

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Resolución enantiomérica de compuestos volátiles
quirales mediante técnicas multidimensionales:
cromatografía en lecho móvil simulado con flúidos
supercríticos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carmen Barba González-Albo

Directoras

**Marta Herráiz Carasa
Marta María Calvo Rodríguez**

Madrid, 2011

ISBN: 978-84-695-0989-0

© Carmen Barba González-Albo, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**RESOLUCIÓN ENANTIOMÉRICA DE COMPUESTOS
VOLÁTILES QUIRALES MEDIANTE TÉCNICAS
MULTIDIMENSIONALES. CROMATOGRAFÍA EN
LECHO MÓVIL SIMULADO CON FLUIDOS
SUPERCRÍTICOS**

TESIS DOCTORAL

CARMEN BARBA GONZÁLEZ-ALBO



DEPARTAMENTO DE PROCESOS
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y
NUTRICIÓN. CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (ICTAN-CSIC)

Madrid, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**RESOLUCIÓN ENANTIOMÉRICA DE COMPUESTOS
VOLÁTILES QUIRALES MEDIANTE TÉCNICAS
MULTIDIMENSIONALES. CROMATOGRAFÍA EN LECHO
MÓVIL SIMULADO CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS**

Memoria que para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas presenta:

CARMEN BARBA GONZÁLEZ-ALBO

DEPARTAMENTO DE PROCESOS
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y
NUTRICIÓN. CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (ICTAN-CSIC)



Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dra. MARTA HERRAIZ CARASA y Dra. MARTA MARÍA CALVO
RODRÍGUEZ

Tutora: Dra. MARÍA EUGENIA DE LEÓN GONZÁLEZ

Madrid, 2011



D^a MARTA HERRAIZ CARASA, DRA. EN CIENCIAS QUÍMICAS Y PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN DEL CSIC Y **D^a MARTA MARÍA CALVO RODRÍGUEZ**, DRA. EN VETERINARIA E INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN DEL CSIC

C E R T I F I C A N que la Memoria titulada “**RESOLUCIÓN ENANTIOMÉRICA DE COMPUESTOS VOLÁTILES QUIRALES MEDIANTE TÉCNICAS MULTIDIMENSIONALES. CROMATOGRAFÍA EN LECHO MÓVIL SIMULADO CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS**” que presenta **Carmen Barba González-Albo**, Licenciada en Química por la Universidad de Zaragoza, para optar a la obtención del Grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Procesos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC).

Y para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Madrid, a cinco de mayo de dos mil once.

Fdo. Dra. Marta Herraiz Carasa

Fdo. Dra. Marta M. Calvo Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha podido ser realizado gracias al apoyo de personas e instituciones a las que sinceramente quiero expresar mi agradecimiento.

En primer lugar, a mis directoras de tesis, que me dieron su dedicación, experiencia y conocimientos a lo largo de todo el proceso de desarrollo de la investigación: la Dra. Marta Herraiz Carasa, quien me invitó a participar en este emocionante proyecto y me enseñó con su ejemplo, y la Dra. Marta María Calvo, que me acogió afectuosamente en el laboratorio.

También quisiera dar las gracias a las instituciones que sustentaron esta investigación: al Ministerio de Ciencia e Innovación, por la beca de Formación del Personal Investigador bajo la que he realizado el trabajo, y al Ayuntamiento de Madrid, el Gobierno de Aragón y la Residencia de Estudiantes, por permitirme disfrutar de un entorno inmejorable para desarrollar la tesis doctoral entre amigos. De la misma forma, quiero agradecer el respaldo del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y del Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid, en concreto de mi tutora la Dra. María Eugenia de León.

Al Dr. Guillermo Santa-María, que siguió mi investigación de cerca y la enriqueció con sus ideas.

A Ricardo Medina, que me enseñó meticulosamente y me ayudó con apacible cariño a lo largo de toda la parte experimental.

A Pepa Rodríguez, quien me cuidó, mimó y enseñó, y de cuya entusiasta mirada tanto he aprendido.

Al Dr. Ajay K. Ray y su grupo de investigación, por acogerme amablemente durante mi estancia en la *University of Western Ontario*.

A mis compañeras de laboratorio a lo largo de estos años, así como al personal del centro de Química Orgánica Manuel Lora-Tamayo y a los compañeros y amigos de otros departamentos, quienes me han brindado su colaboración desde el principio. También al personal de las empresas PID Eng&Tech y Konik, que han colaborado técnica y activamente en el proyecto. A mis amigas aragonesas.

A mis hermanas, mi hermano y sobrinos, que participan en mi alegría.

A mis padres, por transmitirme la importancia de los valores de la ilusión, la voluntad y el esfuerzo.

A Alberto, por alentar y acrecentar mis inquietudes.

ÍNDICE

	Página
PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS	1
Esquema: Objetivos y Plan de trabajo	7
TERMINOLOGÍA	11
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1. Interés de la separación y obtención de compuestos quirales	16
1.1.1. Rutas para la obtención de enantiómeros puros a escala preparativa.....	17
1.1.2. Técnicas cromatográficas unidimensionales para la separación de compuestos quirales a escala analítica.....	19
1.1.3. Fases estacionarias quirales en cromatografía: de gases (GC), líquidos (HPLC) y fluidos supercríticos (SFC).....	20
1.1.3.1. Fase estacionaria quiral: heptakis-(2,3,6-tri- <i>O</i> -metil)- β -ciclodextrina.....	22
1.1.4. Fase móvil: propiedades fisicoquímicas de los fluidos supercríticos.....	22
1.1.5. Nuevas exigencias en Química Analítica.....	27
1.2. Evolución de las técnicas cromatográficas: cromatografía multidimensional.	
Escala analítica	29
1.2.1. Requisitos para el acoplamiento de dos técnicas de separación.....	31
1.2.2. Acoplamiento directo de cromatografía de líquidos y cromatografía de gases (LC-GC).....	32
1.2.2.1. Interfaz <i>Through Oven Transfer Adsorption Desorption</i> (TOTAD).....	39
1.2.3. Cromatografía de gases multidimensional (MDGC).....	41
1.3. Cromatografía en lecho móvil simulado con fluidos supercríticos (SF-SMB).	
Escala preparativa	44
1.3.1. Introducción cronológica a la cromatografía en lecho móvil simulado (SMB).....	44
1.3.2. Cromatografía por etapas: antecedentes de SMB.....	45
1.3.3. Conceptos teóricos de cromatografía en lecho móvil verdadero (TMB) y SMB....	46
1.3.4. Análisis de muestras reales con SMB.....	51
1.3.5. Consideraciones en el diseño del equipamiento para plantas piloto de SMB.....	52
2. MATERIALES Y MÉTODOS	57
2.1. Preparación de columnas rellenas para GC con heptakis-(2,3,6-tri-<i>O</i>-metil)-β- ciclodextrina	57
2.1.1. Tubo.....	58
2.1.2. Soporte sólido.....	58
2.1.3. Fase estacionaria.....	58
2.1.4. Impregnación del soporte con la fase estacionaria.....	59
2.1.5. Introducción del relleno en la columna.....	60
2.1.6. Inmovilización de la fase estacionaria.....	60
2.2. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri-<i>O</i>-metil)-β- ciclodextrina en columnas rellenas para GC en función de su concentración en la fase estacionaria	61
2.2.1. Descripción del equipo.....	61
2.2.2. Muestras.....	62
2.2.3. Caracterización de columnas rellenas.....	62
2.2.4. Elección del porcentaje de heptakis-(2,3,6-tri- <i>O</i> -metil)- β -ciclodextrina.....	65

<u>2.3. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)-β-ciclodextrina en columnas capilares para GC en función de la temperatura.....</u>	65
2.3.1. Descripción del equipo.....	65
2.3.2. Muestras.....	66
2.3.2.1. Inyección convencional.....	66
2.3.2.2. Inyección del espacio de cabeza (HS).....	66
<u>2.4. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)-β-ciclodextrina en columnas analíticas y semi-preparativas para HPLC en función de la composición de la fase móvil y del pH.....</u>	66
2.4.1. Descripción del equipo.....	66
2.4.2. Muestras.....	67
2.4.3. Fase móvil.....	67
2.4.4. Fase estacionaria.....	67
2.4.4.1. Columna Nucleodex- β -ciclodextrina-per-metilada (100 mm x 4,6 mm).....	68
2.4.4.2. Columna Nucleodex- β -ciclodextrina-per-metilada (200 mm x 4,0 mm).....	68
2.4.4.3. Conexión de columnas Nucleodex- β -ciclodextrina-per-metilada.....	68
2.4.4.4. Columna Chiracel OD (250 mm x 4,6 mm).....	69
<u>2.5. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)-β-ciclodextrina para SFC en función de la densidad de la fase móvil.....</u>	70
2.5.1. Descripción del equipo.....	70
2.5.1.1. Módulo de alimentación.....	70
2.5.1.2. Módulo de inyección.....	71
2.5.1.3. Módulo de separación.....	72
2.5.1.4. Módulo de recogida.....	73
2.5.2. Muestras.....	74
2.5.3. Fase móvil.....	74
2.5.4. Fase estacionaria: columna Nucleodex- β -ciclodextrina-per-metilada (250 mm x 10 mm).....	74
<u>2.6. Determinación de excesos enantioméricos de compuestos quirales en muestras complejas mediante RPLC-GC-MS y MDGC-MS.....</u>	74
2.6.1. Análisis de muestras complejas mediante RPLC-GC-MS.....	75
2.6.1.1. Muestras.....	75
2.6.1.2. Preseparación de muestra en LC.....	76
2.6.1.3. Transferencia de LC a GC empleando la interfaz TOTAD.....	76
2.6.1.4. Determinación de excesos enantioméricos mediante GC-MS.....	77
2.6.2. Análisis de muestras complejas mediante MDGC-MS.....	78
2.6.2.1. Muestras.....	78
2.6.2.2. Análisis de compuestos volátiles mediante inyección directa en un PTV.....	78
2.6.2.3. Determinación de excesos enantioméricos mediante MDGC-MS.....	78
<u>2.7. Diseño y construcción de una planta de SF-SMB.....</u>	80
2.7.1. Planta de SF-SMB.....	80
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
<u>3.1. Reconocimiento quiral de heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)-β-ciclodextrina mediante GC, HPLC y SFC utilizando disoluciones modelo.....</u>	83
3.1.1. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina con columnas rellenas para GC en función de su concentración en la fase estacionaria.....	84
3.1.2. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina con columnas capilares para GC en función de la temperatura.....	90

