* (100V).

4.5.3. Difracción de rayos X: Para hacer un seguimiento a la reacción de obtención del OL y su derivatización se tomaron unos difractogramas de rayos X para los cuales se utilizó un Difractómetro Bruker CCD equipado con radiación Mo ($K\alpha$) empleando un barrido en el intervalo $2\theta = 5^\circ - 30^\circ$, a temperatura ambiente.

4.5.4. Análisis termogravimétrico: El análisis termogravimétrico nos proporciona información sobre la composición de la fase estacionaria obtenida y permite verificar si se ha llevado a cabo correctamente la reacción de enlazamiento sobre APS descrita en 4.1.1 y su rendimiento. Para el análisis termogravimétrico de las fases estacionarias se utilizó un equipo Shimadzu TGA-51 con una celda de platino, una atmósfera de nitrógeno y en un intervalo de temperatura comprendido entre 30 a 600°C (con un aumento de 10°C por minuto).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sesión se muestran los resultados obtenidos en este trabajo junto con su respectivo análisis desde la síntesis de las fases estacionarias hasta la resolución de los analitos.

5.1. Fases estacionarias a base de celulosa, almidón soluble y maltodextrina

5.1.1. Derivatización e inmovilización de los carbohidratos

El primer paso de la síntesis de las fases estacionarias fue la derivatización de los carbohidratos. Durante el proceso, tanto por el método 1 (Figura 9) como por el método 2 (Figura 10), se encontró un problema referente a la solubilidad de los carbohidratos en el medio de reacción. La celulosa al tener un peso molecular muy alto tiene una solubilidad muy limitada en piridina ⁽²⁸⁾. La solubilidad de los polisacáridos viene ligada a su grado de polimerización (DP); la relación entre estos dos parámetros es inversa, ya que, entre más alto sea su DP menos soluble es el polisacárido. La celulosa que se utilizó para la síntesis de la fase estacionaria celulosa 3,5-dimetilfenilcarbamato (C-DFC) fue celulosa microcristalina, la cual tiene un DP entre 300-600 y sin embargo, no se logró una solubilidad completa de la celulosa en piridina en la síntesis por el método 1. En el caso del almidón soluble y la maltodextrina al tener DP menores que la celulosa (~ 180 y 30, respectivamente) la solubilidad fue mayor. No obstante, no se tuvo una solubilidad completa al inicio de la reacción, pero la solubilidad aumentaba a medida que avanzaba la reacción; al adicionar el grupo protector la solubilidad de los carbohidratos incrementa y esto se da a medida que disminuye la cantidad de grupos –OH libres. Se logra al final de la reacción una fase homogénea, aunque, en el caso de la celulosa, no se logró dicha fase. Las reacciones llevadas a cabo durante la síntesis involucran reacciones sólido-líquido, y este tipo de reacciones

tienden a ser lentas y algunas veces incompletas ⁽³⁶⁾, por ende existe una dificultad para que el carbohidrato se derivatice por completo.

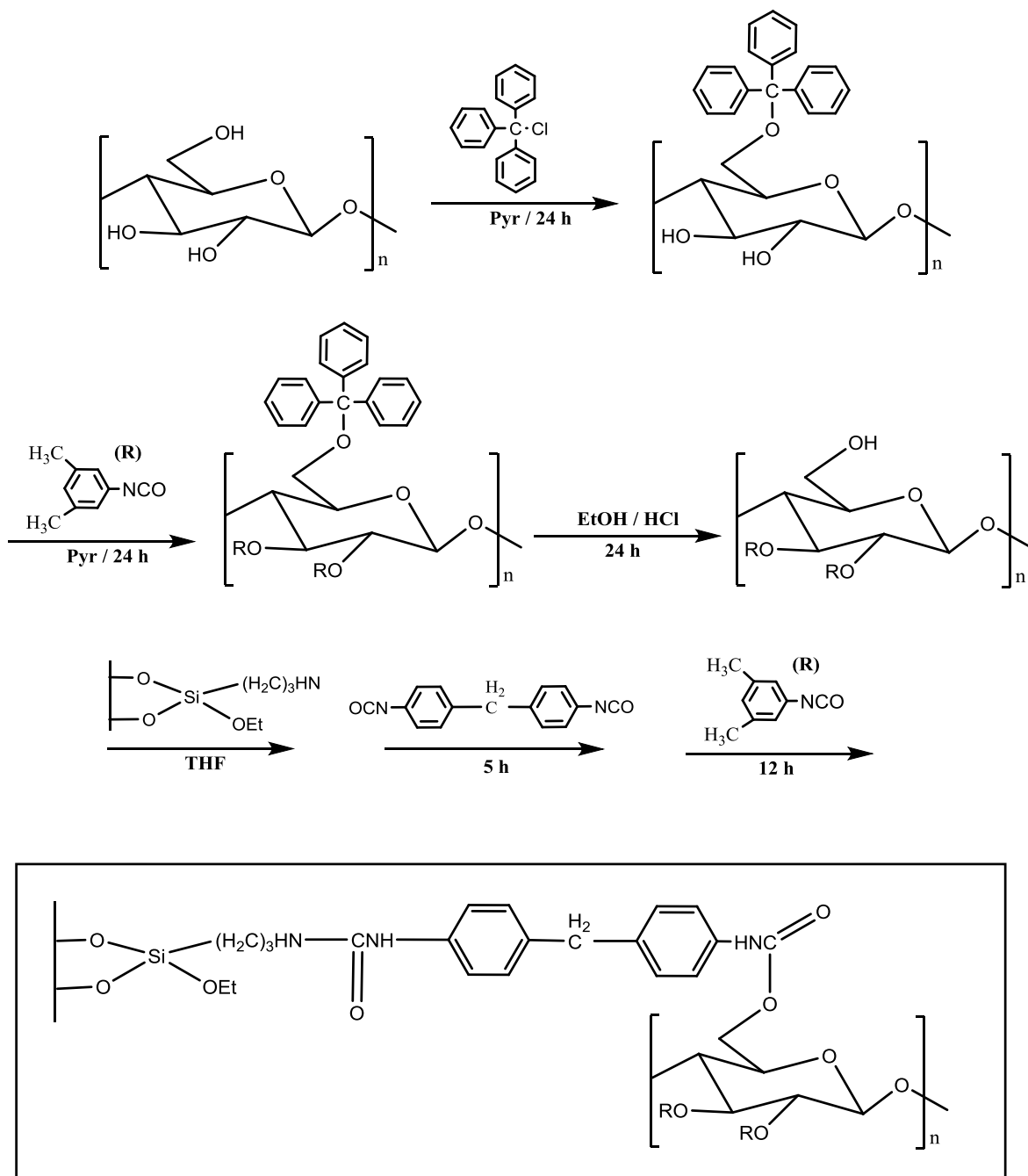


Figura 9. Esquema de la síntesis de las fases estacionarias por el método 1.

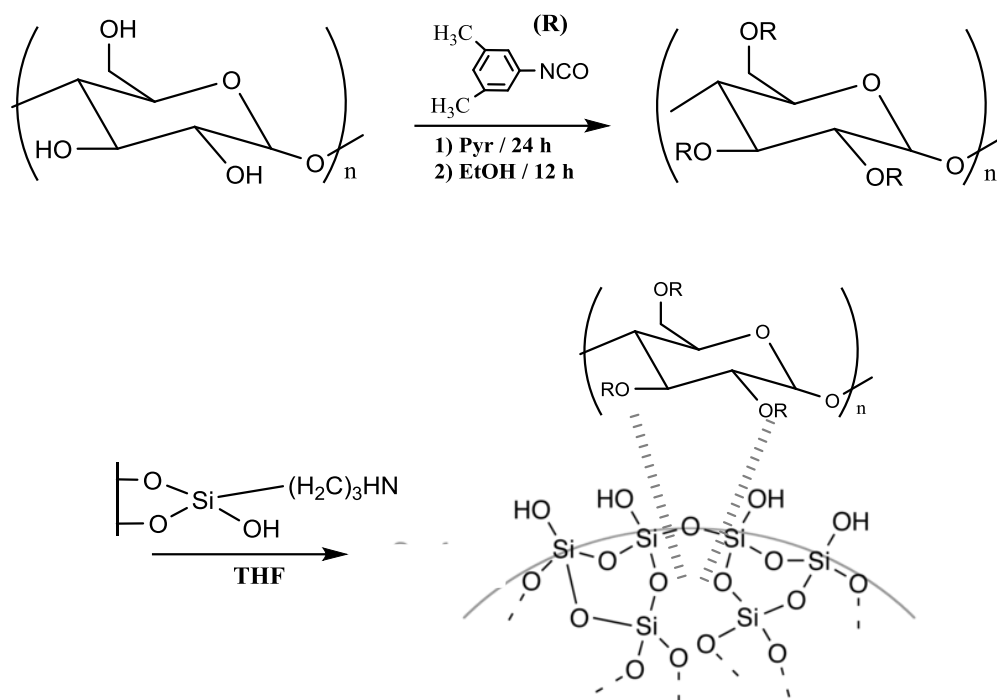


Figura 10. Esquema de la síntesis de las fases estacionarias por el método 2

Para corroborar si se llevó a cabo la correspondiente derivatización se realizó un análisis FT-IR y un análisis elemental. En seguida, para verificar la inmovilización se realizó un análisis termogravimétrico.

a. Derivatización de los carbohidratos

Espectros IR. La celulosa, la maltodextrina y el almidón soluble son carbohidratos que presentan un perfil característico similar en sus espectros IR (Figura 11). Lo anterior refiere a que los tres presentan una banda característica entre 3200-3500 cm^{-1} que se atribuye al estiramiento O-H de los grupos hidroxilos libres presentes en las unidades de glucosa; cuando los hidroxilos reaccionan con el 3,5-dimetilfenil isocianato la banda se disminuye notablemente (Figura 12), ya que, los grupos hidroxilo son convertidos en grupos carbamato.