3.1.2.1. Inyección convencional.....	92
3.1.2.2. Inyección del espacio de cabeza (HS).....	96
3.1.3. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri- <i>O</i> -metil)- β - ciclodextrina con columnas analíticas para HPLC en función de la composición de la fase móvil y el pH	98
3.1.4. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri- <i>O</i> -metil)- β - ciclodextrina para SFC en función de la densidad de la fase móvil.....	106
3.2. Determinación de excesos enantioméricos de compuestos quirales en muestras complejas mediante RPLC-GC-MS y MDGC-MS.....	107
3.2.1. Separación de enantiómeros en muestras complejas reales mediante RPLC-GC- MS.....	108
3.2.2. Separación de enantiómeros en muestras complejas reales mediante MDGC-MS..	120
3.2.3. Comparación de excesos enantioméricos de compuestos volátiles quirales en muestras complejas.....	124
3.3. Diseño y construcción de la planta de SF-SMB.....	125
3.3.1. Condiciones previas para el diseño de la planta de SF-SMB.....	125
3.3.2. Optimización del diseño de la planta de SF-SMB.....	128
3.3.3. Construcción de la planta de SF-SMB.....	131
3.3.3.1. Módulo de alimentación de eluyente.....	132
3.3.3.2. Módulo de alimentación de muestra.....	134
3.3.3.3. Módulo de separación.....	135
3.3.4. Control y automatismo de la planta de SF-SMB.....	137
3.3.5. Sistema de seguridad de la planta de SF-SMB.....	140
3.3.6. Puesta a punto de la planta de SF-SMB.....	140
3.3.6.1. Estanqueidad.....	140
3.3.6.2. Simulación del movimiento del lecho.....	142
3.3.7. Prototipo de SF-SMB.....	148
3.3.8. Protocolo.....	152
3.3.9. Parada.....	152
3.3.10. Mantenimiento.....	152
3.3.11. Análisis realizados con la planta de SF-SMB.....	153
4. CONCLUSIONES.....	165
5. BIBLIOGRAFÍA.....	171

PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS

Aunque desconocida o ignorada en ocasiones, la quiralidad es un aspecto esencial en la Naturaleza ya que se puede afirmar que, tanto a nivel macroscópico como molecular, no es una particularidad poco frecuente sino que, por el contrario, es destacable su ubicuidad. A la propiedad de los objetos de no ser superponibles con su imagen especular se la denomina quiralidad. Desde en los átomos hasta en los seres humanos y, por tanto, en la Naturaleza en general, se observa este tipo de asimetría con respecto a un plano, diciéndose por ello que tienen lateralidad o quiralidad. Indiscutiblemente, no todos los objetos o moléculas son quirales; aquellos cuyas imágenes reflejadas en un espejo son indistinguibles de los objetos originales se consideran aquirales.

Un claro ejemplo de elementos quirales a nivel macroscópico, con el que estamos muy familiarizados, es el de nuestras manos para cuya diferenciación utilizamos como descriptores las palabras *derecha* e *izquierda*. Del mismo modo, es preciso emplear descriptores químicos (como *D* y *L* o *R* y *S*), ya que es conocida la existencia a nivel molecular de numerosas estructuras que, como consecuencia de su lateralidad asimétrica (por ejemplo, la resultante de la diferente orientación espacial de los sustituyentes de un centro quiral), pueden existir como imágenes especulares o enantiómeros. En numerosas ocasiones se da la circunstancia de que uno de los enantiómeros de una determinada molécula quiral es tóxico o inactivo mientras que el otro tiene la actividad deseada. Precisamente, el hecho de que los enantiómeros puedan tener diferente actividad, toxicología o metabolismo justifica el estudio de la quiralidad en las moléculas.

Además, en la Naturaleza existe una clara preferencia por una de las formas opuestas en las que puede existir (o se puede manifestar) un determinado objeto, comportamiento o compuesto quiral, lo que se denomina homoquiralidad biológica. Así, en el mundo macroscópico existen multitud de ejemplos que demuestran la tendencia natural a que prevalezca un proceso u objeto quiral sobre el que correspondería a su imagen especular, aunque resulta difícil establecer la causa que provoca la discriminación observada en cada caso. Este hecho se aprecia en determinadas plantas trepadoras que muestran una quiralidad preferida: el tallo de la madreleña se enrolla formando una hélice levógira, mientras que la mayoría de las plantas trepadoras muestra su predilección por una hélice dextrógira. Un caso similar es el de los caparzones helicoidales de los caracoles ya que su giro puede estar orientado hacia la derecha o hacia la izquierda, pero son habitualmente dextrógiros. De igual forma, algunas de las moléculas esenciales para la vida como son los aminoácidos, componentes fundamentales de las proteínas, tienen generalmente configuración *L*, mientras que la de los azúcares es *D*.

Es evidente, por tanto, que la afirmación de que una lateralidad invertida sería incompatible con nuestra vida no carece de fundamento sino que ilustra muy explícitamente hasta qué punto es conveniente estudiar la incidencia de la quiralidad en nuestro entorno.

Probablemente, el caso que contribuyó en mayor medida a poner de manifiesto la importancia de conocer la diferente actividad, metabolismo y toxicología de las formas enantioméricas de un compuesto quiral fue el trágico suceso de la talidomida ((*R*)- y (*S*)-(N-(2,6-dioxo-3-piperidil)-ftalimida)). Este fármaco era un sedante popular en Europa a mediados del pasado siglo XX y precisamente en esa época fue habitual el nacimiento de niños con deformaciones congénitas entre las mujeres que habían tomado este medicamento durante los meses del embarazo. Posteriormente, se supo que uno de los enantiómeros de la talidomida era sedante, mientras que el otro era el responsable de su teratogenicidad. Realmente, es el carácter disimétrico de determinados receptores biológicos el que determina que la disposición espacial de la molécula sea el factor principal de la relación estructura-actividad y, por consiguiente, es esa misma disimetría la que define y condiciona la efectividad de un fármaco.

Sin embargo, no solo es importante diferenciar entre enantiómeros en la industria farmacéutica sino que también es imprescindible en otros sectores productivos, como son las industrias alimentaria, agroquímica y cosmética. En este contexto, un ejemplo interesante es el relativo a la carvona ((*R*)- y (*S*)-(2-metil-5-(1-metil-etil)-2-ciclohexenona)); se trata de un compuesto volátil quiral que se utiliza como aromatizante en la industria alimentaria y en preparados cosméticos, aunque en algunos casos se ha señalado su alergenicidad. Se han descrito diferencias en las velocidades de metabolización de sus dos enantiómeros y se les han asignado distintas bioactividades y propiedades farmacológicas: sedante para la (*R*)-carvona y estimulante para la (*S*)-carvona.

En estas circunstancias es innegable el interés del desarrollo de técnicas analíticas avanzadas, así como de la revisión de aquellos procedimientos convencionales que puedan ser adecuados para la separación y obtención de enantiómeros puros. Únicamente entonces se podrá controlar de modo fiable la pureza estereoquímica con la que se obtiene un compuesto quiral en un determinado proceso para, de esta forma, cumplir las exigencias que plantea la determinación correcta de la evaluación de la actividad de cada enantiómero. En el continuado progreso observado en los últimos años y concerniente a nuevas técnicas analíticas, en concreto a las cromatográficas, hay dos aspectos importantes a tener en cuenta. Uno de ellos es el relativo al desarrollo de nuevas fases estacionarias quirales que cada vez han de aplicarse a mayor número y complejidad de muestras. El otro aspecto es el que responde a la necesidad de que los procesos sean cada vez más sencillos, limpios y, en definitiva, sostenibles.

En este sentido, la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina es una fase estacionaria quiral que es susceptible de ser empleada en diferentes técnicas analíticas. Dependiendo de la fase móvil utilizada en cada caso concreto, ya sea gas, líquido o fluido supercrítico, puede proporcionar diferentes enantioselectividades y, en consecuencia, finalmente contribuye en mayor o menor extensión al proceso de discriminación quiral. Además, es evidente que cada una de las técnicas mencionadas puede ser más o menos eficiente y, por tanto, sostenible para una determinada aplicación.

El **primer objetivo** (según el *Esquema* de la página 7) de la presente *Memoria* es el estudio del comportamiento de la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina en el reconocimiento quiral de racematos volátiles mediante técnicas cromatográficas unidimensionales.

La selección de fuentes naturales constituye el **segundo objetivo** de este trabajo y se plantea desde la perspectiva de establecer nuevas alternativas sostenibles para la obtención de enantiómeros puros. A este respecto, se propone el empleo de técnicas cromatográficas multidimensionales adecuadas para la necesaria determinación previa de los excesos enantioméricos de aquellos compuestos quirales presentes en las diversas muestras complejas que sean de interés en cada caso particular.

El **tercer objetivo** es el diseño y construcción de una planta de cromatografía en lecho móvil simulado con fluidos supercríticos (*Supercritical Fluid Simulated Moving Bed Chromatography*, SF-SMB) para su posterior aplicación a la obtención de enantiómeros a escala preparativa, lo que supone el desarrollo y puesta a punto de una nueva tecnología que cumple con los requisitos de las actuales técnicas analíticas avanzadas.

Las plantas aromáticas y medicinales (PAM), así como sus aceites esenciales, son algunas de las numerosas fuentes potenciales de enantiómeros (entre las que, por citar otro ejemplo, se encuentran igualmente determinados subproductos y excedentes agroalimentarios) en las que se aprecia claramente la homoquiralidad biológica. Sin embargo, tanto la complejidad de las muestras indicadas como, por otro lado, la evidente dificultad adicional que representa la separación de los enantiómeros de un compuesto quiral son aspectos especialmente críticos. En particular, la constatación de que esos enantiómeros poseen las mismas propiedades físicas (excepto la actividad óptica) y, además, no solo experimentan con reactivos simétricos las mismas reacciones químicas sino que estas últimas también transcurren a las mismas velocidades, son las causas por las que habitualmente no es aconsejable utilizar una única columna cromatográfica (es decir, una técnica de separación unidimensional). Precisamente ésta es la razón por la que en el trabajo descrito en esta *Memoria* se propone el empleo de sistemas multidimensionales y, específicamente, del acoplamiento directo (*on-line*) de cromatografía de líquidos y cromatografía de gases (LC-GC), así como de la

cromatografía de gases multidimensional (MDGC). De esta forma, se pretende aumentar el potencial de las técnicas implicadas consideradas individualmente y, en particular, incrementar la precisión del ajuste de la selectividad y de la retención cromatográficas requeridas para lograr finalmente la resolución enantiomérica de compuestos quirales presentes en muestras complejas.

Como se indica en el *Esquema* anteriormente citado, en el que se resumen los objetivos establecidos y el plan de trabajo propuesto para su consecución, las mencionadas técnicas multidimensionales tienen una doble utilidad en el contexto del trabajo planteado. En primer lugar, se han empleado para la separación, a escala analítica, de enantiómeros de compuestos volátiles quirales presentes en muestras complejas reales, con objeto de, en última instancia, poder seleccionar las fuentes naturales alternativas más adecuadas para cada caso. En segundo lugar, esas mismas técnicas multidimensionales pueden ser aplicadas para evaluar la pureza enantiomérica de las fracciones obtenidas, a partir de las fuentes naturales que previamente hayan sido seleccionadas, mediante el equipo de SF-SMB cuyo diseño y construcción ha sido señalado previamente como el tercer objetivo del trabajo realizado.

En relación con las técnicas adecuadas para trabajar a escala preparativa, se ha decidido recurrir a la cromatografía en lecho móvil simulado con fluidos supercríticos. Con ello se pretende aunar las ventajas que supone, por un lado, el aumento de la productividad del proceso (como resultante de una separación en multicolumna y en continuo que, además, permite llevar a cabo una cromatografía en contracorriente) y, por otro, la posibilidad de acentuar las interacciones moleculares estereoselectivas, que son necesarias para favorecer el proceso de reconocimiento quiral, mediante la modulación de las propiedades (por ejemplo, presión y temperatura) de un fluido en condiciones supercríticas.

ESTRUCTURA DE LA MEMORIA

La presente *Memoria* contiene cinco capítulos. En la *Introducción* se revisan los antecedentes bibliográficos existentes sobre el tema objeto de estudio. En *Materiales y métodos* se describen los procedimientos experimentales utilizados, mientras que en *Resultados y discusión* se exponen los datos obtenidos y se consideran diversos argumentos teóricos para facilitar su comprensión. Finalmente, se presentan las *Conclusiones* del trabajo llevado a cabo para optar al Grado de Doctor, así como una sinopsis de la *Bibliografía* más relevante con relación a los objetivos planteados.

Al comienzo de los capítulos 1, 2 y 3 (*Introducción, Materiales y métodos y Resultados y discusión*) se incluye un compendio de los temas tratados en cada uno de ellos.

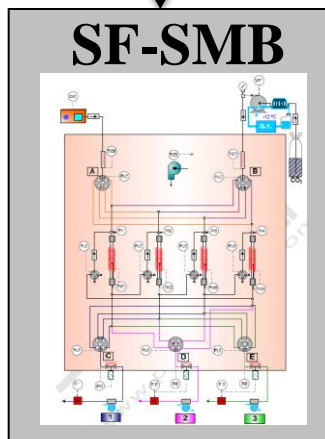
USO DE TÉRMINOS EN INGLÉS

La importancia de la comunicación dentro de la comunidad de químicos de habla hispana, así como el interés de fomentar el uso coherente y uniforme de los vocablos empleados en Química, han motivado el intento de restringir el uso de la terminología inglesa admitida por la comunidad científica internacional. Por esta razón y siempre que ha sido posible, durante la redacción de la Memoria se ha recurrido a términos aceptados por la Real Academia Española (RAE). En este sentido, se ha intentado emplear exclusivamente el inglés (y, en todos los casos, se ha incluido en el texto con letra cursiva) para denominar algunas técnicas cromatográficas o indicar conceptos cuyo nombre en español no está suficientemente implantado, por lo que podría provocar confusión durante su lectura. No obstante, en el apartado de *Terminología*, se incluye la traducción de los términos que aparecen con su grafía inglesa a lo largo del texto. Además, en las expresiones numéricas, se ha seguido la normativa internacional y recomendada por la RAE en el *Diccionario panhispánico de dudas* (edición 2005), en el que se establece el uso de la coma para separar la parte entera de la parte decimal.

OBJETIVO 3

VIABILIDAD DE LA CROMATOGRAFÍA EN
LECHO MÓVIL SIMULADO
CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS (SF-SMB)

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE
UNA PLANTA DE SF-SMB



SEPARACIÓN DE
ENANTIÓMEROS

OBJETIVO 2

SELECCIÓN DE FUENTES
NATURALES
ALTERNATIVAS DE COMPUESTOS
ENANTIOPUROS

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS
MULTIDIMENSIONALES

Resolución enantiomérica
mediante
RPLC-GC-MS

Resolución enantiomérica
mediante
MDGC-MS

Separación de enantiómeros
a escala analítica en muestras complejas
reales

OBJETIVO 1

EVALUACIÓN DE LA
ENANTIOSELECTIVIDAD DE
heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -
ciclodextrina.

GC
HPLC
SFC

TERMINOLOGÍA

Backflush	Flujo en sentido inverso
BBS	Ensanchamiento de banda en el espacio (<i>Band Broadening in Space</i>)
BPC	Cromatografía por etapas (<i>Batch Process Chromatography</i>)
CAS	Identificación numérica para compuestos químicos (<i>Chemical Abstracts Service</i>)
CC-SFE	Extracción en contracorriente con fluidos supercríticos (<i>Counter-Courrent Supercritical Fluid Extraction</i>)
Chiral market	Mercado quiral
Chiral technology	Tecnología quiral
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FID	Detector de ionización de llama (<i>Flame Ionization Detector</i>)
Flooding effect	Zona inundada por efecto del disolvente
Full scan	Registro completo del barrido de iones
GC	Cromatografía de gases (<i>Gas Chromatography</i>)
GC x GC	Cromatografía de gases completa en dos dimensiones (<i>Comprehensive Two Dimensional Gas Chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GC-SMB	Cromatografía en lecho móvil simulado con gases (<i>Gas Chromatography Simulated Moving Bed</i>)
Glass-liner	Camisa de vidrio
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia (o alta presión) (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HS	Espacio de cabeza (<i>Headspace</i>)
LC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia (o alta presión) (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
LCA	Análisis de ciclo de vida (<i>Life Cycle Analysis</i>)
LC-GC	Cromatografía de líquidos acoplada a cromatografía de gases
Live switching	Conexión tipo Deans
Loop	Bucle de inyección
LVI	Inyección de volúmenes elevados (<i>Large Volume Injection</i>)
LVS	Inyección de volúmenes elevados (<i>Large Volume Sampling</i>)
Manifold	Colector de escape (parte del espectrómetro de masas)
MDGC	Cromatografía de gases multidimensional (<i>Multidimensional Gas Chromatography</i>)
MDGC-MS	Cromatografía de gases multidimensional acoplada a espectrometría de masas
MS	Espectrometría de masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
NIST	Instituto Nacional de Standares y Tecnología de Estados Unidos (<i>National Institute of Standards and Technology</i>)
NPLC	Cromatografía de líquidos en fase normal (<i>Normal Phase Liquid Chromatography</i>)
NPLC-GC	Acoplamiento directo de cromatografía de líquidos en fase normal y cromatografía de gases
PAM	Plantas aromáticas y medicinales
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
Peak splitting	Distorsión de pico que implica su división
PID	Proporcional, Integral, Derivada (<i>Proportional, Integral, Derivative</i>)

PTV	Vaporizador con temperatura programada (<i>Programmed Temperature Vaporizer</i>)
RESS	Expansión rápida con fluidos supercríticos (<i>Rapid Expansion of Supercritical Solutions</i>)
Retention gap	Zona sin retención
RPLC	Cromatografía de líquidos en fase inversa (<i>Reversed Phase Liquid Chromatography</i>)
RPLC-GC	Acoplamiento directo de cromatografía de líquidos en fase inversa y cromatografía de gases
RPLC-GC-MS	Acoplamiento directo de cromatografía de líquidos en fase inversa, cromatografía de gases y espectrometría de masas
RSD	Desviación estándar relativa (<i>Relative Standard Deviation</i>)
SCADA	Adquisición de datos, supervisión y control (<i>Supervisory Control and Data Acquisition</i>)
SFC	Cromatografía de fluidos supercríticos (<i>Supercritical Fluid Chromatography</i>)
SFE	Extracción con fluidos supercríticos (<i>Supercritical Fluid Extraction</i>)
SIM	Registro selectivo de iones (<i>Selected Ion Monitoring</i>)
Solvent effect	Efecto del disolvente
Solvent flooding	Inundación de columna por causa del disolvente
Solvent split	Con eliminación de disolvente
Split	Con división de flujo
Splitless	Sin división de flujo
SF-SMB	Cromatografía en lecho móvil simulado con fluidos supercríticos (<i>Supercritical Fluid Simulated Moving Bed</i>)
SMB	Lecho móvil simulado (<i>Simulated Moving Bed</i>)
SMBR	Reactor en lecho móvil simulado (<i>Simulated Moving Bed Reactor</i>)
Tailing	Distorsión de pico que provoca una asimetría de banda (A_s) superior a la unidad
TCC	En contracorriente (<i>True Counter-Corrent</i>)
TEAA	Acetato de tri-etil amonio (<i>Triethylammonium acetate</i>)
TMB	Lecho móvil verdadero (<i>True Moving Bed</i>)
TOTAD	Interfaz utilizada en el acoplamiento RPLC-GC (<i>Through Oven Transfer Adsorption Desorption</i>)

Capítulo 1.

INTRODUCCIÓN

Con la intención de facilitar la lectura de esta Memoria y debido a los distintos objetivos planteados, esta Introducción se divide en tres partes que se corresponden con el trabajo realizado: una primera parte en la que se comentan las técnicas cromatográficas unidimensionales habitualmente empleadas, a escala analítica, para lograr resoluciones enantioméricas de compuestos volátiles quirales; una segunda referente a técnicas cromatográficas multidimensionales a escala analítica y una tercera que incluye, igualmente, la consideración de técnicas cromatográficas, aunque, en este caso concreto, se centra exclusivamente en separaciones realizadas a escala preparativa. En cada una de ellas se revisan los antecedentes bibliográficos directamente relacionados con la separación y obtención de enantiómeros de compuestos quirales.

Se comienza considerando algunos aspectos relativos a la cromatografía a escala analítica, mediante técnicas cromatográficas unidimensionales, puesto que la experimentación a realizar posteriormente a escala preparativa exige un estudio previo de la fase estacionaria quiral empleada. Además se lleva a cabo la selección de la fuente natural de compuestos quirales que pueda resultar de interés en cada caso particular. Con esta finalidad, y debido a la evidente complejidad de este tipo de análisis, se contempla el empleo de distintos sistemas multidimensionales desde la perspectiva que supone su posible complementariedad para el estudio de las relaciones enantioméricas de compuestos quirales presentes en muestras reales.

En relación con la obtención de enantiómeros a escala preparativa, se destaca el interés del empleo de la cromatografía en lecho móvil simulado con fluidos supercríticos.

1. 1. Interés de la separación y obtención de compuestos quirales

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. En este sentido, en la actualidad se considera, por ejemplo, que la disponibilidad de enantiómeros puros es un aspecto esencial para garantizar la fiabilidad de los datos obtenidos en ensayos biológicos.

Además de la industria farmacéutica (*Francotte y Richert, 1997*), dicha necesidad es igualmente patente en todos aquellos casos (como por ejemplo, en sectores relacionados con alimentos, aceites esenciales, aromas, cosmética, herbicidas, fungicidas, residuos de plaguicidas, etc.) 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, por el contrario, únicamente un enantiómero puro (homoquiral). En último término, ello supone que la estereoquímica de una molécula delimita y condiciona la efectividad de un fármaco, la percepción sensorial de un aroma, la acumulación enantioselectiva de un compuesto en el organismo humano o la persistencia ambiental de un agente contaminante.

En ocasiones, como se mencionó en *Presentación y objetivos*, se da la circunstancia de que uno de los enantiómeros posee la actividad deseada (eutómero) mientras que el otro es inactivo o tóxico (distómero). Es evidente que es imprescindible eliminar aquél que provoca el efecto indeseable, pero también puede ser aconsejable prescindir del enantiómero inactivo con objeto de evitar lo que se denomina lastre isomérico. Este término alude a la frecuente necesidad de recurrir a la presencia de ambos enantiómeros, aunque el efecto deseado sea únicamente proporcionado por una de las formas enantioméricas del compuesto quiral, debido a la dificultad de obtener cada uno de ellos por separado (*Gübitz y Schmid, 2006*).