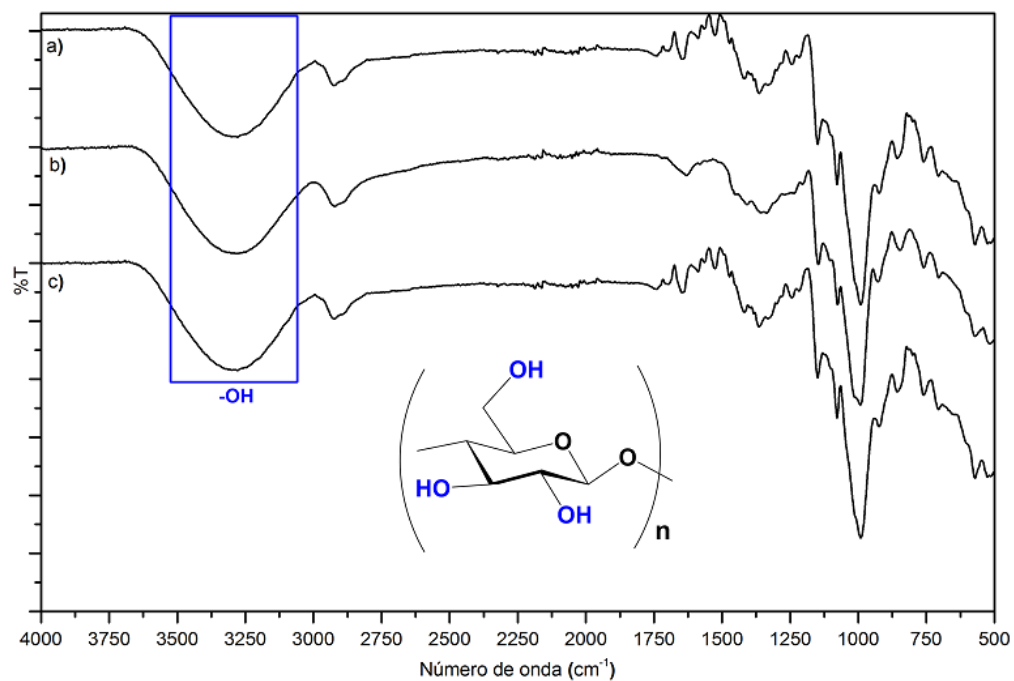


Figura 11. Espectros IR de a) celulosa, b) maltodextrina y c) almidón soluble

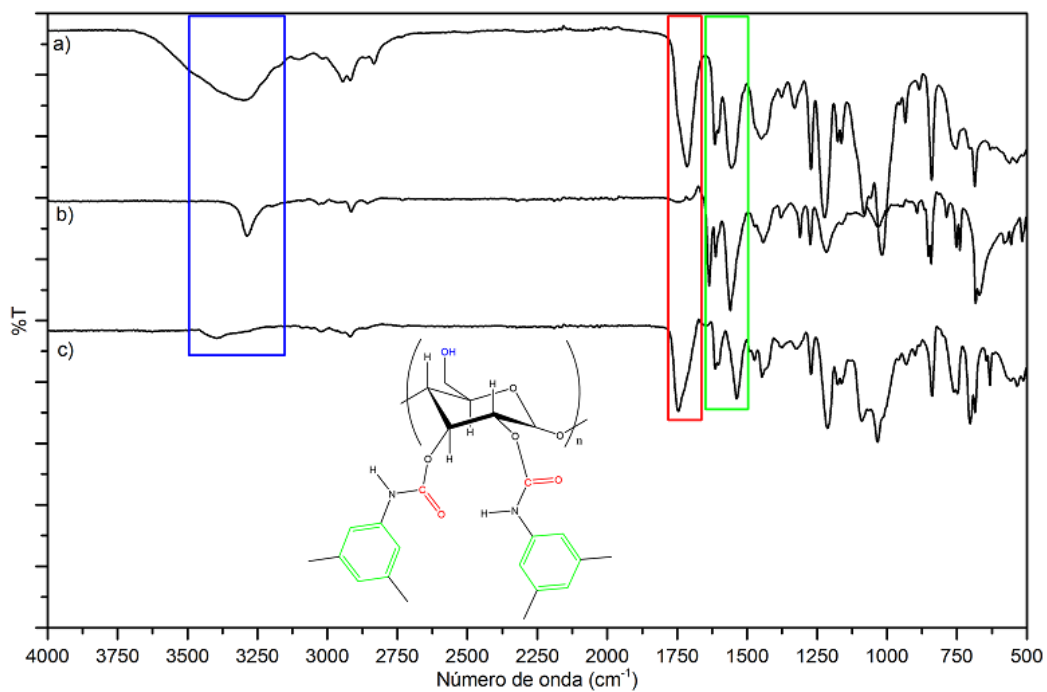


Figura 12. Espectros IR de a) celulosa, b) maltodextrina y c) almidón soluble derivatizados

Se observa que la banda del grupo hidroxilo no desaparece del todo en celulosa y maltodextrina derivatizados (Figura 12), esto se debe a que en el producto obtenido en este paso hay presencia de grupos hidroxilo libres, ya sea en la posición 6 de la glucosa (Figura 13) o los que no fueron derivatizados; además, a esta longitud de onda se observan bandas de estiramiento N-H (correspondiente al enlace N-H de la amida formada). Para el caso del almidón soluble se observa que si desaparece la banda indicando que existen pocos o no hay ya hidroxilos presentes en la muestra. Para celulosa y almidón soluble derivatizados también se observa en los espectros la aparición de bandas en la región entre $1700-1750\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a un estiramiento C=O del grupo carbonilo presente en la amida formada. En el caso particular de la maltodextrina se observa que el espectro de la figura 12b no es igual a los de los otros carbohidratos, en este caso, se presentó un comportamiento diferente, debido a que, no se observa la banda característica del grupo carbonilo formado y no se observan las bandas que indican la presencia del grupo éster (dos bandas $\sim 1220-1160$). Para este carbohidrato se infiere que el producto no fue el deseado y no se forma el carbamato correspondiente sino un grupo imino. La maltodextrina tiene un alto número de ramificaciones que pueden provocar un impedimento mientras se está formando el compuesto durante la reacción haciendo que este no se vaya por el camino esperado y se forme un compuesto diferente. Finalmente la aparición de las bandas entre $1500-1650\text{ cm}^{-1}$ representativas del estiramiento C=C en un anillo aromático indica la presencia de este en la estructura.

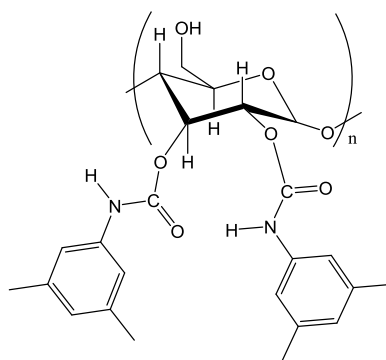


Figura 13. Estructura del carbohidrato intermediario DFC con el hidroxilo en la posición 6 libre (método 1).

Análisis elemental. El análisis elemental proporciona el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno que contiene una muestra. Para este trabajo se analizaron los carbohidratos después de la derivatización (Tabla 6) con el objetivo de corroborar si se enlazó el grupo carbamato. La aparición de nitrógeno en el compuesto nos indica que si se llevó a cabo la reacción con el isocianato y que al menos una cantidad de grupos hidroxilos están derivatizados. Con base en el contenido de nitrógeno en el compuesto se tiene una idea del grado de derivatización, así se verifica que la derivatización se llevó a cabo exitosamente y como es el rendimiento de la misma. Para la maltodextrina como se mencionó en el análisis IR se espera que no sea un grupo carbamato el formado pero de igual forma el compuesto que se obtuvo presenta un contenido de nitrógeno y esto indica que si se obtuvo una derivatización sobre los grupos hidroxilo de la glucosa.

Tabla 6. Análisis elemental de celulosa, almidón soluble, maltodextrina y APS.

Muestra	Contenido elemental (%peso)		
	N	C	H
Celulosa ^a	-	44,44	6,17
Celulosa DFC	6,41	65,29	6,86
Almidón soluble ^a	-	40,00	6,66
Almidón soluble DFC	2,75	57,42	7,56
Maltodextrina ^a	-	40,00	6,66
Maltodextrina DFC	2,35	56,93	7,04

^a Valores de composición teóricos obtenidos en base a las fórmulas moleculares.

b. Inmovilización de los carbohidratos derivatizados sobre APS

El análisis de sílica gel y APS se realizó con el objetivo de verificar si la reacción de la sílica con el 3-aminopropiltrietóxisilano se llevó a cabo con éxito. El contenido de nitrógeno, carbono e hidrógeno en la APS (Tabla 7) indica que la sílica tiene el grupo aminopropil en su estructura y se obtuvo exitosamente la APS, ya que, la sílica gel solo se compone de silicio y oxígeno (SiO_2).

Tabla 7. Análisis elemental de sílica gel y APS.

Muestra	Contenido elemental (%peso)		
	N	C	H
Sílica Gel	-	-	-
APS	0,83	2,61	0,95

Análisis termogravimétrico. El comportamiento térmico de las fases estacionarias obtenidas C-DFC, AS-DFC y M-DFC, que se muestra en la figura 14, resulta el mismo, independientemente del carbohidrato utilizado.

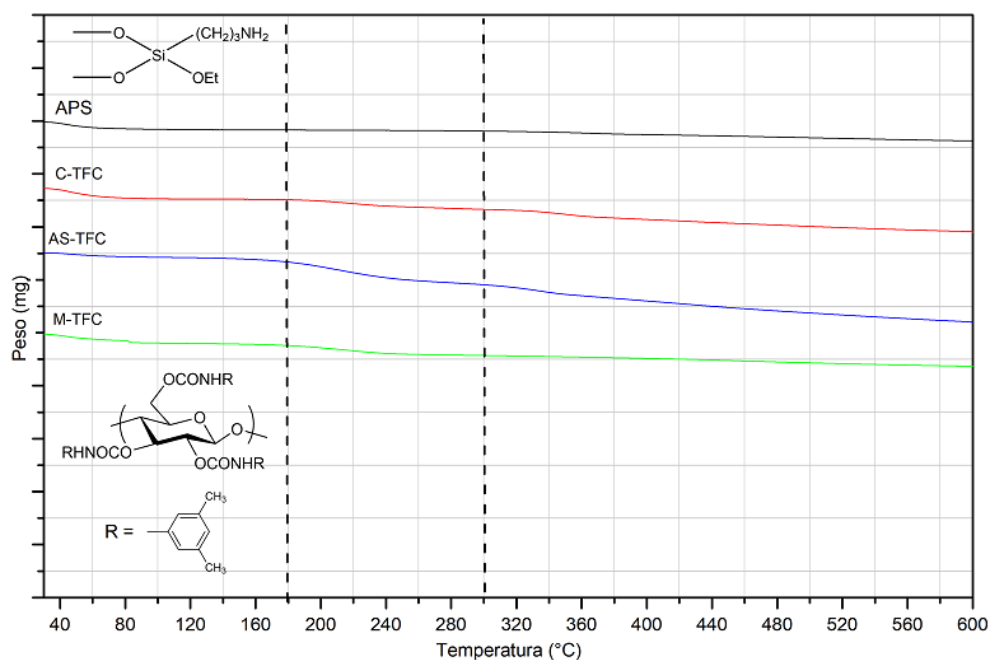


Figura 14. Comportamiento térmico de APS y las fases C-DFC, AS-DFC Y M-DFC

Se observa en la Figura 14 que se presenta una descomposición parcial de los compuestos, llevada a cabo en dos etapas. En la primera etapa ocurre una disminución de peso que se debe a la descomposición de hidratos de carbono de bajo peso molecular así como los grupos metilo y anillos glucopiranosídicos que contiene la fase estacionaria en forma de CO₂ y agua; este proceso ocurre en un rango de temperatura de 190-280°C ⁽³⁷⁾. En una segunda etapa se presenta la descomposición de estructuras carbonadas más complejas como el anillo aromático y el contenido nitrogenado, este último, en forma de óxidos de nitrógeno; en esta etapa se termina de eliminar el contenido orgánico de las fases estacionarias en un rango de temperatura entre 300-600°C. Las fases estacionarias están constituidas principalmente por silicio (sílica gel), grupos 3,5-dimetilfenil carbamato sobre los carbohidratos y grupos aminopropil que están sobre la sílica gel siendo estos dos últimos el contenido orgánico. La pérdida de peso no se da de forma completa, debido a que, la sílica no se descompone a una temperatura menor a 600°C que es la máxima alcanzada y las fases son aproximadamente un 90% sílica gel. Se observa que para APS se tiene una pérdida total de peso de 4.55% que es atribuida a los grupos aminopropil, como se mencionó anteriormente, corroborando que efectivamente su síntesis se llevó a cabo y con este valor se estima un grado de inmovilización (Tabla 8), este valor nos indica un estimado de la cantidad de carbohidrato que se enlazó efectivamente en las fases estacionarias; para las fases preparadas en esta sesión, AS-DFC es la fase con un grado de inmovilización mayor. El aumento del porcentaje de pérdida de peso en las fases estacionarias comparadas con la APS indica que se llevó a cabo la inmovilización de los carbohidratos derivatizados sobre esta; se debe resaltar que la fase estacionaria M-DFC se sintetizó por el método 2 (Figura 10) llevando a cabo una deposición sobre la APS y no inmovilización.