Por estas razones, en los últimos años se ha observado un crecimiento que previsiblemente se mantendrá en el futuro, en la demanda de enantiómeros puros y, en consecuencia, en el desarrollo de nuevos procedimientos adecuados para su obtención a

escala preparativa, así como para su separación a escala analítica. Un hecho a destacar es que el porcentaje de fármacos enantioméricamente puros comercializados aumentó del 10% en el año 1990 al 37% en el año 2005 (*Rajendran y col., 2009*); esta tendencia es semejante en algunos de los sectores industriales que se han nombrado anteriormente. Tanto el interés científico del tema como su utilidad práctica han propiciado el auge observado en lo que en la actualidad se denomina *Chiral Market* y ha permitido acuñar expresiones como *Chiral Technology*, con la que se alude habitualmente al uso de técnicas o procedimientos adecuados para el estudio de la estereoquímica absoluta de un compuesto, así como para lograr la resolución, tanto a escala analítica como preparativa, de los enantiómeros de compuestos quirales o para provocar transformaciones asimétricas utilizando, por ejemplo, enzimas, sintones quirales o catalizadores quirales (*Food and Drug Administration, 1992; Rekoske, 2001*).

1.1.1. Rutas para la obtención de enantiómeros puros a escala preparativa

Dos son las vías por las que pueden obtenerse enantiómeros puros. Una de ellas se lleva a cabo a partir de una molécula quiral, para tener el compuesto de interés después de una serie de transformaciones que preservan su quiralidad. La otra, sin embargo, comienza con una molécula aquiral y mediante distintas etapas que transcurren a la misma velocidad se logra una mezcla al cincuenta por ciento de cada enantiómero (es decir, una mezcla racémica o racemato) para, posteriormente, obtener cada uno de ellos enantioméricamente puro, tras el empleo de una técnica de separación (*Maier y col., 2001; Rajendran y col., 2009*).

En el primer caso se incluye lo que se denomina síntesis asimétrica o enantioselectiva. Se realiza preferiblemente cuando la síntesis es directa y depende, principalmente, del sintón quiral empleado para obtener un determinado enantiómero. En concreto, si la molécula quiral tiene actividad catalítica, ya sea homogénea o heterogénea respecto del medio de reacción, se denomina catálisis enantioselectiva. El progreso en este área, que ha sido sorprendente en la última década, ha permitido lograr, al menos en algunas síntesis, excelentes resoluciones enantioméricas (*Dalko y Moisan, 2001; Noyori, 2003; Blaser y col., 2005; Farina y col., 2006*).

El segundo de los casos anteriormente señalados supone la formación del racemato y exige, a continuación, recurrir a una resolución cinética, cristalización o cromatografía preparativa, para obtener cada enantiómero por separado. En el caso de la obtención mediante cristalización preferencial, en la disolución sobresaturada de la mezcla racémica puede cristalizar el enantiómero deseado para posteriormente separarlo, por ejemplo, por filtración. En ocasiones, también se llega al mismo resultado al añadir un aditivo quiral a la mezcla racémica para formar un compuesto diastereomérico que puede separarse mediante cristalización. No obstante, la cromatografía preparativa enantioselectiva, con una o más columnas, se ha convertido en un buen método de obtención de enantiómeros puros. La separación se realiza empleando columnas empacadas con una determinada fase quiral. En los últimos veinte años se han desarrollado un número elevado de fases enantioselectivas que, consideradas en su conjunto, permiten lograr la resolución enantiomérica de compuestos quirales a escala analítica y realizar el necesario escalado para obtener enantiómeros puros a nivel preparativo (*Juza y col., 2000; Francotte, 2001*).

En este sentido, y a pesar de los avances alcanzados por la síntesis asimétrica enantioselectiva, la estrategia industrial de recurrir a la síntesis del racemato para su posterior resolución enantiomérica es, sin duda, la más utilizada. Esto se debe a que, por ejemplo, la síntesis organometálica permite alcanzar buenos rendimientos y selectividades pero, generalmente, conlleva la formación de trazas de metales altamente nocivos que no se adecuan a los controles de calidad de, en concreto, la industria farmacéutica.

Sin embargo, la obtención de enantiómeros puros no solo es necesaria a escala preparativa, sino que el análisis de la composición enantiomérica es también importante para, precisamente, el control de la obtención de enantiómeros puros, el análisis de la genuidad de determinadas muestras (como aceites esenciales o alimentos) o la racemización de un determinado fármaco durante los procesos metabólicos subsiguientes a su administración. Por esta razón, en los próximos apartados se hace un breve recorrido por las técnicas cromatográficas unidimensionales empleadas para la resolución de compuestos quirales, así como por las fases estacionarias y móviles utilizadas.

1.1.2. Técnicas cromatográficas unidimensionales para la separación de compuestos quirales a escala analítica

A mediados del siglo XIX, Pasteur estableció el que se puede considerar primer método de separación de enantiómeros mediante la cristalización diastereomérica del ácido tartárico. En la actualidad, la mejora de las técnicas analíticas ha permitido avanzar notablemente en el impulso de nuevos métodos de separación enantiomérica. Las técnicas que quizá han presentado una evolución más rápida son la cromatografía de gases (GC), cromatografía de líquidos (HPLC), cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) y electroforesis capilar (CE) (*Dabrio y col., 2000; Kang y col., 2002; Schurig, 2002*).

No obstante, en ocasiones, las técnicas cromatográficas unidimensionales (GC, HPLC y SFC) no son adecuadas para la separación de enantiómeros puros. Es cierto que el empleo de columnas capilares de la longitud adecuada para disponer de un número elevado de platos efectivos puede permitir obtener resoluciones satisfactorias para determinadas parejas de compuestos, pero también lo es el hecho de que los sistemas cromatográficos convencionales (unidimensionales) adolecen de algunas limitaciones que se ponen especialmente de manifiesto en el análisis de muestras complejas.

En general, se puede afirmar que para realizar el análisis de muestras de complejidad media y alta no se debe recurrir a sistemas unidimensionales. Habitualmente no es posible trabajar a la temperatura de columna adecuada para lograr separaciones aceptables en todas las secciones del cromatograma y tampoco se puede introducir la cantidad de muestra precisa para alcanzar la sensibilidad requerida para todos los componentes de interés ya que estos últimos suelen estar presentes abarcando un amplio intervalo de polaridades, volatilidades y concentraciones.

En este contexto, un obstáculo importante es el que supone tener que someter la columna a las elevadas temperaturas que deben ser establecidas para aquellos compuestos de baja volatilidad que, aunque no resulten de interés para el análisis, deban ser forzosamente eluidos para evitar el posible deterioro de la columna.

Realmente, aunque el carácter abierto de las columnas capilares permita disponer de las altas permeabilidades deseables para aumentar su longitud y alcanzar las altas eficiencias que requieren las separaciones difíciles, la pequeña cantidad de fase estacionaria que poseen está en clara contradicción con la necesidad de las altas capacidades de carga indispensables para analizar compuestos presentes en cantidades traza. En resumen, las carencias de las técnicas unidimensionales para el análisis de muestras complejas justifica el empleo de técnicas multidimensionales.

1.1.3. Fases estacionarias quirales en cromatografía: de gases (GC), líquidos (HPLC) y fluidos supercríticos (SFC)

Los logros alcanzados en el desarrollo de selectores quirales han permitido impulsar la obtención de nuevas separaciones enantioméricas. Se trata de un aspecto de especial importancia, ya que la elección de una determinada fase estacionaria, tanto a escala analítica como preparativa, es determinante para alcanzar resoluciones enantioméricas aceptables (*Schurig*, 1994, 2001, 2002). Sin embargo, cabe destacar la continuidad observada en los últimos años en cuanto a la síntesis de nuevas fases estacionarias quirales adecuadas para su aplicación en el análisis de muestras de muy diversa complejidad. Las fases estacionarias quirales suelen ser versátiles, de modo que una misma fase puede permitir el análisis de un número relativamente elevado de compuestos quirales de distinta naturaleza. Dependiendo del tipo de interacción existente entre el selector y el compuesto que intervenga en el proceso de reconocimiento quiral podemos distinguir principalmente cuatro tipos de fases (*Dabrio y col.*, 2000; *Schurig*, 2001):

- Tipo I: son aquellas cuyo selector quiral establece interacciones por puentes de hidrógeno, transferencia de carga, ácido-base, dipolo-dipolo inducido o dipolo-dipolo con un determinado compuesto quiral. Los selectores inmovilizados en la fase pueden ser aminoácidos, amidas, alcoholes, amidas o grupos fenilo. Las más conocidas son las fases *tipo Pirkle*, cuya estructura se basa en largas cadenas de selectores quirales con grupos aromáticos π -dadores o π -aceptores unidas a un soporte silíceo (*Pirkle y Koscho*, 1999). Se emplean en cromatografía de líquidos y de fluidos supercríticos tanto a escala analítica como preparativa. Dichas fases

permiten la separación enantiomérica para una amplia variedad de grupos de compuestos.

- Tipo II: son las denominadas poliméricas. Están formadas por polisacáridos de amilosa o celulosa. La selectividad viene determinada por interacciones débiles. Se emplean en cromatografía de líquidos y de fluidos supercríticos a escala analítica y preparativa. 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. Las más destacadas son los derivados de fenilmetacrilatos y las ciclodextrinas. En este grupo se incluye el selector quiral heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina.
- Tipo IV: son aquellas en las que el reconocimiento quiral se basa en la formación de complejos de coordinación. 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. Se han empleado complejos unidos covalentemente, por ejemplo, a un polisiloxano. Aunque algunas de las fases quirales pertenecientes a este grupo se pueden adquirir comercialmente, es más habitual que su síntesis sea diseñada en el laboratorio y realizada específicamente para una determinada aplicación.

En general, todas las fases estacionarias quirales se emplean para cromatografía de gases, líquidos y fluidos supercríticos, siempre y cuando cumplan con los requisitos de estabilidad, adsorptividad, solubilidad, etc. que cada una de las técnicas exija para su correcto funcionamiento.

1.1.3.1. Fase estacionaria quiral: heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina

Debido a la relevancia de esta fase estacionaria quiral empleada durante la experimentación realizada, se desarrollan los aspectos más importantes de la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina en el apartado 3.1.2. de *Resultados y discusión*.

1.1.4. Fase móvil: propiedades físicoquímicas de los fluidos supercríticos

Se denomina fluido supercrítico a cualquier sustancia mantenida a temperatura y presión superiores a las que definen su correspondiente punto crítico. Sus propiedades varían gradualmente, de las características propias de los gases a las de los líquidos, dependiendo de la presión y la temperatura. Un aumento en la presión y la disminución de la temperatura supone un aumento de la densidad, de la viscosidad y la disminución del coeficiente de difusión. En la Figura 1a se representa el diagrama de fases de una sustancia pura y se señala el punto crítico, así como lo que se podría denominar la región supercrítica (en la que el fluido se encuentra en condiciones supercríticas).