Tabla 8. Datos obtenidos del análisis termogravimétrico de las fases estacionarias C-DFC, M-DFC y AS-DFC

Muestra	Perdida de peso total (%)	Rango de temperatura Etapa 1 (°C)	Rango de temperatura Etapa 2 (°C)	Grado de inmovilización^a (%)
APS	4,55	200-300	300-600	-
C-DFC	11,77	195-305	310-600	7,22
M-DFC	12,95	180-320	320-600	8,40
AS-DFC	16,84	190-600	300-600	12,29

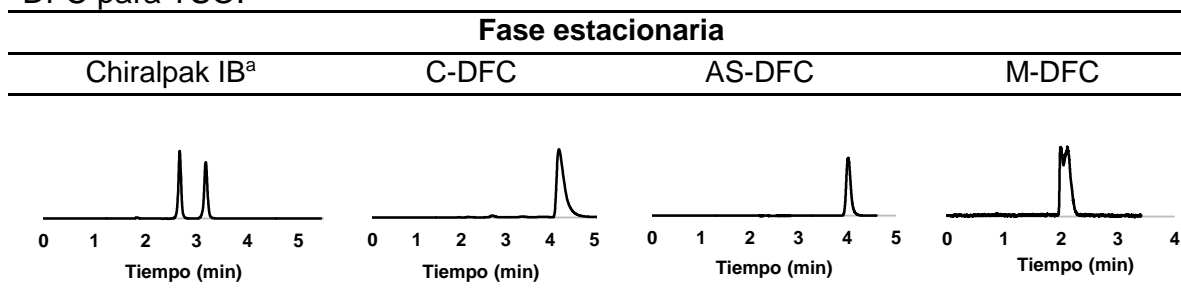
^a Valor estimado con base en la diferencia de pérdida de peso entre la fase estacionaria y la APS (porcentaje de carbohidrato depositado o enlazado a la APS)

Para las fases estacionarias, las gráficas muestran la pérdida de contenido orgánico pero en diferente proporción (Tabla 8) lo que indica que los grupos carbamato no están presentes en igual cantidad en cada una de las fases, fenómeno que se altera en su síntesis por la diferencia estructural de los carbohidratos y su solubilidad en el medio de reacción.

5.1.2. Resolución de las mezclas racémicas en las fases estacionarias

Una vez obtenidas las fases estacionarias se procedió a probar la selectividad de las fases estacionarias sintetizadas en el paso anterior. Para el análisis de la resolución de los racematos (TSO, TGB y benzoína) se realizó la separación por HPLC utilizando las columnas obtenidas a partir de las fases C-DFC, AS-DFC y M-DFC. Cabe resaltar que, el análisis de las fases se llevó a cabo inicialmente sólo sobre TSO (Tabla 9), ya que, este racemato es el más sencillo y si no se observa separación sobre este no se examinan los otros racematos, debido a que, ya no se tendrá selectividad sobre estos.

Tabla 9. Habilidad de reconocimiento quiral de Chiralpak IB, C-DFC, AS-DFC y M-DFC para TSO.



^a Columna cromatográfica comercial a base de celulosa utilizada como referencia

Efecto de la síntesis de las FEQs en la resolución de racematos: En la Tabla 9 se observa la resolución de los analitos en las fases estacionarias. Para la fase M-DFC se observa una separación parcial (con dos picos), pero no separación enantiomérica, debido a que los picos no son simétricos y en una segunda prueba los dos picos desaparecen; este fenómeno se da cuando la fase estacionaria no se ha estabilizado por completo, debido a que la fase es sintetizada por el método de deposición (método 2) y el carbohidrato se moviliza sobre la columna (aumentando el ruido en el análisis). Para las fases estacionarias C-DFC y AS-DFC el procedimiento fue de inmovilización, es por eso, que se elimina el ruido en los cromatogramas. No se observa separación alguna en las fases estacionarias C-DFC, AS-DFC y M-DFC pero se corrobora que el procedimiento de síntesis y preparación de las columnas cromatográficas se realizó correctamente.

La explicación a los anteriores resultados se puede atribuir tanto a la estructura del carbohidrato como al selector quiral que se incorpora en esta para dar finalmente un nuevo compuesto. La celulosa es un carbohidrato lineal de alto peso molecular, en este trabajo se utilizó celulosa microcristalina, que tiene un peso molecular más bajo que la celulosa original, sin embargo, sigue teniendo la misma linealidad. Existen un número de estudios realizados para la celulosa DFC como fase estacionaria quiral ⁽¹⁹⁾; en este trabajo se realizó la síntesis de C-DFC como una referencia para el estudio posterior de otros polisacáridos como nuevas FEQs. No

se logra separar enantioméricamente mediante este carbohidrato. Se corroboró que la derivatización se realizó de forma correcta, sin embargo, se obtuvo una baja inmovilización lo que nos lleva a los resultados presentados en la resolución de los analitos. Durante la síntesis de esta fase se tuvieron inconvenientes principalmente con la solubilidad de la celulosa en la piridina. El procedimiento fue basado en la síntesis de FEQs ya existentes ^(35; 38), pero de igual forma, no se logró solubilizar este carbohidrato de ninguna manera posible. Una respuesta positiva a este fenómeno es que se logró la derivatización de este carbohidrato con un alto rendimiento. La derivatización de los carbohidratos depende de su peso molecular y de los extremos reductores que tengan. En el caso del almidón soluble y la maltodextrina aunque la solubilidad mejoró, No se logra una solubilidad inicial pero al adicionar el isocianato y a medida que la reacción se da se solubiliza por completo el carbohidrato derivatizado. Con base en lo anterior, se obtuvo una derivatización de los tres carbohidratos pero en diferente proporción, que aunque no se logra una selectividad con las especies enantioméricas, se logró una buena ruta de síntesis. La selectividad de las fases estacionarias a base de celulosa y amilosa se basa en un principio de la estructura que toma el carbohidrato ⁽²⁹⁾; La amilosa ya tiene una estructura helicoidal, que se caracteriza por tener ya una quiralidad estructural (Figura 15), que le atribuye más selectividad a la fase estacionaria. Para el caso de la celulosa, al introducir grupos funcionales en los hidroxilos (en este caso grupos DFC) adquiere una conformación helicoidal mejorando por ende la selectividad ⁽¹⁹⁾. Cuando se habla de carbohidratos como el almidón soluble (amilodextrinas) y maltodextrinas, que ya son carbohidratos ramificados, la baja selectividad se atribuye a sus estructuras. Cuando se tienen ramificaciones la selectividad disminuye, sin embargo, en este trabajo se quiso probar si para compuestos de bajo peso molecular, como el AS y la maltodextrina, las ramificaciones no afectan este parámetro. Gracias a los resultados, se determinó que la estructura es fundamental para la selectividad de FEQs a base de polisacáridos, ya que, no se observó separación de TSO en AS-DFC y M-DFC.

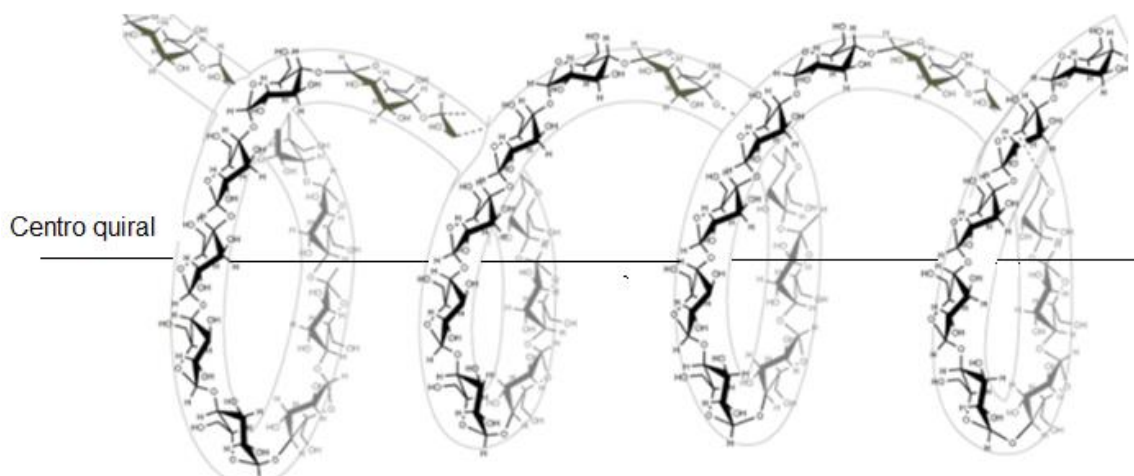


Figura 15. Estructura helicoidal de la amilosa

5.2. Fases estacionarias a base del OL

El objetivo de este trabajo es la obtención de una nueva fase estacionaria quiral usando un polisacárido lineal; ya que con base en lo estudiado, se determinó que la estructura juega un rol importante para la enantioselectividad y debido a que se tiene disponible comercialmente una fase a base amilosa y celulosa se busca un polisacárido lineal diferente, pero que cumpla con los mismos criterios de selectividad de las fases mencionadas.

Para llevar a cabo la síntesis de una nueva fase estacionaria se inició con maltodextrina, que tiene un equivalente de dextrosa (DE) entre 4-7, como material de partida para la obtención de un oligosacárido lineal con un DP de aproximadamente 30 con las propiedades de la amilosa. Posterior a la obtención del oligosacárido lineal se continúa con la derivatización y fabricación de una nueva fase estacionaria para la resolución de los analitos en estudio (TSO, TGB y benzoína).

5.2.1. Obtención del OL

Las maltodextrinas son polímeros formados por D-glucosa, en los cuales, residuos individuales de alfa-D-glucopiranosil están unidos por enlaces α -1,4 para dar cadenas lineales y que también poseen ramificaciones por medio de enlaces α -1,6 (Figura 16). Las maltodextrinas se definen como productos de la hidrólisis de almidón con valores de DE inferiores a 20 ⁽³⁹⁾.

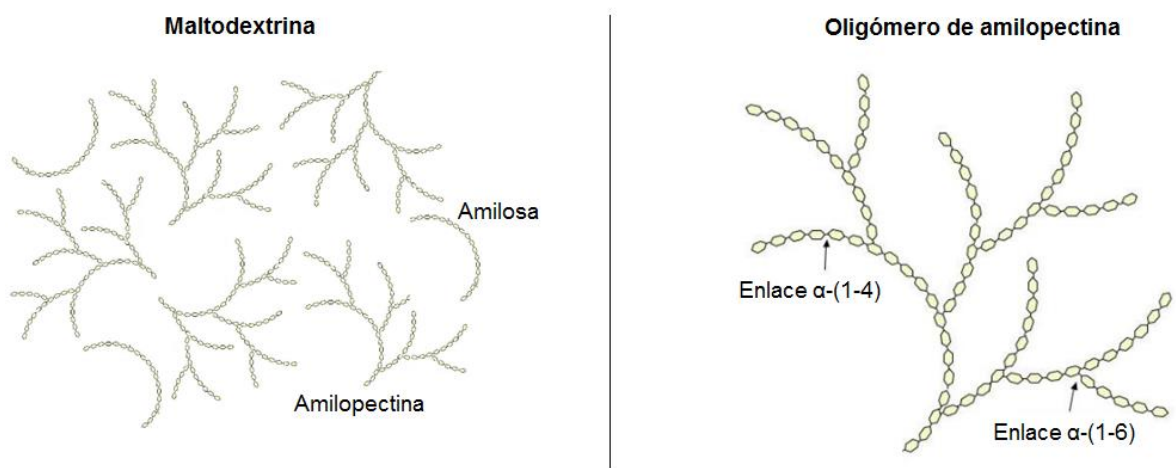


Figura 16. Ilustración de la composición de maltodextrinas y sus enlaces α -glucopiranosídicos

El criterio de clasificación y caracterización de los hidrolizados es el grado de conversión hidrolítica del almidón que se refiere principalmente al contenido de azúcares reductores y se expresa analíticamente como el DE (es decir, el azúcar reductor expresado como D-glucosa en peso seco) ⁽⁴⁰⁾. La distribución de los oligosacáridos y la masa molecular promedio afectan ciertas propiedades de las maltodextrinas, tales como la solubilidad, la depresión del punto de congelación y la viscosidad ^(39; 41). Se escogió para este trabajo una maltodextrina con un DE de 4-7, debido a que, el valor de DE está inversamente relacionado con el peso molecular, es decir, el DP. Estos dos parámetros se relacionan según la regla de Thumb ($DE=120/DP$) que nos da un valor estimado del DP.