El hecho de que los fluidos supercríticos posean propiedades intermedias entre las de gases y líquidos justifica la adecuación de su uso como fase móvil en cromatografía. En concreto, resulta de especial interés el dióxido de carbono (CO_2) en condiciones supercríticas debido a los moderados valores de presión y temperatura que definen su punto crítico ($P_c = 73$ bar y $T_c = 31^\circ\text{C}$), de manera que permite disponer de un amplio intervalo de densidades para realizar la experimentación. Además no es tóxico, ni inflamable y se enmarca dentro de las alternativas al uso de los disolventes orgánicos tradicionales, debido a su menor impacto ambiental. Otro aspecto ventajoso es la fácil separación entre el fluido supercrítico y la muestra (*Perrut, 1994*) ya que, una vez terminado el proceso, la eliminación del primero se realiza fácilmente mediante despresurización. En ocasiones, para aquellas aplicaciones en las que los compuestos de interés sean polares y la variación de presión y temperatura del CO_2 no se adecúe a la densidad deseada, se recomienda emplear un modificador (generalmente etanol o metanol) para variar la polaridad y alcanzar mayores densidades. Es interesante destacar la posibilidad que los fluidos supercríticos ofrecen para participar en las asociaciones diastereoméricas responsables de la discriminación quiral. Se ha observado que, con el empleo de una fase móvil en condiciones supercríticas y un selector quiral adecuado, se

favorece el reconocimiento quiral debido a que, en general, se logra mayor número de interacciones moleculares estereoselectivas (Fogassy y col., 1994; Bargmann-Leyder y col., 1995; Zhao y col., 2008).

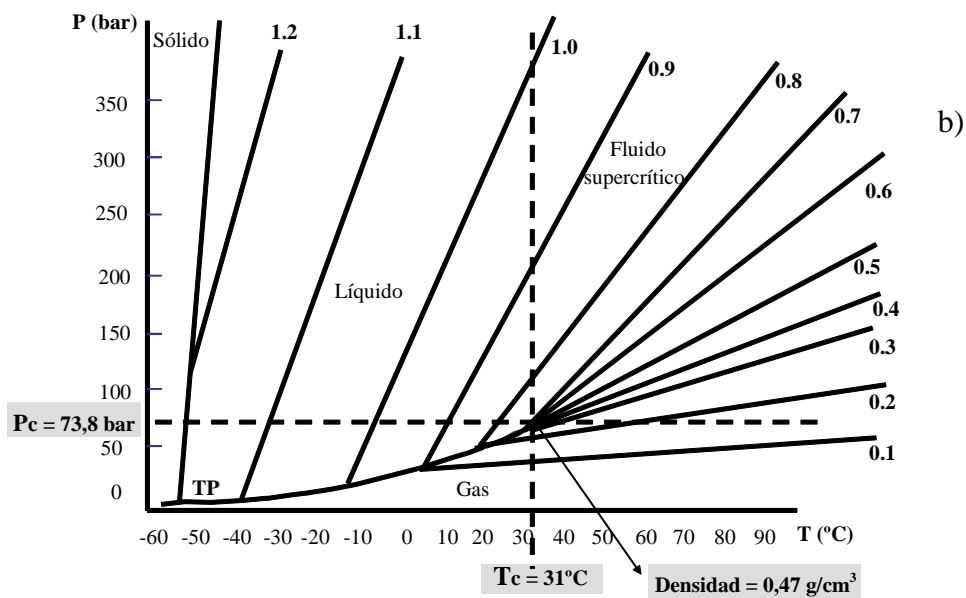
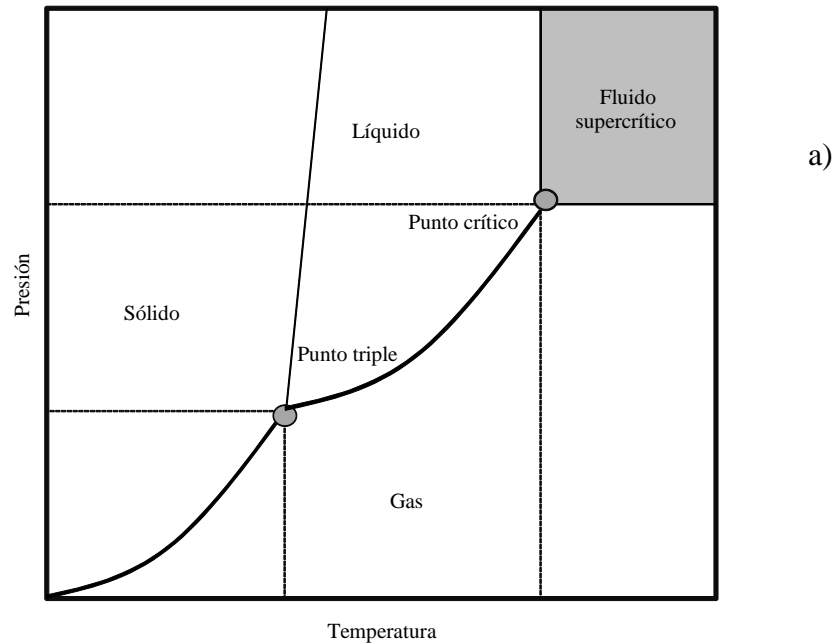


Figura 1: a) Diagrama de fases de una sustancia pura; b) diagrama de fases de CO₂

En este sentido, la tecnología de fluidos supercríticos representa una alternativa de gran interés para el desarrollo de nuevos procesos y productos, ya que permite disponer de métodos más selectivos que aquellos basados en el empleo de disolventes orgánicos contaminantes. Estas ventajas se derivan del hecho de que, como ya se ha mencionado, estos fluidos poseen propiedades intermedias entre las de los gases y los líquidos, por lo que es destacable la versatilidad de su empleo como agente extractante. En concreto, las bajas viscosidades y las altas difusividades de los fluidos supercríticos, en comparación con las de los líquidos, facilitan la transferencia de materia. Todo ello supone, en último término, poder llevar a cabo el proceso extractivo de diferentes tipos de compuestos con mayor efectividad y en tiempos inferiores a los requeridos cuando se emplean otros métodos basados, por ejemplo, en el empleo de líquidos.

Adicionalmente, la posibilidad de controlar fácilmente la densidad de un fluido supercrítico mediante la programación de la presión y/o la temperatura es otra ventaja evidente, con respecto al empleo de disolventes convencionales, ya que ello permite optimizar adecuadamente el poder de solvatación en función de la naturaleza de la muestra estudiada (*Smith, 1988; White, 1988; Lee y Markides, 1990*). De esta forma, como se puede apreciar en la Figura 1b, el hecho de realizar la experimentación en condiciones supercríticas supone tener la posibilidad de incrementar significativamente la densidad del medio, hasta alcanzar valores próximos a los de los líquidos, ya sea manteniendo la temperatura constante y aumentando la presión o mediante la disminución de la temperatura mientras permanece constante la presión.

Se puede afirmar que los fluidos supercríticos ofrecen unas características especialmente adecuadas para su empleo como agente extractivo y como fase móvil en cromatografía (*Smith, 1988; White, 1988; Lee y Markides, 1990; Luque de Castro y col., 1994; Ibáñez y col., 1994, 1995; Chester y Pinkston, 2000*), así como para modular las propiedades del medio de reacción, de manera que con su uso no solo se logra integrar las etapas de reacción y separación, sino que, además, se consigue aumentar sustancialmente la velocidad de una reacción determinada e incluso modificar su selectividad. Así, por ejemplo, se han señalado las ventajas del empleo de fluidos supercrítico en catálisis homogénea (*Jessop y col., 1999*), catálisis heterogénea (*Baiker, 1999*) y en lo que se denomina biocatálisis supercrítica que engloba el estudio de las

modificaciones de la actividad, selectividad y estabilidad de enzimas en función de la presión y temperatura de medio (*Mesiano y col.*, 1999).

Se han publicado numerosos trabajos sobre la utilidad de los fluidos supercríticos para la extracción y separación de compuestos de muy distinta naturaleza química presentes en muestras muy diversas y se han descrito aplicaciones que incluyen, por ejemplo, la eliminación de determinados compuestos no tolerados por algunos grupos de consumidores (como la cafeína o el colesterol) y la obtención de extractos representativos de la composición química de diferentes productos, así como de aditivos y contaminantes o la extracción de aromas y compuestos de alto valor añadido (*King*, 1989; *Hierro y Santa-María*, 1992; *King y Bott*, 1993; *Blanch y col.*, 1994, 1995, 1999; *Rizvi*, 1994; *Phelps y col.*, 1996; *Valcárcel y Tena*, 1997).

En aquellos casos en los que, para conseguir una extracción continua y selectiva, sea preciso intensificar la interacción de la muestra con el fluido, el empleo de la extracción con fluidos supercríticos en contracorriente (CC-SFE) es una alternativa a tener en cuenta. Con la finalidad de mejorar la transferencia de materia, se ha propuesto llevar a cabo la dispersión, mediante pulverización a alta presión, de la fase líquida en la supercrítica, así como el empleo de zonas de alta y baja presión para reducir el tiempo que requiere el proceso extractivo y, simultáneamente, aumentar su selectividad y rendimiento (*Langelaan y col.*, 1999). Asimismo, se ha recomendado el uso de un gradiente de temperatura a lo largo de la columna para inducir un reflujo interno que permita aumentar la efectividad y selectividad de la extracción (*Sato y col.*, 1998) y ya se han publicado datos sobre la aplicación de la extracción con fluidos supercríticos en contracorriente para aumentar la estabilidad de un producto (*Sato y col.*, 1996) o para la obtención, a escala industrial, de tocoferoles y β -carotenos a partir de aceites de semillas (*Manninen y col.*, 1997).

Considerados en su conjunto, se puede afirmar que los estudios realizados en los últimos años han propiciado la clara tendencia que en la actualidad se observa hacia el empleo de fluidos supercríticos para mejorar la efectividad de distintos procesos de interés industrial (especialmente en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica por la nula toxicidad del CO₂ supercrítico). Concretamente, se ha señalado el potencial de la tecnología de fluidos supercríticos para la obtención de productos de alto valor

añadido y gran calidad, de interés por su uso como nutracéuticos y aromas o por su empleo en cosmética (*Jarzebski y Malinowski, 1995; Mermelstein, 1999; Sihvonen y col., 1999*), para los que existe un mercado que se considera emergente, aunque ya esté claramente definido y sea fácilmente constatable su continua expansión. A este respecto, es especialmente destacable el uso de fluidos supercríticos como medio de reacción para producir partículas con una morfología determinada (*Jung y Perrut, 2001; Perrut y Clavier, 2003; Yeo y Kiran, 2005*) simplemente estableciendo las condiciones de presión y temperatura necesarias para lograr la solvatación de un soluto en el fluido y, posteriormente, su rápida despresurización para favorecer la cuasi instantánea nucleación del producto en un material muy disperso.

Actualmente, la posibilidad de emplear fluidos supercríticos para micronizar partículas (e, incluso, para llegar a alcanzar tamaños del orden de nanómetros) aplicando, por ejemplo, la metodología conocida con el acrónimo RESS (*Rapid Expansion of Supercritical Solutions*) es una realidad con un prometedor futuro que se puede entrever sin más que citar una de sus aplicaciones: el aumento de la biodisponibilidad de medicamentos insolubles en agua.

1.1.5. Nuevas exigencias en Química Analítica

La creciente demanda de tecnologías sostenibles, eficientes y económicas hace que, al menos en algunas ocasiones, los procesos químicos adquieran una complejidad añadida. Precisamente, la consecución de una resolución enantiomérica suele ser un proceso complejo debido principalmente a las idénticas propiedades físicas y químicas (excepto en lo que se refiere a la interacción con el plano de luz polarizada o con otra molécula quiral) de las parejas de enantiómeros de un compuesto determinado. La dificultad mencionada, unida a las nuevas exigencias en el campo de la Química, hace que sea necesaria la revisión de antiguos procesos, así como la aparición de otros nuevos capaces de satisfacer las necesidades presentes (*Anastas y Williamson, 1996; Anastas y Warner, 1998; de Simone, 2002; Anastas y Eghbali, 2010*).

La voluntad de promover aquellas tecnologías que sean sostenibles hace que también la Química Analítica se exija retos íntimamente relacionados con ella como la prevención del consumo, el diseño energéticamente eficiente, la seguridad química y el desarrollo de nuevos métodos instrumentales. Además, estas tecnologías no pueden olvidar la obligación de satisfacer los requisitos que tradicionalmente se exigen en esta parte de la Ciencia tales como selectividad, sensibilidad, fiabilidad, tiempo de análisis adecuado y precio aceptable (*Anastas, 1999*).

De este modo, conviene adelantar lo que se ampliará posteriormente en el apartado 1.2. sobre la consideración de que una de las grandes ventajas que ofrecen las técnicas cromatográficas multidimensionales para la separación de enantiómeros es la posibilidad de reducir o eliminar la etapa de preparación de muestra, que es uno de los pasos en los que más energía y productos químicos se consume (*Curylo y col., 2007, Armenta y col., 2008*). Además, los tiempos de análisis empleados con dichas técnicas se reducen significativamente con respecto a los que requieren los sistemas unidimensionales ya que la preparación, el enriquecimiento y la limpieza de muestra se realizan en una única etapa, por lo que también cumple con otro de los requisitos planteados por la química sostenible. Todo ello sin olvidar que habitualmente se logra mejorar la selectividad, sensibilidad y fiabilidad respecto a las proporcionadas por otros métodos tradicionales de análisis. Por lo tanto, se puede afirmar que las citadas técnicas multidimensionales contribuyen a la mejora en el desarrollo de nuevas metodologías de

análisis. En la bibliografía se pueden encontrar nuevas técnicas de análisis y detección de compuestos que disminuyen el tiempo y consumo de disolvente, respecto a algunos métodos previamente propuestos (Barba y col., 2009, 2010b). No obstante, una herramienta útil para calcular de manera precisa el impacto ambiental de estas tecnologías es el análisis de ciclo de vida (*Life Cycle Analysis*, LCA), que mide la repercusión ambiental de un producto, proceso o sistema desde que se obtienen las materias primas hasta el fin de su vida útil (Anastas y Williamson, 1996; Lankey y Anastas, 2002).

Asimismo, otro parámetro muy empleado para calcular el impacto de un determinado proceso es el *factor E*, propuesto por Sheldon en 1994. Se define como el cociente entre la masa de residuo y la masa de producto obtenido y, evidentemente, depende directamente del tipo de industria que se analice, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1: *Factor E* de diferentes tipos de industria

Industria	Producto (Toneladas por año)	Factor E
Refinería	$10^6 - 10^8$	~ 0,1
Química industrial	$10^4 - 10^6$	~ 1 - 5
Química fina	$10^2 - 10^4$	5 - 50
Farmacéutica	$10^0 - 10^3$	25 - 100

La tendencia a identificar la industria de la refinería como la de mayor impacto ambiental, y por tanto con mayor *factor E*, no es correcta ya que, como se muestra en la Tabla 1, es la industria farmacéutica la que mayor masa de residuo genera respecto a la de producto útil. Por esta razón, algunas industrias farmacéuticas y alimentarias, sobre todo a nivel de investigación científica, han intentado disminuir el *factor E* proponiendo diferentes alternativas (Sheldon, 2007). Una de ellas, por ejemplo, es la sustitución de los disolventes orgánicos tradicionales por otros disolventes como el CO₂ en

condiciones supercríticas. En este sentido, el CO₂ supercrítico se puede emplear en técnicas que habitualmente se utilizan disolventes orgánicos reduciendo drásticamente la toxicidad y aumentando en ocasiones las ventajas gracias a las particulares propiedades de los fluidos supercríticos. Tal es el caso, por citar algún ejemplo, de la cromatografía en lecho móvil simulado con fluidos supercríticos (SF-SMB).

En resumen, la demanda de procesos sostenibles requiere el desarrollo de algunas técnicas y la revisión de otras, para adaptarse a las nuevas exigencias, sin olvidar la necesidad de satisfacer los requisitos tradicionales de la Química Analítica. En este sentido, se puede afirmar que tanto las técnicas multidimensionales, como la cromatografía en lecho móvil simulado con fluidos supercríticos, ayudan a contribuir al progreso en este campo.

1.2. Evolución de las técnicas cromatográficas: cromatografía multidimensional. Escala analítica

Teniendo en cuenta las limitaciones expuestas en el apartado 1.1.2. en cuanto al empleo de sistemas cromatográficos unidimensionales, en relación con el análisis de muestras complejas resulta evidente la conveniencia de considerar no solo la resolución alcanzable para parejas específicas de compuestos sino también el número total de picos que pueden llegar a ser observados. De este modo, se debe exigir que el sistema cromatográfico de elección separe la muestra, en un intervalo de tiempo establecido, con el mayor número posible de picos y con una resolución previamente especificada. En otras palabras, se debe disponer de sistemas caracterizados por poseer altas capacidades de picos (n_c) y que, por consiguiente, ofrezcan la fiabilidad requerida para llevar a cabo análisis de complejidad moderada y alta. Este es precisamente el caso de los sistemas cromatográficos multidimensionales.

De hecho, un aspecto de especial relevancia en relación con el empleo de sistemas multidimensionales es el que se refiere a la capacidad de picos que puede llegar a proporcionar. La capacidad de picos del sistema formado por la unión en serie de columnas de idénticas características puede ser estimada a partir de la raíz cuadrada del producto resultante de multiplicar el número de columnas que forman parte del sistema por cada una de sus capacidades de picos individuales. Sin embargo, el valor de

n_c de un sistema cromatográfico multidimensional es, aproximadamente, multiplicativo con respecto a las capacidades de picos de cada columna considerada por separado. Por tanto, si dos columnas idénticas (1 y 2), con valores de $n_{c1} = 100$ y $n_{c2} = 100$, se acoplan en serie, la capacidad de picos resultante, $n_c (1 + 2)$, será próxima a 141. La utilización de dos columnas con las mismas capacidades de picos, pero acopladas de forma que permitan trabajar en el modo multidimensional, proporciona un $n_{cM} = 100 \times 100 = 10.000$ (Poole, 2003).

Realmente, la citada regla multiplicativa únicamente aporta una estimación de la capacidad de picos de un determinado sistema multidimensional, ya que las correlaciones existentes entre las retenciones de los solutos en las dimensiones implicadas en el acoplamiento pueden causar la disminución de su valor. Por esta razón, la capacidad total de picos finalmente disponible es, habitualmente, una fracción del producto resultante de aplicar esa regla. De cualquier forma, es evidente que aquellos sistemas cromatográficos basados en el uso, en sus distintas dimensiones, de mecanismos de retención que únicamente difieren en su intensidad (como, por ejemplo, el acoplamiento de dos columnas de GC con distintas fases estacionarias) proporciona una capacidad de picos inferior a la alcanzable en aquellos casos en los que se utilizan diferentes modos de separación (como es el acoplamiento de LC y GC).

Debido, por tanto, a las ventajas que supone el uso del acoplamiento directo (*on-line*) de diversas técnicas instrumentales, en concreto cromatográficas, y a las limitaciones de las técnicas clásicas (unidimensionales), es cada vez mayor el número de aplicaciones descritas con técnicas multidimensionales de análisis. Esto se debe, principalmente, a la posibilidad de aumentar sensiblemente el potencial que ofrecen cada una de ellas consideradas por separado.

El empleo de dos columnas acopladas permite, en general, incrementar la resolución cromatográfica alcanzable en un análisis, además de aumentar la fiabilidad del resultado al ser identificado y detectado el analito por dos técnicas diferentes. Este hecho justifica que el uso de técnicas cromatográficas multidimensionales está especialmente indicado para aquellas muestras cuya separación ofrezca gran dificultad. En este sentido, un caso clásico para recurrir a técnicas de análisis multidimensional es aquel en que debido, por ejemplo, a los amplios intervalos de polaridades, volatilidades

y concentraciones en los que pueden estar presentes un número elevado de compuestos, se observan numerosos solapamientos de picos cromatográficos.

El acoplamiento de dos técnicas permite que, en la primera dimensión se realice la separación parcial de los componentes de la muestra, de modo que sea posible seleccionar una fracción que contenga los compuestos de interés para, posteriormente, transferirla a la segunda dimensión. Esta última permite, finalmente, aumentar las resoluciones y capacidades de picos, en comparación con las alcanzadas en cada columna por separado. Muy frecuentemente, los tiempos de análisis son menores que los empleados con técnicas de análisis clásicas (unidimensionales) ya que se reduce a una única etapa la preparación, limpieza y enriquecimiento de muestra.

A continuación, se detallan algunos de los requerimientos que se exigen a estos sistemas acoplados.

1.2.1. Requisitos para el acoplamiento de dos técnicas de separación

Para el correcto acoplamiento de dos técnicas de separación, éstas deben reunir los siguientes requisitos (*Dabrio y col., 2000*):

Compatibilidad: tanto la naturaleza de la fase móvil utilizada en la primera dimensión como las condiciones experimentales adecuadas en cada caso (por ejemplo: presión, flujo y temperatura), no deben impedir el funcionamiento y la optimización de la separación a llevar a cabo en la segunda dimensión. En caso contrario, se debe lograr un determinado grado de compatibilidad recurriendo a una interfaz de conexión.

Independencia: para las técnicas acopladas directamente, o mediante una interfaz, es necesario que la autonomía de cada una de ellas sea lo mayor posible. Ocasionalmente, sin embargo, puede darse la desfavorable circunstancia de que algunas variables experimentales de la primera dimensión condicionen marcadamente la operación en la segunda por lo que será necesario minimizar este efecto.

Ortogonalidad: se refiere al hecho de que los mecanismos de separación de cada técnica deben ser lo más diferentes posible. Así, se aprovecha al máximo la capacidad

de separación de cada una de las dimensiones. Habitualmente solo es factible alcanzar un limitado nivel de ortogonalidad entre las técnicas implicadas en el acoplamiento.

Integración: las técnicas multidimensionales proporcionan una gran cantidad de información en el análisis de muestras complejas, por lo que el sistema debe permitir la adquisición de datos que simplifique su interpretación. Así, debe ser siempre posible obtener el registro de la separación lograda en cada una de las dimensiones implicadas en el acoplamiento.

1.2.2. Acoplamiento directo de cromatografía de líquidos y cromatografía de gases (LC-GC)

La combinación de las ventajas que poseen, por un lado, la cromatografía de líquidos de alta presión y, por otro, la cromatografía de gases supone que el acoplamiento directo de ambas sea una técnica rápida y de gran fiabilidad (*Grob*, 1991).