Como se tiene un polisacárido con ramificaciones se trata con la enzima *pululanasa*, que es una enzima específica para la hidrólisis de los enlaces α -1,6 en pululano y otros oligosacáridos ramificados como la amilopectina ⁽¹⁷⁾. La reacción (Figura 17) se llevó a cabo bajo condiciones enzimáticas partiendo de la maltodextrina, que por sus características estructurales, se solubilizó fácilmente en el buffer. Luego de dejarla actuar durante toda la noche se obtuvo un sólido blanco (Figura 18) insoluble en agua. La solubilidad se atribuye a que al cortarse las ramificaciones se obtuvo como resultado oligosacáridos lineales que tienen una solubilidad muy baja, ya que, solo tienen un azúcar reductor y por ende no se hidrolizan fácilmente por su peso molecular.

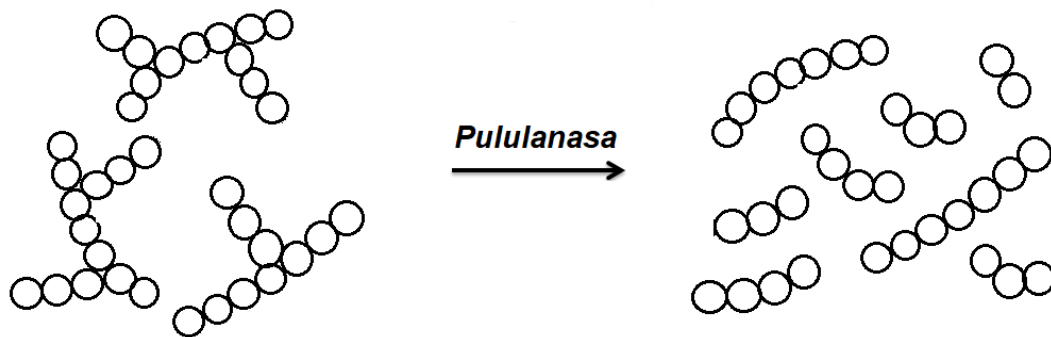


Figura 17. Esquema de la reacción enzimática para la obtención de oligosacáridos lineales a partir de maltodextrina

Los resultados obtenidos a partir de la reacción enzimática se muestran en la Tabla 10. El rendimiento de la reacción es alto y la enzima puede ser reutilizada siendo esta una ventaja para la obtención del OL.

Tabla 10. Condiciones de la reacción de la *pululanasa* y rendimiento

Parámetro	Observación
pH	5
Buffer	Acetato de sodio 0,1M
Tiempo	Toda la noche (15 horas)
Temperatura	50°C
Rendimiento	75%
OL aproximado obtenido total	~30 g
Costo de la enzima (US) / 1 mL	\$ 200



Figura 18. Oligosacárido obtenido de la reacción entre maltodextrina y la enzima *pululanasa*

5.2.2. Derivatización e inmovilización del OL

Para la síntesis de la fase estacionaria quiral a base del OL se siguió el procedimiento planteado en el punto 4.1, tanto por el método 1 como por el método 2, modificando algunos parámetros (Tabla 4), para la obtención de cuatro fases estacionarias. Para la caracterización de las fases estacionarias (derivatización e inmovilización) se llevaron a cabo análisis FIT-IR, TGA y difracción de rayos X.

a. Derivatización del OL

Espectros IR. Este análisis se llevó a cabo para corroborar la derivatización del OL con el 3,5-dimetilfenil isocianato. En este caso el OL tendrá un perfil similar a los carbohidratos analizados en 5.1.1 antes y después de la derivatización (Figura 19) donde se observa la disminución de la banda de estiramiento -OH ($3200-3600\text{ cm}^{-1}$) en el espectro del OL-DFC. Se observa también la aparición de las bandas en la región entre $1700-1750\text{ cm}^{-1}$ correspondientes al estiramiento C=O del grupo carbonilo y las bandas entre $1500-1650\text{ cm}^{-1}$ representativas del estiramiento C=C de los anillos aromáticos.

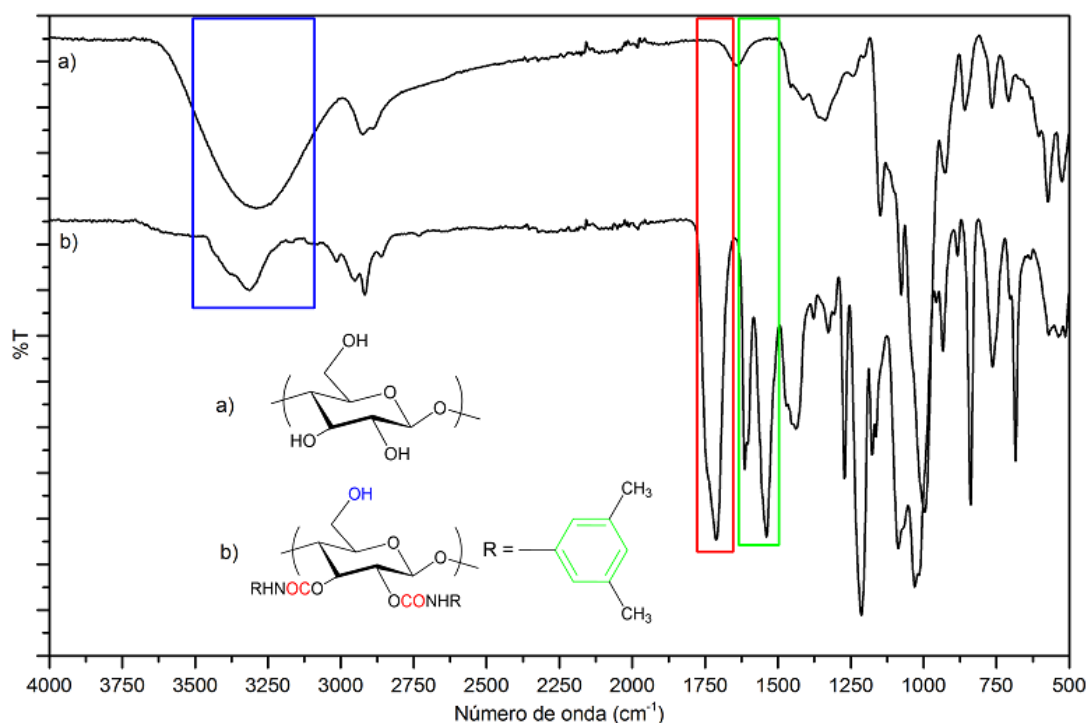


Figura 19. Espectros IR del a) OL y del b) OL derivatizado

Difracción de rayos X. El análisis de la estructura cristalina de un compuesto se puede llevar a cabo mediante DRX. Se analizó la maltodextrina inicial, el OL obtenido y el OL derivatizado. Para el caso de estos compuestos, que son carbohidratos de cadenas largas (más de 15 unidades repetitivas), al hablar de cristalinidad nos estamos refiriendo a un orden en la molécula a larga distancia. En

los difractogramas de las muestras (Figura 20) se observa el cambio en este orden, de la estructura inicial hasta el compuesto derivatizado, el cual pierde por completo esta propiedad.

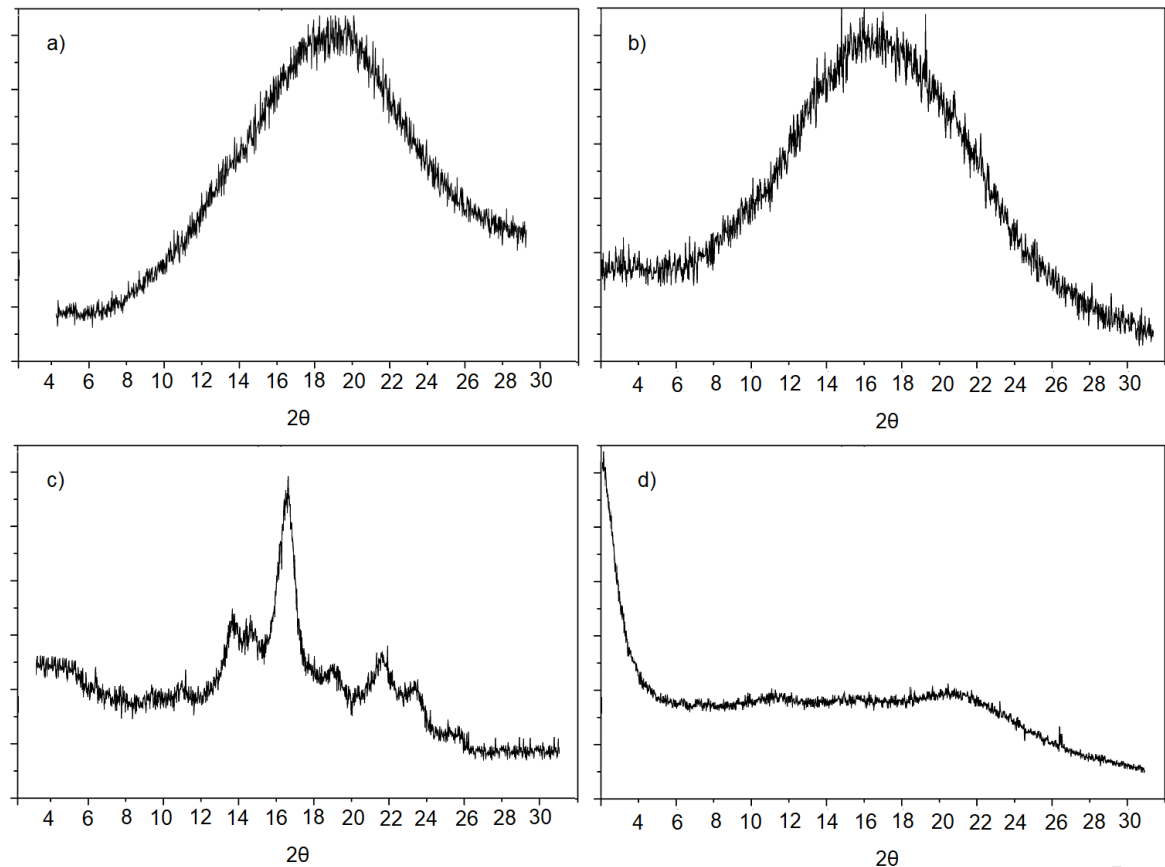


Figura 20. Difractogramas de a) Dextrina referencia ⁽⁴⁰⁾, b) maltodextrina, c) OL y d) OL-DFC