Como ya se ha mencionado, una de las utilidades destacables del acoplamiento LC-GC (ver Figura 2) es la de evitar, o minimizar en gran medida, la etapa de preparación, limpieza y enriquecimiento de la muestra. En este sentido, también ofrece otras ventajas, entre las que destacan: la eficacia en el aislamiento de la fracción de interés en la etapa de LC (lo que implica mayor selectividad en el análisis), tiempos más cortos de análisis y mayor fiabilidad en los resultados al evitar la manipulación de muestra, así como la elevada eficacia y sensibilidad alcanzables utilizando columnas capilares en la etapa de GC.

No obstante, los análisis mediante LC-GC no se han extendido como cabría esperar debido, fundamentalmente, a la dificultad que supone el acoplamiento directo de dos técnicas cromatográficas con fases móviles (líquido y gas en este caso concreto) cuya incompatibilidad es, en principio, evidente. Sin embargo, el esfuerzo realizado por distintos grupos de investigación en los últimos años en relación con la introducción de volúmenes elevados en GC, tanto mediante su inyección directa (*Hoh y Mastovska*, 2008) como recurriendo a la transferencia del eluyente procedente de una preseparación realizada en LC, han permitido lograr importantes avances. Como resultado, se han evaluado distintas interfaces (*Grob*, 1995, 2000; *Mondello y col.*, 1999; *Hyötyläinen y*

Riekkola 2003, 2005; *Cortés y col.*, 2006a, 2006b, 2008, 2009a, 2009b) y se ha demostrado su utilidad específica para analizar diferentes tipos de muestras (*Mondello y col.*, 1994).

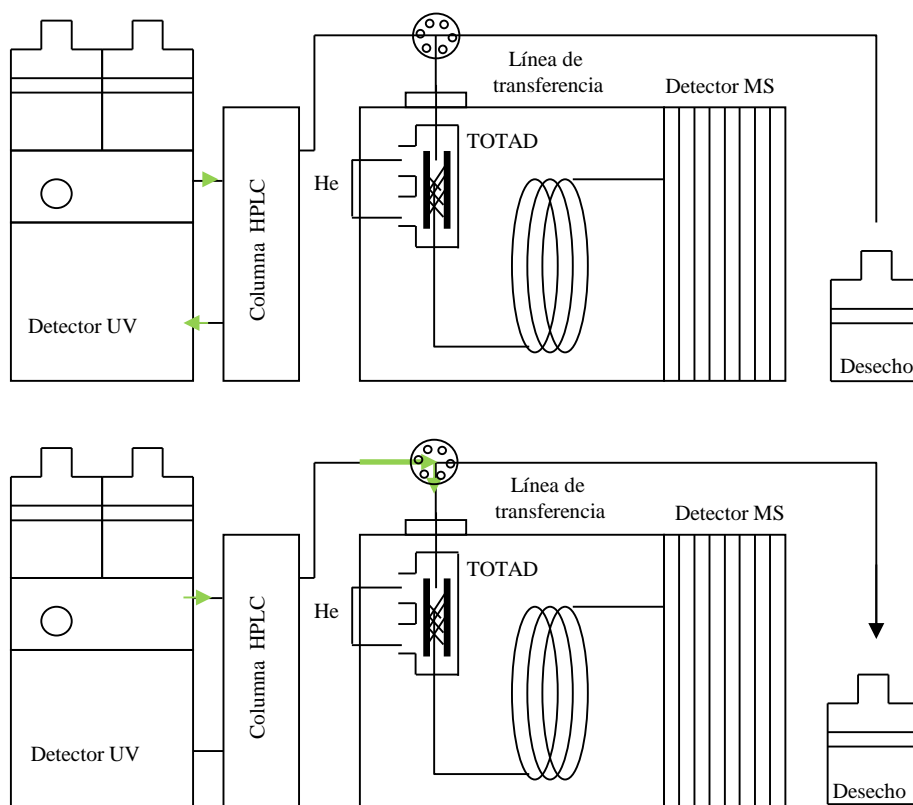


Figura 2: Acoplamiento LC-GC-MS mediante la interfaz TOTAD.

Debido a la menor dificultad que plantea la transferencia de un disolvente apolar respecto a uno polar (motivada, entre otras razones, por los menores volúmenes de vaporización resultantes en el primer caso), el acoplamiento entre cromatografía de líquidos en fase normal y cromatografía de gases (NPLC-GC) no supuso en su momento especial dificultad. Por el contrario, el empleo de fase inversa en cromatografía de líquidos (RPLC) que, por otro lado, es el modo de operación más frecuentemente utilizado cuando se trabaja con HPLC, ha requerido un esfuerzo considerable que se ha extendido a lo largo de más de una década.

A pesar de las ventajas que implica el sistema LC-GC, aún no se ha generalizado su uso debido, por un lado, a la ya mencionada dificultad que supone el acoplamiento directo de dos técnicas cromatográficas con fases móviles incompatibles. Adicionalmente, es necesario considerar el hecho de que la introducción en GC de un volumen elevado de muestra (ya sea por inyección directa en el cromatógrafo de gases o mediante la transferencia de una fracción procedente de LC) exige recurrir a procedimientos que permitan separar selectivamente el disolvente (o el eluyente) de los solutos de interés. Estos últimos, a su vez, deben ser depositados a la entrada de la columna de separación, de modo que ocupen una banda (o zona cromatográfica) lo más estrecha posible. Por esta razón, el logro de la introducción directa de volúmenes elevados en cromatografía de gases (*Large Volume Injection*, LVI o *Large Volume Sampling*, LVS) fue el paso previo que permitió afrontar el desarrollo del acoplamiento LC-GC.

La introducción directa de volúmenes elevados de muestra en cromatografía de gases permite llevar a cabo una concentración interna (en el propio inyector del cromatógrafo) mediante la eliminación, por evaporación total o parcial, del disolvente utilizado mientras se favorece la retención de los solutos de interés en un material adecuado. Ello supone la posibilidad de eliminar la etapa de preparación previa de la muestra y, simultáneamente, de aumentar la fiabilidad del análisis de compuestos presentes en baja concentración.

Entre las técnicas que se han desarrollado para la introducción de volúmenes elevados en GC (*Hoh y Mastovska, 2008*) destaca la inyección en columna y la que supone el empleo de un vaporizador con temperatura programada (PTV). Asimismo, los principios en los que se sustentan han sido posteriormente utilizados para el acoplamiento LC-GC, según se resume a continuación.

Interfaces utilizadas para el acoplamiento directo LC-GC

El primer sistema de LC-GC fue descrito por Majors en 1980 y consistía en un cromatógrafo de líquidos convencional unido a un cromatógrafo de gases provisto de un inyector automático. Las primeras aplicaciones de LC-GC se refieren casi exclusivamente al empleo de microcolumnas en cromatografía de líquidos (Cortes y col., 1985a, 1985b; Duquet y col., 1988). Sin embargo, la baja capacidad de estas columnas resulta una desventaja cuando se pretende analizar compuestos traza. En 1986 se describió el primer sistema automático LC-GC utilizando el inyector denominado *on-column* y, a partir de esa fecha, se comenzaron a publicar una serie de trabajos en los que casi exclusivamente se utilizaba fase normal en la preseparación realizada en el cromatógrafo de líquidos (Grob y col., 1989; Barcarolo, 1990).

La consideración de los antecedentes bibliográficos existentes sobre el tema permite destacar como un aspecto de especial importancia el que se refiere a la elección de la interfaz más adecuada para llevar a cabo un análisis por RPLC-GC. Concretamente, se han descrito cuatro tipos principales: la interfaz en columna, la de tipo espira, la que supone el empleo de un PTV, y la denominada *Through Oven Transfer Adsorption Desorption* (TOTAD). A continuación, se resumen algunos aspectos relativos a cada una de ellas.

La **interfaz en columna** se fundamenta en el empleo de un inyector *on-column* y de la técnica denominada *retention gap* (zona sin retención) (Grob y col., 1985; Grob, 1987) que posibilita la evaporación del eluyente procedente de la preseparación realizada en LC mientras se retiene la muestra a la entrada del sistema cromatográfico. Para ello, se introduce la muestra transferida en un tubo capilar, sin recubrir con fase estacionaria, mantenido a una temperatura inferior al punto de ebullición (a la presión en el inyector) del eluyente utilizado. De esta manera, se dificulta la vaporización de este último y, como consecuencia, que pueda retroceder hacia la zona del inyector e incluso hacia la línea de gas portador.

Con el modo de operación descrito se consigue finalmente la formación de una película en la pared interior del capilar que permite enfocar la muestra tanto por el efecto del disolvente como por la diferencia de relación de fases entre la zona sin

retención y la zona ocupada por la fase estacionaria de la columna utilizada en GC. Un aspecto de especial importancia para el correcto funcionamiento de esta interfaz es la necesidad de disponer, a lo largo de toda la zona sin retención, de una película de eluyente con la uniformidad y estabilidad suficientes como para evitar la inundación (*flooding effect*) de la misma.

En el momento en que se establecen las condiciones experimentales necesarias para producir la evaporación de la película de disolvente, que tiene lugar en el sentido de avance del gas portador, los compuestos más volátiles comienzan a migrar y son enfocados en el punto en que finaliza el proceso de evaporación. Adicionalmente, la diferencia existente entre las velocidades de migración alcanzadas en la zona sin retención y en la que existe en la fase estacionaria, posibilita el avance más rápido de las moléculas situadas en la parte posterior de la zona cromatográfica en comparación con las de la parte frontal. En consecuencia, se logra asimismo el enfoque de los compuestos menos volátiles.

La **interfaz tipo espira** consta básicamente de una válvula de seis vías y de un *loop* (o espira) en cuyo interior es posible retener una fracción procedente de la preseparación realizada en LC. Mediante la conmutación de esta válvula y la aplicación del flujo adecuado de gas portador se logra transferir dicha fracción al cromatógrafo de gases cuyo horno debe mantenerse a una temperatura superior al punto de ebullición del eluyente (corregido a la presión de entrada), con objeto de evitar la introducción de líquido en la columna ya que ello podría provocar su deterioro irreversible.

El correcto funcionamiento de la interfaz considerada exige introducir la muestra en GC con una velocidad controlada, de modo que sea factible lograr la evaporación simultánea del eluyente. La utilidad de este sistema de transferencia de muestra se limita a la determinación de compuestos relativamente poco volátiles, cuya temperatura de ebullición sea de 80 a 100°C superior a la temperatura de ebullición del eluyente. Por consiguiente, la aplicación de esta interfaz en aquellos casos en que sea necesario emplear eluyentes acuosos en la primera dimensión es únicamente posible para analizar compuestos de elevado punto de ebullición (*Grob y Schilling, 1983a, 1983b*).

Una **interfaz basada en el empleo de un inyector PTV** incluye una cámara de vaporización en cuyo interior dispone de una camisa de vidrio (*glass-liner*) sellada con un cono de grafito, con objeto de asegurar la circulación interna del gas portador. Su funcionamiento es similar a los inyectores convencionales tipo *split/splitless*, aunque con la particularidad de permitir su rápido calentamiento y enfriamiento. De este modo, es posible realizar la inyección a baja temperatura (con lo que se minimiza el riesgo de discriminación de algunos compuestos en función de su volatilidad) y lograr inmediatamente la vaporización de los compuestos inyectados y su homogeneización con el gas portador. Adicionalmente, el inyector PTV ofrece la posibilidad de realizar la introducción de muestra en la modalidad denominada *solvent split* que implica la eliminación del disolvente minimizando el riesgo de pérdida de los compuestos de interés.