El difractograma correspondiente al polvo de maltodextrina inicial (Figura 20b) al compararlo con un difractograma de referencia ⁽⁴¹⁾ (Figura 20a, cromatograma de una dextrina con un DE~22) muestra que se tiene como material inicial una mezcla de amilosa y amilopectina proveniente del almidón, correspondiente a una estructura de la maltodextrina como se mencionó anteriormente. Estos primeros difractogramas indican un patrón de cristal tipo B característico de la estructura del almidón reportado en la literatura ^(40; 42) gracias a la intensidad observada en el

$2\theta = 17,00^\circ$. Al analizar el difractograma del OL se observan picos fuertes a valores de 2θ de $14,00^\circ$, $14,80^\circ$, $17,00^\circ$ y $22,33^\circ$ (Figura 20c), lo que indica que el tipo de orden en la molécula se mantiene pero su estructura cambia de cierta forma; este fenómeno se explica debido a que, al disminuir los extremos reductores en la molécula (disminuye el DE), la estructura adquiere linealidad y un mayor orden a larga distancia proporcionando un cambio en el difractograma. Por esta razón se atribuye que la reacción con la enzima *pululanasa* si da un oligosacárido diferente. Finalmente al analizar el difractograma del OL-DFC (Figura 20d) se observa que se pierde por completo el orden a larga distancia adquirido, dado a que los carbamatos que se adhirieron a la molécula modificaron su estructura y por ende se da un cambio en la cristalinidad. De esta forma se corrobora la derivatización del OL de manera exitosa.

b. Inmovilización del OL derivatizado sobre APS

Para el caso de las fases estacionarias quirales a base del OL se tomaron espectros IR después de estar inmovilizadas sobre la APS para saber si la inmovilización del OL derivatizado se llevó a cabo. Para el caso de las fases estacionarias quirales a base del OL se tomaron espectros IR después de estar inmovilizadas sobre la APS para saber si la inmovilización del OL derivatizado se llevó a cabo. Se observa que después de la inmovilización aparece una banda en 1750 cm^{-1} (Figura 21) que corresponde a la presencia del grupo carbonilo y bandas entre $1550\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$ que se atribuyen a la presencia de un anillo aromático. Las bandas se observan con una intensidad baja debido a que la mayor parte de la fase estacionaria es sílica (banda característica de gran intensidad alrededor de 1000 cm^{-1}) y la cantidad de contenido orgánico es baja en comparación con esta. Sólo entre el 10%-20% de la fase estacionaria es correspondiente al carbohidrato-DFC.

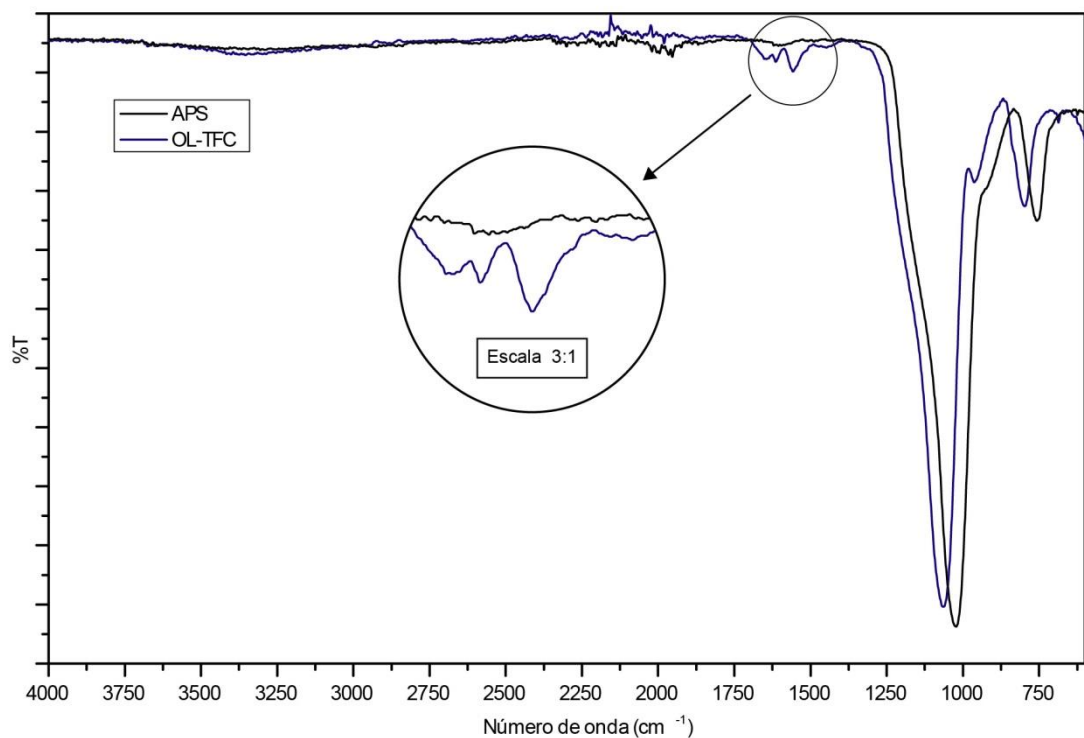


Figura 21. Espectros IR de a) APS y b) OL-DFC

Análisis termogravimétrico. La pérdida de peso para este tipo de FEQs también se desarrolló en dos etapas como se mencionó en el análisis de las fases en la sección anterior. Para las fases OL-DFC1 y OL-DFC2 la diferencia de pérdida de peso entre la APS y la fase indica que la cantidad de este sobre APS es mínima o no se tiene carbohidrato enlazado, por lo tanto, no se obtuvo ninguna fase estacionaria. Lo anterior se relaciona a la cantidad de carbohidrato utilizado para la síntesis de estas dos fases (0,15 g) en comparación con OL-DFC3 y OL-DFC4 (0,30 g). En la gráfica de TGA (Figura 22) se observa la diferencia de pérdida de peso de OL-DFC3 y de OL-DFC4 en comparación con la APS. La APS tuvo una pérdida de peso del 4,55% (descomposición del grupo 3-aminopropil), la fase OL-DFC3 una pérdida de 7,02% y la fase OL-DFC4 una pérdida del 14,05% debidas a la descomposición de contenido orgánico de bajo peso molecular y agua (primera etapa), anillos aromáticos y contenido de nitrógeno (segunda etapa).

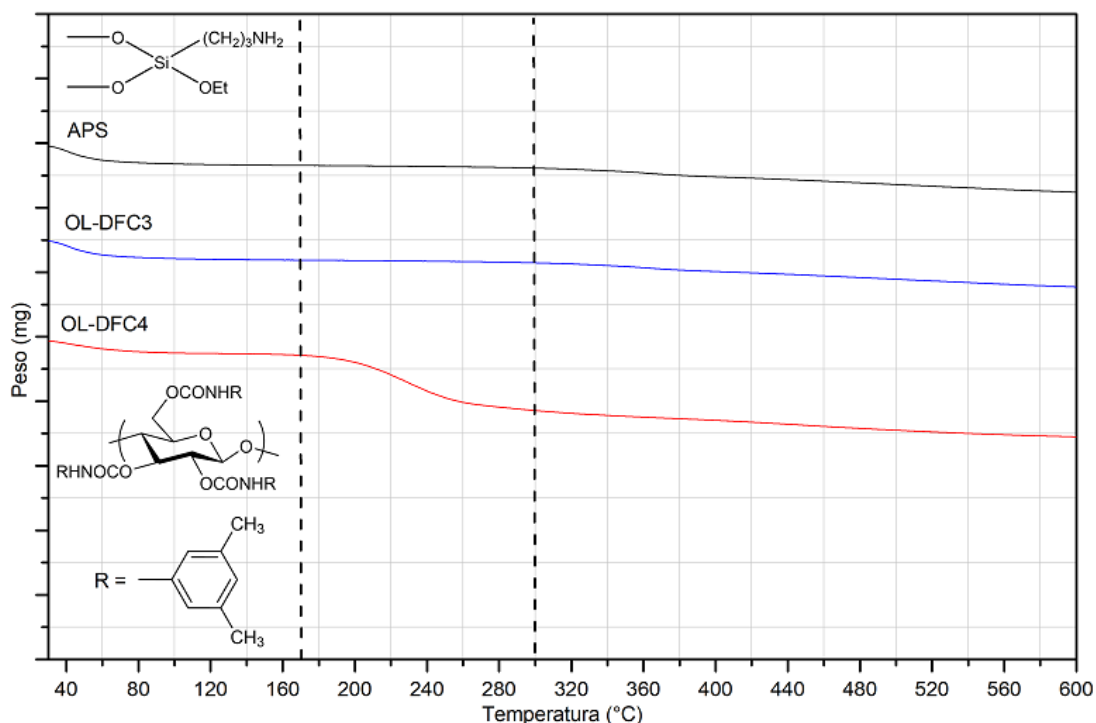


Figura 22. Comportamiento térmico de APS y las fases OL-DFC3, OL-DFC4

El aumento de pérdida de peso en la fase estacionaria indica que existe carbohidrato sobre la sílica y que si se realizó correctamente el procedimiento de síntesis. Se debe destacar, que la fase OL-DFC4 tuvo un mayor rendimiento (grado de deposición más alto) como se muestra en la Tabla 11, y por ello eso se observa una mayor pérdida de peso.

Tabla 11. Datos obtenidos del análisis termogravimétrico de las fases estacionarias a base del OL y APS

Muestra	Pérdida de peso total (%)	Rango de temperatura Etapa 1 (°C)	Rango de temperatura Etapa 2 (°C)	Grado de inmovilización ^a (%)
APS	4,55	200-300	300-600	-
OL-DFC3	7,02	230-300	300-600	2,47
OL-DFC4	14,05	175-300	290-600	9,50 ^b

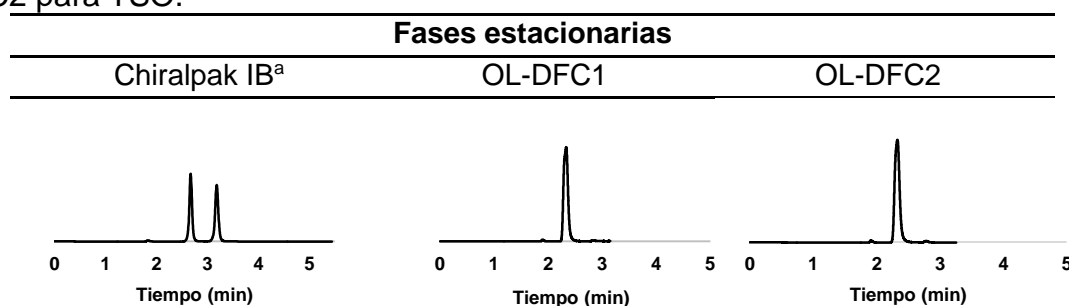
^a Valor estimado con base en la diferencia de pérdida de peso entre la fase estacionaria y la APS

^b Se toma como grado de deposición debido al método de síntesis

5.2.3. Resolución de las mezclas racémicas en las fases OL-DFC

De igual forma como se estudiaron las fases estacionarias de celulosa, almidón soluble y maltodextrina se llevó a cabo el estudio de las fases OL-DFC. La resolución de los racematos sobre las fases OL-DFC1 y OL-DFC2 (Tabla 12) indica que no se adquiere selectividad alguna frente a TSO. Complementando este resultado, gracias a los estudios térmicos discutidos en la sección anterior se corrobora que en las fases estacionarias la selectividad es nula gracias a la poca o nada de cantidad de OL en estas fases.

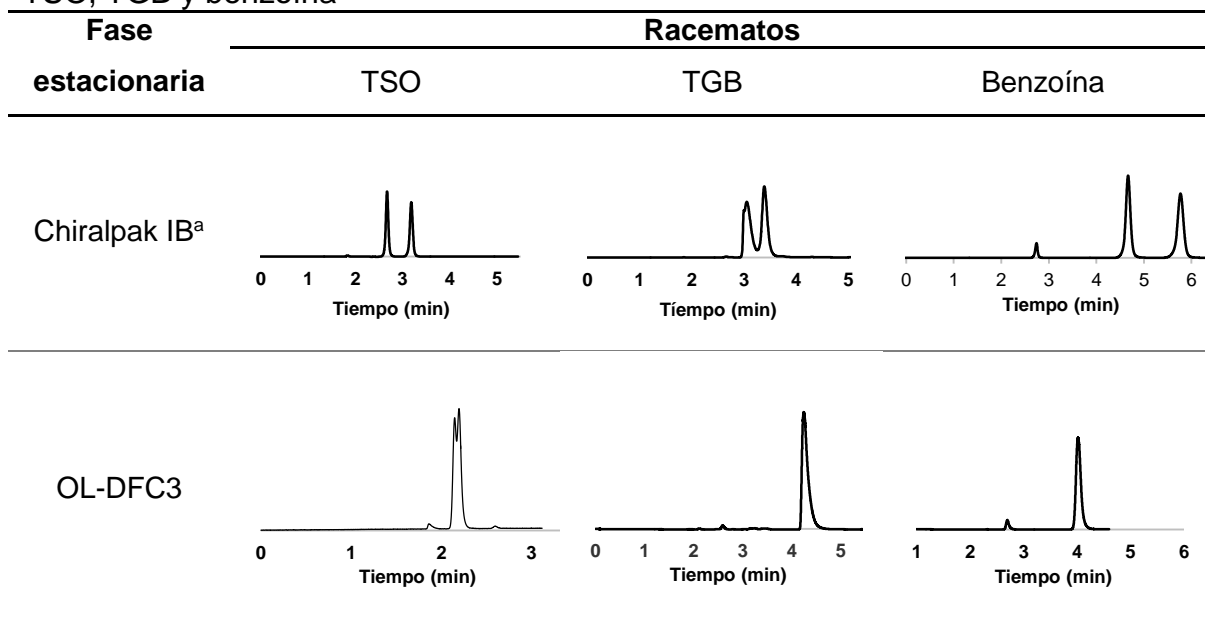
Tabla 12. Habilidad de reconocimiento quiral de Chiralpak IB, OL-DFC1 y OL-DFC2 para TSO.



^a Columna cromatográfica comercial a base de celulosa utilizada como referencia

Por otro lado, la fase OL-DFC3 adquiere una selectividad mínima con el TSO (Tabla 13), lo que nos indica que la fase estacionaria si tiene selectividad más no está optimizada, por esta razón, se decide estudiar sobre esta fase a los otros dos racematos (TGB y benzoína). No se logró obtener selectividad para TGB y benzoína sobre OL-DFC3 pero si se logra una buena retención (aproximadamente 4 minutos para ambos racematos) lo que es un buen indicio, para una buena columna cromatográfica y una buena separación, que la fase retiene a los analitos, en otras palabras, tiene un parámetro importante ya establecido.

Tabla 13. Habilidad de reconocimiento quiral de Chiralpak IB y OL-DFC3 para TSO, TGB y benzoína

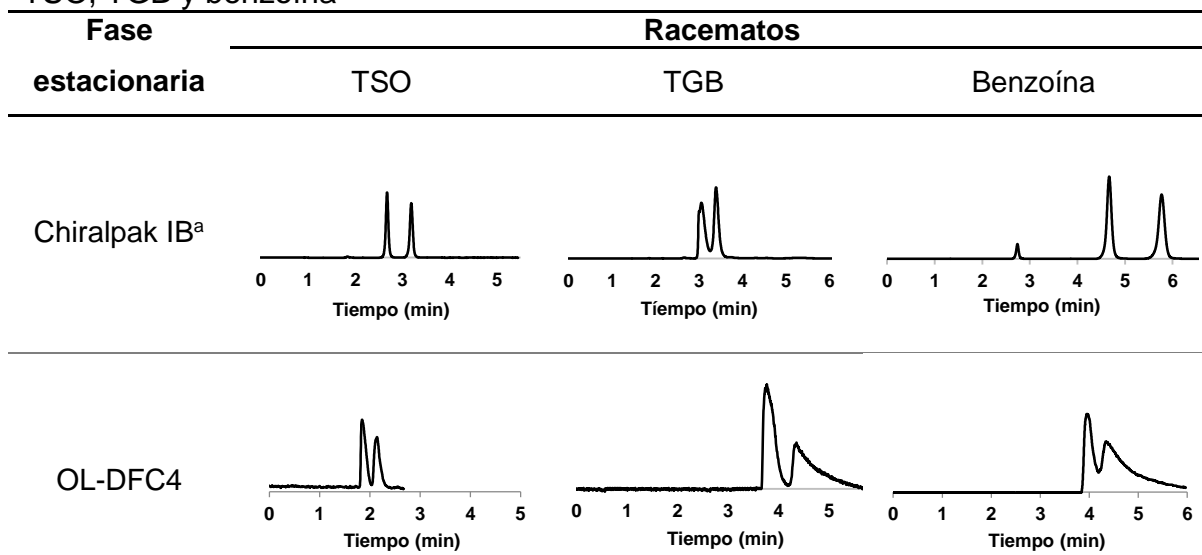


^a Columna cromatográfica comercial a base de celulosa utilizada como referencia

En cuanto a la cantidad de OL sobre APS se ha reportado que para una fase estacionaria a base de celulosa o amilosa la cantidad de carbohidrato es de un 5% en base a la APS ⁽³⁵⁾. La cantidad de OL-DFC sobre APS para esta fase aumenta y esto indica que este parámetro influye en la selectividad; al ser el OL un compuesto de cadena más corta, en comparación con la amilosa o la celulosa, se requiere de cantidades mayores para la síntesis de la fase estacionaria, debido a que, si se tiene poca cantidad, esta no será suficiente para que el OL-DFC interactúe completamente con los compuestos que se quieren separar (debido a su tamaño). Pero cabe destacar que se presume que la columna es estable, debido a que, no se observa “ruido” lo que indica que la inmovilización proporciona mayor estabilidad que la deposición gracias a que evita el movimiento del carbohidrato durante las corridas sobre la columna cromatográfica.

Para la última fase sintetizada (OL-DFC4), que difiere de OL-DFC3 en el método de síntesis (método 1 para OL-DFC3 y método 2 para OL-DFC4), se obtuvo una selectividad mayor como se destaca en la Tabla 14 y la Figura 23.

Tabla 14. Habilidad de reconocimiento quiral de Chiralpak IB y OL-DFC4 para TSO, TGB y benzoína



^a Columna cromatográfica comercial a base de celulosa utilizada como referencia

Como se mencionó anteriormente la estructura del carbohidrato afecta la selectividad de las FEQs y este OL al adquirir esa linealidad y estar compuesto a base de amilosa adquiere esa forma helicoidal que aumenta la selectividad en la nueva fase.

Para estas fases estacionarias de OL-DFC se variaron dos parámetros (Tabla 4), la cantidad de espaciador (4,4'-difenilmetano diisocianato) y la cantidad de OL sobre APS. Con base en los resultados obtenidos, se tiene que entre más cantidad de espaciador se adicione en la síntesis menor será la selectividad de las fases estacionarias, como se observa en los cromatogramas de la Tabla 12 para OL-DFC1 y en la Tabla 13 OL-DFC3. Este comportamiento se da debido a que el OL, al ser un polisacárido de cadena corta, al enlazarse más veces sobre la APS (mayor número de OH de la posición 6 enlazados a APS) menor cantidad de cadena sin enlazar queda en la superficie para poder interactuar con los analitos que atraviesan la columna y así se disminuye la selectividad de la fase estacionaria. En cuanto a la cantidad de OL sobre APS, como se discutió

anteriormente, a mayor cantidad de OL la selectividad aumenta; para la fase OL-DFC4 se adquiere una respuesta positiva en la resolución de los racematos debido a que no contiene espaciador (debido al método de síntesis) y mayor cantidad de OL sobre APS, por ende, esta nueva fase estacionaria cumple con los objetivos planteados para este estudio.

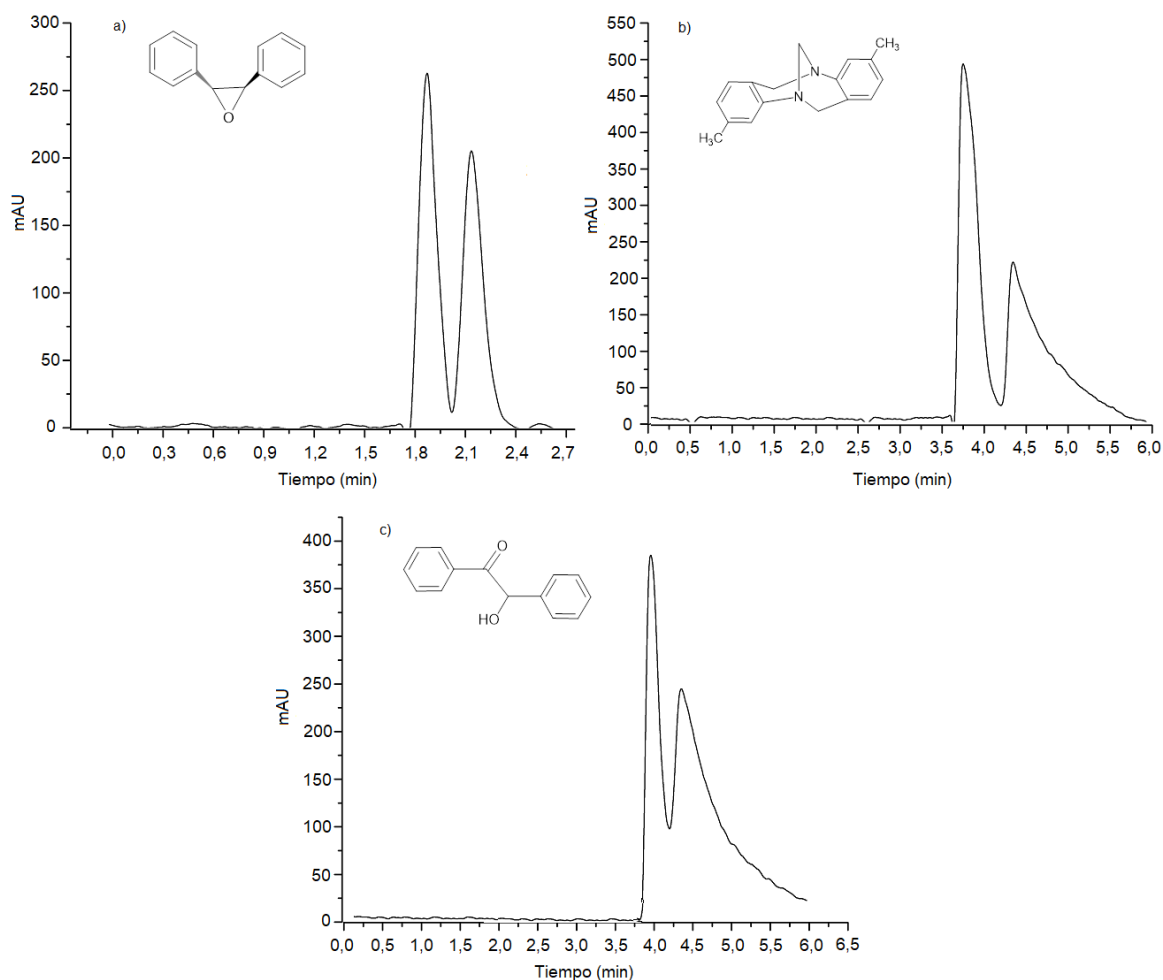


Figura 23. Resolución de a) TSO, b) TGB en y c) benzoína sobre OL-DFC4

Efecto de la fase móvil en la resolución de racematos. El estudio cromatográfico de las FEQs sintetizadas se llevó a cabo con una fase móvil de Hexano/isopropanol (90/10) en un estudio de HPLC en fase normal. Los

disolventes polares, como metanol, etanol, isopropanol o acetonitrilo, cambian los estados de enlace de hidrógeno de los grupos carbonilo y NH en las FEQs a base de polisacáridos ⁽⁴³⁾ y tienden a causar cambios en el grado de orden del polímero y en la movilidad de la cadena lateral. Por otra parte, la estructura polimérica permanece esencialmente sin cambios tras la adsorción del hexano (no polar) y por esta razón se busca la adición de un componente polar, en este caso, el isopropanol. Sin embargo, esta fase móvil (hexano/isopropanol) ha sido la que mejores resultados ha arrojado en los estudios de las FEQs para la resolución de estos racematos ⁽⁴⁴⁾. Complementando lo anterior, algunos estudios mencionan que los alcoholes ramificados, tales como 2-propanol y alcohol t-butílico, provocan una mayor torsión de las unidades de glucosa en la estructura helicoidal que los alcoholes lineales, tales como etanol, 1-propanol y 1-butanol ⁽²⁹⁾. Las ramificaciones parecen afectar la polaridad del grupo carbamato a través de un efecto inductivo y alterar el modo de interacción entre los derivados de polisacáridos y los racematos.

Efecto del DFC en la resolución de racematos. Los grupos polares de carbamato están situados preferiblemente en el interior y los grupos aromáticos hidrófobos se colocan fuera de la cadena polimérica ⁽⁴³⁾ de manera que los racematos polares pueden interactuar predominantemente con los residuos de carbamato mediante enlaces de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo (Figura 8). Por lo anterior, la benzoína que es el analito más polar muestra una retención mayor en el cromatograma de la columna utilizada como referencia (Tabla 14) y el analito con menor retención es el TSO. Estas interacciones parecen ser significativas para un reconocimiento quiral eficaz, especialmente en HPLC de fase normal usando eluyentes no polares (hexano).

Además de estas interacciones polares, las interacciones π - π entre los grupos fenilo de los fenilcarbamatos y un grupo aromático de un racemato también pueden desempeñar un papel importante en la selectividad, debido a que varios

compuestos aromáticos pueden resolverse en HPLC con la adición de un eluyente polar, manejando por esta parte el principio de fase reversa y los analitos estudiados en este trabajo son compuestos con anillos aromáticos en su estructura.

5.2.4. Caracterización de la columna cromatográfica.

La columna preparada en este trabajo con la fase OL-DFC4, se evaluó en función de parámetros cromatográficos con la intención de analizar esta nueva fase estacionaria, para la determinación de los compuestos quirales de interés en este estudio. Dado que no es posible obtener un parámetro independiente que describa, de forma objetiva, el poder de separación de una columna y la eficacia de la misma ⁽⁵⁾, se calcularon varios parámetros cromatográficos para cada compuesto quiral sobre OL-DFC4 y se compararon con la columna Chiralpak IB utilizada como referencia. Concretamente, los parámetros calculados fueron: el factor de retención (k), el factor de separación (α) y la resolución (R_s). Para calcular dichos parámetros se utilizaron las ecuaciones 1, 2, 3 y los datos expuestos en la Tabla 15.

$$\alpha = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$R_s = \frac{2\Delta t_R}{W_1 + W_2} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad \text{Ecuación 3}$$

Tabla 15. Tiempo muerto y tiempos de retención de TSO, TGB y benzoína sobre OL-DFC4 y Chiralpak IB

Compuesto	OL-DFC4			CHIRALPAK IB		
	t ₀	t _{R1}	t _{R2}	t ₀	t _{R1}	t _{R2}
TSO	1,56	1,83	2,10	1,82	2,67	3,18
TGB	1,84	3,75	4,31	2,60	3,05	3,39
Benzoína	1,80	3,93	4,32	2,72	4,67	5,77

En la Figura 23 se muestran los cromatogramas de la resolución de los racematos sobre OL-DFC4; en ellos se logra ver la separación de los enantiómeros y los parámetros cromatográficos se detallan en la Tabla 16 junto con los parámetros de la columna de referencia.

Tabla 16. Parámetros de separación enantiomérica de TSO, TGB y benzoína sobre OL-DFC4 y Chiralpak IB

Compuesto	OL-DFC4				CHIRALPAK IB			
	k ₁	k ₂	α	R _s	k ₁	k ₂	α	R _s
TSO	0,17	0,34	2,0	1,4	0,46	0,75	1,6	7,85
TGB	1,03	1,34	1,3	1,6	0,17	0,30	1,7	2,59
Benzoína	1,18	1,40	1,2	1,3	0,72	1,12	1,1	8,73

Para valores altos de α y bajos de R_s , la separación podrá conseguirse mediante un aumento de eficacia, mientras que para valores bajos de α no es práctico intentar la separación en base a un aumento de eficacia y debe procederse a un cambio del sistema ⁽⁵⁾. En el caso de esta FEQ los valores de α indican que si se dio una separación de dos compuestos diferentes pero con una baja R_s , lo que indica que, la fase estacionaria funciona pero se debe optimizar.

La separación entre dos bandas cromatográficas, puede estudiarse en función de dos parámetros, el factor de separación (α) y la resolución (R_s) (ecuaciones 1 y 2 respectivamente). Una separación total de dos bandas requerirá valores de α y R_s , lo más elevados posible; si el valor de R_s es menor a 1,5, los picos se encuentran superpuestos y la determinación de valores de pureza enantiomérica se

dificultará ⁽⁴⁾. Un valor elevado de R_s puede conseguirse aumentando la eficacia de la columna (mayor longitud, menores dispersiones de banda, entre otros) mientras que el valor de α es constante para cada sistema cromatográfico y solamente podrá variarse alterando la fase estacionaria o móvil ⁽⁴⁵⁾. La solución de un problema real de separación entre dos bandas deberá darse en función de los valores de α y R , que presente.

Lo anterior expuesto, se complementa con la forma (no simétrica) de los picos en los cromatogramas de TGB y benzoína (Figura 23, b y c respectivamente) que presentan un ensanchamiento del segundo pico y no se observa dicha simetría en este; sin embargo, las separaciones enantioméricas suelen presentar este fenómeno en los picos cromatográficos, siempre y cuando, el área de cada pico sea igual o muy aproximada entre sí ⁽⁴⁾ (la separación debe mostrar que se da en 50-50% para corroborar que es el racemato el que se está separando). En la Tabla 17 se listan los valores de área de cada pico para cada analito comprobando la separación enantiomérica sobre la fase estacionaria OL-DFC4.

Tabla 17. Áreas y porcentajes de área de los picos cromatográficos de TSO, TGB y benzoína sobre OL-DFC4

Compuesto	Área ₁	Área ₂	%A ₁	%A ₂
TSO	474,5	462,7	50,6	49,4
TGB	4467,5	4461,0	50,0	50,0
Benzoína	3448,8	3465,4	49,9	50,1

La retención es un parámetro esencial en una separación cromatográfica, ya que, para todo compuesto el valor óptimo debe estar entre 1 y 5; valores superiores no suponen un aumento significativo de la resolución, pero dan lugar a tiempos de retención excesivos ⁽⁴⁵⁾. Los valores de k menores a 1 (Tabla 16) indican que la retención es débil y que la fase estacionaria OL-DFC4 tiene selectividad pero carece de fuerza para retener a los analitos un poco más y mejorar con eso la separación. Se observó que la fase OL-DFC4 al ser depositada y no enlazada aún

presenta ruido y la línea base no está bien definida (Figura 23), pero fue la única fase de este trabajo que presentó selectividad con los tres analitos, esto quiere decir, que se logró la obtención de un nueva FEQ a base de polisacárido.

6. CONCLUSIONES

- Se realizó el estudio del comportamiento de celulosa, almidón soluble y maltodextrina modificados con 3,5-dimetilfenil isocianato como fases estacionarias quirales, lográndose una síntesis exitosa; aunque, algunas fases estacionarias obtenidas no fueron selectivas para la resolución de TSO. El resultado indicó que la estructura de los carbohidratos es fundamental en la selectividad de las fases estacionarias sintetizadas y que se logró una ruta de síntesis y revestimiento de la fase sobre sílica correctamente.
- Se obtuvo un nuevo oligosacárido lineal a base de la estructura de amilosa (proveniente de maltodextrina), con un grado de polimerización entre 20-30, el cual se utilizó como precursor para la síntesis de una nueva FEQ, donde al ser de menor peso molecular adquiere ventajas como mejora su solubilidad, reduce el tiempo de reacción y la cantidad de agentes derivatizantes, por lo tanto, el costo de producción será menor y la síntesis menos compleja, obteniendo selectividad en la separación de enantiómeros.
- Los valores de α en la separación de TSO, TGB y benzoína sobre la nueva fase estacionaria quiral obtenida, OL-DFC4, indican que se adquirió enantioselectividad sobre esta fase estacionaria y que el OL-DFC puede ser utilizado como selector quiral en HPLC. Por otra parte, la resolución de las separaciones indica que se debe estudiar y optimizar la fase estacionaria para la obtención de una FEQ en la que se puedan separar un número mayor de racematos y sea apta para el uso en estudios farmacológicos.

- Se determinó que con la fase estacionaria sintetizada por el método 2 (depositada sobre APS), OL-DFC4, se logró mejor selectividad que con las fases sintetizadas por el método 1 (enlazadas sobre APS); con base en los estudios correspondientes realizados, se logró establecer que por los dos métodos descritos en este trabajo se logra cierta selectividad y que se pueden obtener fases tanto depositadas como enlazadas a base de OL-DFC, dando mejor resultado las fases depositadas debido al tamaño del polisacárido; para mejorar el proceso por el método 1 se debe encontrar un espaciador adecuado para enlazar el carbohidrato derivatizado sin perder selectividad, ya que, el utilizado en este trabajo (4,4'-difenilmetano diisocianato) disminuye la selectividad con este tipo de polisacárido.
- Se obtuvo una caracterización exitosa de la fase estacionaria OL-DFC4 con base en los parámetros cromatográficos analizados (k , α y R_s). La columna a base de OL-DFC presentó una buena separación de los compuestos y si se logra una retención sobre la columna; para llegar a una columna con una alta resolución se deben cambiar las condiciones de análisis hasta coincidir con un resultado óptimo y comercial.

7. ESTUDIOS FUTUROS

- Optimizar las FEQs a base del OL estudiando diferentes parámetros como el tamaño de poro de la sílica gel y tipos de espaciadores para mejorar la inmovilización de los carbohidratos-DFC e incrementar la enantioselectividad.
- Realizar un estudio del comportamiento de las fases OL-DFC con diferentes eluyentes (fases móviles); la adición de un aditivo polar (etanol, metanol, isopropano, butanol) ^(29; 43) mejora la selectividad mediante la activación de los grupos funcionales de los derivatizados y así conseguir una mejor resolución.
- Determinar la pureza del OL obtenido a partir de maltodextrina para purificar este precursor y realizar estudios estructurales por medio de técnicas como la cromatografía de exclusión (permeación en gel), análisis de masas y resonancia magnética, para establecer un protocolo de síntesis para la nueva fase estacionaria quiral.

BIBLIOGRAFÍA

1. SUBRAMANIAN, Ganapathy. *A practical approach to Chiral Separations by Liquid Chromatography*. New York : VCH, 1994.
2. ALI, Imran y ABOUL-ENEIN, Hassan. Role of polysaccharides in chiral separations by liquid chromatography and capillary electrophoresis. [aut. libro] Ganapathy Subramanian . *Chiral separations techniques*. Tercera. Weinheim : WILEY-VCH, 2007. 29-93 p.
3. KANNAPPAN, Valliappan y KANTHIAH, Selvakumar. *Enantiopurity assessment of chiral switch of ondansetron by direct chiral HPLC*. Enero de 2017, *Chromatographia*, Vol. 80. 8 p. 229–236.
4. AHUJA, Satinder. *Chiral separations by chromatography*. Washington D.C. : American Chemical Society, 2000.
5. KEUNCHKARIAN, Sonia. Estudio cromatográfico de asociación entre solutos y selectores quirales en fase móvil. *Trabajo de Tesis Doctoral*. La plata, Argentina : Universidad Nacional de La Plata. Facultad de ciencias exactas. Departamento de química, 2009. 128 p.
6. SCHURIG, Volker. *Separation of enantiomers by gas chromatography*. 2001, En: *Journal of Chromatography*, Vol. 906. 24 p. 275-299.
7. BOJARSKI, Jacek. *Recent progress in chromatographic enantioseparations*. Enero de 1997, En: *Chemia analityczna*, Vol. 42. 46 p. 139-185.
8. TERFLOTH, Gerald. *Enantioseparations in super- and subcritical fluid chromatography*. 2001, En: *Journal of Chromatography A*, Vol. 906. 6 p. 301-307.
9. WILLIAMS, Karen y SANDER, Lane. *Enantiomer separations on chiral stationary phases in supercritical fluid chromatography*. 1997, En: *Journal of Chromatography A*, Vol. 785. 9 p. 149-158.
10. ABOUL-ENEIN, Hassan; EL-AWADY, Mahmoud; HEARD, Charles y NICHOLLS, Paul. *Application of thin-layer chromatography in enantiomeric chiral analysis - an overview*. Marzo de 1999, En: *Biomedical Chromatography* , Vol. 13. 6 p. 531-537.

11. GÜBITZ, Gerald y SCHMID, Martin. *Recent progress in chiral separation principles in capillary electrophoresis*. 2000, En: *Electrophoresis*, Vol. 21. 23 p. 4112-4135.
12. WISTUBA, Dorothee y SCHURIG, Volker. *Enantiomer separation of chiral pharmaceuticals by capillary electrochromatography*. 2000, En: *Journal of Chromatography A*, Vol. 875. 21 p. 255-276.
13. BERTHOD, Alain. *Chiral Recognition in Separation Methods Mechanisms and Applications*. Villeurbanne : Spinger, 2010.
14. MAIER, Norbertm; NICOLETTI, Lorenzo; LÄMMERHOFER, Michael y LINDNER, Wolfgang. *Enantioselective Anion Exchangers Based on Cinchona Alkaloid-Derived Carbamates: Influence of C8/C9 Stereochemistry on Chiral Recognition*. 1999, En: *Chirality*, Vol. 11. 7 p. 522-528.
15. MANDL, Alexandra; NICOLETTI, Lorenzo; LÄMMERHOFER, Michael y LINDNER, Wolfgang. *Quinine versus carbamoylated quinine-based chiral anion exchangers A comparison regarding enantioselectivity for N-protected amino acids and other chiral acids*. July de 1999, En: *Journal of Chromatography A*, Vol. 858. 11 p. 1 - 11.
16. OBERLEITNER, W.R.; MAIER, N.M. y LINDNER, W. *E nantioseparation of various amino acid derivatives on a quinine based chiral anion-exchange selector at variable temperature conditions. Influence of structural parameters of the analytes on the qapparent retention and enantioseparation characteristics*. 2002, En: *Journal of Chromatography A*, Vol. 960. 11 p. 97-108.
17. TAI, Han. *Mechanism of action of pullulanase*.1969, En: *Febs Letters* , Vol. 5. 4 p. 85-88.
18. OKAMOTO, Yoshio y YASHIMA, Eiji. *Polysaccharide Derivatives for Chromatographic Separation of Enantiomers*. 1998, En: *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 37. 24 p. 1020-1043.
19. IKAI, Tomoyuki; YAMAMOTO, Chiyo; KAMIGAITO, Masami y OKAMOTO, Yoshio. *Immobilized Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases for HPLC*. 2, 2006, En: *Polymer Journal*, Vol. 38. 18 p. 91-108.
20. LÄMMERHOFER, Michael. *Chiral recognition by enantioselective liquid chromatography: Mechanisms and modern chiral stationary phases*. 2010, En: *Journal of Chromatography A*, Vol. 1217. 43 p. 814–856.

- 21.** PIRKLE, William. *Assignment of Absolute Configuration to an Improved Enantioselective Naproxen Selector*. 1994, En: *Chirality*, Vol. 6. 8 p. 615-622.
- 22.** BARHATE, Chandan, et al. *High efficiency, narrow particle size distribution, sub-2 um based*. 2015, En: *Analytica Chimica Acta*, Vol. 898. 10 p. 128-137.
- 23.** NESTERENKO, Pavel. *Application of amino acid-bonded silicas as ion exchangers for the separation of anions by single-column ion chromatography*. 1992, En: *Journal of Chromatography*, Vol. 605. 6 p. 199-204.
- 24.** HAGINAKA, Jun; WAHAB, Farooq; BREITBACH, Zachary y BELL, David. *DirectProtein-based chiral stationary phases for high-performance liquid*. 2001, En: *Journal of Chromatography A*, Vol. 906. 21 p. 253–273.
- 25.** OKAMOTO, Yoshio. *Chiral Polymers for Resolution of Enantiomers*. 2009, En: *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, Vol. 47. 9 p. 1731–1739.
- 26.** YAMAMOTO, Chiyo y OKAMOTO, Yoshio. *Optically Active Polymers for Chiral Separation*. 2004, En: *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, Vol. 77. 31 p. 227-257.
- 27.** SHEN, Jun; IKAI, Tomoyuki y OKAMOTO, Yoshio. *Synthesis and chiral recognition of novel amylose derivatives containing*. 2010, En: *Journal of Chromatography A*, Vol. 1217. 7 p. 1041–1047.
- 28.** GRANSTRÖM, Mari. *Cellulose Derivatives: Synthesis, Properties and Applications*. [Trabajo de Tesis Doctoral]. Helsinki : Universidad de Helsinki. Facultad de Ciencias. Departamento de química, 2009. 120 p.
- 29.** KATOH, Yasunaka. *Chiral recognition ability of cellulose derivatives bearing pyridyl and bipyridyl residues as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography*. 2011, En: *Polymer Journal*, Vol. 43. 7 p. 84–90.
- 30.** GURDAL, Enise Ece y YARIM, Mine. *Comparison of Separation Performance of Polysaccharide-Based Chiral Stationary Phases in Enantioseparation of 1-(4-Chlorobenzhydryl)Piperazine Benzamide Derivatives by HPLC*. 2017, En: *Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 72. 2 no. 4 p. 213–216.
- 31.** YAMAMOTO, Chiyo; YASHIMA, Eiji y OKAMOTO, Yoshio. *Structural Analysis of Amylose Tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) by NMR Relevant to Its Chiral Recognition Mechanism in HPLC*. 2002, En: *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 124. 42 no. 7 p. 2583-2589.

- 32.** QU, Hai-tao; LI, Jun-qing; WU, Guang-shun; SHEN, Jun; SHEN, Xian-de y OKAMOTO, Yoshio. *Preparation and chiral recognition in HPLC of cellulose 3,5-dichlorophenylcarbamates immobilized onto silica gel*. 2011. En: Journal of Separation Science, Vol. 34. 6 p. 536–541.
- 33.** YE, Yun K, et al. *Memory effect of mobile phase additives in chiral separations on a Chiralpak AD column*. 2002. En: Journal of Chromatography A, Vol. 945. 8 p. 139–146.
- 34.** CHEN, Xiaoming; ZOU, Hanfa; ZHANG, Qiang; NI, Jianyi y ZHANG, Zengzi. *Synthesis of Chemically Bonded Cellulose Trisphenylcarbamate Chiral Stationary Phases for Enantiomeric Separation*. Julio, 2002. En: Journal of Chromatographic Science, Vol. 40. 6 p. 315-320.
- 35.** ZHANG, Xiaoli; WANG, Litao; DONG, Shuqing; ZHANG, Xia; WU, Qi; Zhao, Liang y SHI, Yanping. *Nanocellulose 3, 5-Dimethylphenylcarbamate Derivative Coated Chiral Stationary Phase: Preparation and Enantioseparation Performance*. Mayo, 2016. En: Chirality, Vol. 28. 6 p. 376–381.
- 36.** TANG, Shouwan; LIU, Guihua; LI, Xiao; JIN, Zhao; WANG, Fang; PAN, Fuyou y OKAMOTO, Yoshio. *Improved preparation of chiral stationary phases via immobilization of polysaccharide derivative-based selectors using diisocyanates*. 2011, En: Journal of Separation Science, Vol. 34. 9 p. 1763–1771.
- 37.** Ingenieríaquímica.net. *El portal de los ingenieros químicos en español*. [En línea] Antonio Jesús, 26 de Mayo de 2014. [Citado el: 21 de Julio de 2017.] Disponible en internet: <https://www.ingenieriaquimica.net/articulos/361-pirolisis>.
- 38.** CHANKVETADZE, Bezhan; YASHIMA, Eiji y OKAMOTO, Yoshio. *Chloromethylphenylcarbamate derivatives of cellulose as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography*. 1994. Journal of Chromatography A, Vol. 670. 11 p. 39-49.
- 39.** DOKIC, Ljubica y DOKIC, Petar. *Relation between Viscous Characteristics and Dextrose Equivalent of Maltodextrins*. Noviembre, 2004. En: Starch - Stärke, Vol. 56. 11 no. 6 p. 520–525.
- 40.** SUN, Junliang, ZHAO, Ruixiang; ZENG, Jie; LI, Guanglei y LI, Xinhua. *Characterization of Dextrins with Different Dextrose Equivalents*. 2010. En: Molecules, Vol. 15. 12 p. 5162-5173.

- 41.** DOKIC, Petar. *Molecular characteristics of maltodextrins and rheological behaviour of diluted and concentrated solutions*. 1998. En: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Vol. 141. 6 p. 435–440.
- 42.** JANE, Jay-lin; WONG, Kit-sum; McPERSON, Andrew. *Branch-structure difference in starches of A- and B-type X-ray patterns revealed by their Naegeli dextrins*. 1997. En: *Carbohydrate Research*, Vol. 300. 9 p. 219-227.
- 43.** WANG, Tao; WENSLOW, Robert. *Effects of alcohol mobile-phase modifiers on the structure and chiral selectivity of amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase*. Julio, 2003. En: *Journal of Chromatography A*, Vol. 1015. 12 p. 99–110.
- 44.** HELMY, Roy y WANG, Tao. *Selectivity of amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase as a function of its structure altered by changing concentration of ethanol or 2-propanol mobile-phase modifier*. 2005. En: *Journal of Separation Science*, Vol. 28. 4 p. 189–192.
- 45.** FANALI, Salvatore, et al. (ed.). *Liquid chromatography: Fundamentals and instrumentation*. s.l. : Elsevier, 2017. 67 p.