La utilidad de vaporizar la muestra con temperatura programada antes de realizar el análisis cromatográfico fue descrita por *Abel* en 1964, y desarrollada por *Vogt* y col. en 1979 mediante su aplicación para la introducción de volúmenes de muestra superiores a 20 µl. Posteriormente, *Schomburg* y col. (1981) junto con *Poy*. y col. (1981) demostraron que la inyección en frío, tanto en el modo *split* como en *splitless*, reduce casi por completo la discriminación observada en aquellos casos en los que la inyección se realiza a temperatura elevada.

El potencial y las limitaciones del empleo del inyector PTV han sido estudiados por *Herraiz* y col. (1987), así como por *Termonia* y col. (1988), quienes han puesto de manifiesto las variables que es preciso optimizar cuando se pretende, bien evaluar su aplicabilidad para la introducción de volúmenes elevados en una columna capilar, bien establecer su potencial como interfaz del acoplamiento LC-GC. Como resultado de estos estudios se ha concluido que las variables más importantes para lograr la recuperación de los componentes de interés y la eliminación efectiva del disolvente son: la temperatura del PTV durante la transferencia, la velocidad tanto del eluyente procedente de cromatografía de líquidos como del gas portador durante la etapa de transferencia, la apertura del divisor de flujo, el tiempo de purga (tiempo adicional que se mantiene el flujo de gas portador al finalizar la transferencia), el diseño del *glass-liner*, el material de retención utilizado y la naturaleza del eluyente.

Cuando se emplea para LC-GC (*Señoráns y col.*, 1995a, 1995b) la interfaz consta de una válvula multivía, una línea de transferencia para conducir la fracción procedente del cromatógrafo de líquidos, que suele ser un tubo de sílice fundida, y el inyector PTV. Cambiando la posición de la válvula, el eluyente procedente del cromatógrafo de líquidos se puede enviar al desecho o transferir a la interfaz. Esta técnica permite, por tanto, transferir la muestra al cromatógrafo de gases a temperatura inferior a la del punto de ebullición del eluyente, posibilitando su eliminación a través de la válvula del *split*. Al mismo tiempo, los solutos quedan retenidos en el *glass-liner*, relleno con un material adsorbente o absorbente, colocado en el interior del inyector. A continuación, los compuestos retenidos son desorbidos térmicamente y transferidos a la columna para proceder a su análisis cromatográfico.

Staniewski y Rijks, 1992 determinaron la máxima velocidad de transferencia que es posible aplicar para conseguir eliminar todo el disolvente en forma de vapor y evidenciaron la dificultad que, en el caso de transferir volúmenes elevados a cromatografía de gases, implica el hecho de que la eliminación del disolvente durante la introducción de muestra se produzca únicamente por evaporación. En el caso concreto de utilizar eluyentes acuosos, esta dificultad se ve acentuada ya que su calor de vaporización puede provocar la disminución de la temperatura de la interfaz, impidiendo hasta tal punto la posterior evaporación del eluyente que podría incluso no tener lugar. Parece evidente, por tanto, la concurrencia de un mecanismo de eliminación complementario a la vaporización como es la extracción en fase sólida que se produce en el material colocado en el interior del PTV para retener los compuestos transferidos. La eficacia de este proceso dependerá de las afinidades relativas de esos compuestos por el material y por el eluyente en el que están disueltos (es decir, el utilizado como fase móvil en la preseparación realizada en LC).

Un importante inconveniente del empleo de esta interfaz se refiere a la gran dificultad que implica la automatización del proceso debido a que la eliminación efectiva del eluyente exige, al menos en algunas ocasiones, la desconexión de la columna cromatográfica durante la etapa de transferencia.

En cualquier caso, el empleo de una interfaz basada en un vaporizador con temperatura programada permitió finalmente realizar el acoplamiento RPLC-GC (Señoráns y col, 1995a; Blanch y col., 1998a) y confirmar el amplio campo de aplicación de la técnica (Blanch y col, 1998b; Señoráns y col, 1998; Ruiz del Castillo y col., 2000, 2003, 2008; Flores y col., 2006, 2007a, 2007b).

A continuación, se describe algunos antecedentes bibliográficos relativos tanto a su diseño como al modo de operación de la interfaz denominada TOTAD (*Through Oven Transfer Adsorption Desorption*), debido a que en el trabajo experimental que se desarrolla en esta *Memoria* se emplea dicha interfaz.

1.2.2.1. Interfaz *Through Oven Transfer Adsorption Desorption* (TOTAD)

La interfaz TOTAD fue descrita por primera vez por Pérez y col., en 1999. Se basa en una modificación del inyector PTV que supone una variación sustancial tanto de su neumática como del procedimiento seguido para introducir o transferir la muestra y para conseguir, en último término, la eliminación efectiva del eluyente procedente de la preseparación realizada en LC (Pérez y col. 2000; Alario y col., 2001; Sánchez y col., 2005).

El cromatógrafo de gases está modificado de modo que, cuando se está realizando la transferencia, es posible aplicar un flujo de helio, desde la parte inferior del *glass-liner* a la superior, con objeto de facilitar la retención de los compuestos de interés en un material adecuado (por ejemplo, un adsorbente como el Tenax TA), mientras se elimina el disolvente.

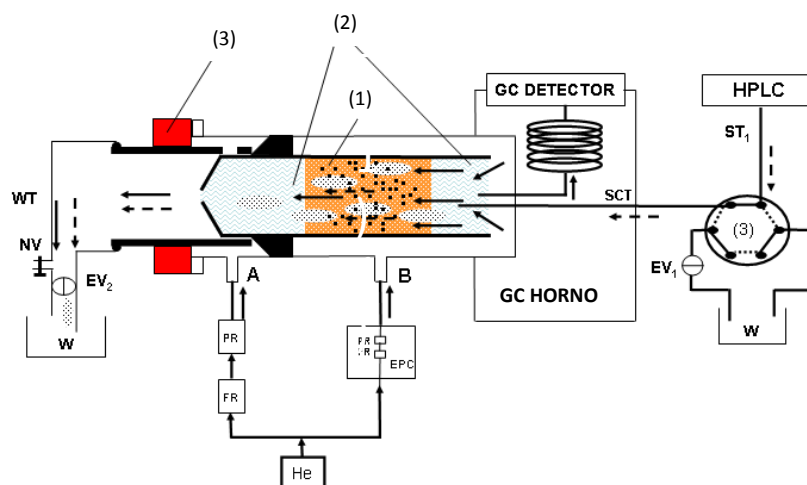


Figura 3: Interfaz TOTAD: (1) material absorbente o adsorbente; (2) lana de vidrio; (3) tapón calefactado; (EV₁ y EV₂) electroválvula 1 y 2; (EPC) controladores de presión electrónicos; (PR) regulador de presión; (FR) regulador de flujo; (ST₁) tubo de acero inoxidable, 0,25 mm d.i., para transferir el eluyente del LC a la válvula de seis vías; (SCT) capilar de sílice fundida, 0,32 mm d.i.; (WT) tubo del desecho; (NV) válvula de aguja; (W) desecho.

El diseño de la interfaz posibilita, igualmente, la aplicación de un flujo de helio en sentido opuesto al anterior, con la finalidad de transferir los compuestos retenidos a la columna del cromatógrafo de gases, después de lograr su desorción térmica en el PTV. El funcionamiento del sistema LC-TOTAD-GC (Figura 3), está totalmente automatizado y su versatilidad y robustez para analizar muestras de muy distinta naturaleza han quedado evidenciadas en trabajos publicados muy recientemente (Cortés y col., 2006a, 2006b, 2008, 2009a, 2009b; Sánchez y col., 2006a, 2006b) que, en algunos casos, incluyen la monitorización simultánea de varios compuestos utilizando detectores de diferente selectividad (Díaz-Plaza y col., 2007) o la evaluación de materiales absorbentes para retener los compuestos transferidos (Flores y col., 2008) o, incluso, la demostración de la capacidad de la interfaz TOTAD para analizar, mediante GC-MS, compuestos traza presentes tanto en determinadas muestras acuosas (Toledano y col., 2010) como en otras que poseen un elevado contenido de materia grasa (Martínez y col., 2011).

1.2.3. Cromatografía de gases multidimensional (MDGC)

Esta técnica consiste en el acoplamiento en serie de dos columnas de cromatografía de gases de distintas características (en cuanto a, por ejemplo, su polaridad, selectividad, eficacia y capacidad de carga), de manera que sea posible transferir de la primera columna (denominada precolumna) a la segunda (denominada columna principal) una fracción estrecha, integrada por solutos mal resueltos, para lograr finalmente su separación. En último término, esta técnica facilita el análisis de un elevado número de compuestos presentes en muestras complejas a la vez que simplifica significativamente la experimentación requerida para su consecución (Deans, 1981; Schomburg, 1995; Barba y col., 2010a, 2010b).

Se emplea habitualmente el término cromatografía multidimensional para hacer alusión a una separación en la que se utilizan dos mecanismos de separación ortogonales para aumentar la selectividad del análisis. En el caso de que únicamente se transfieran algunas fracciones específicas de la primera a la segunda dimensión, se habla de cromatografía multidimensional y, ocasionalmente, se indica el número de dimensiones implicadas (es decir, cromatografía multidimensional, 2-D). Sin embargo, aunque el acoplamiento en serie de dos columnas de gases (GC-GC) o (GC)² es, en sentido estricto, una técnica bidimensional, en la bibliografía existente sobre el tema se designa como cromatografía de gases multidimensional (MDGC) y se utiliza muy frecuentemente las denominaciones de precolumna y columna principal para la primera y la segunda dimensión del sistema, respectivamente.

Entre las técnicas cromatográficas multidimensionales, también es interesante destacar la denominada cromatografía de gases completa en dos dimensiones (*Comprehensive Two Dimensional Gas Chromatography*, GC x GC) (de Geus y col, 1996). En este caso, mediante el uso, en la primera y en la segunda dimensión, de columnas de diferentes longitudes y diámetros internos, es posible someter todos los componentes de una determinada muestra a dos procesos de separación. Para ello, se emplea una interfaz (o modulador) que permite retener, enfocar y transferir a la segunda dimensión, a intervalos de tiempo previamente determinados, todas las fracciones eluidas de la primera columna. En último término, se logra una separación muy rápida en la segunda dimensión, de modo que los tiempos de análisis son muy similares a los

resultantes de una separación unidimensional, con la ventaja añadida de que la capacidad de picos es significativamente mayor.

Si bien no se ha utilizado esta técnica durante el trabajo experimental detallado en esta *Memoria*, es obligada su consideración en el contexto del estudio realizado debido al potencial de su uso para el análisis de muestras complejas de muy distinta naturaleza (*Adachour y col.*, 2008; *Cortes y col.*, 2009; *Bicchi y col.*, 2011).

Retomando la MDGC las dos columnas que componen el sistema deben estar en hornos diferentes (Figura 4), o en uno con distintos compartimentos que permitan el control independiente de sus respectivas temperaturas, ya que éste es un aspecto determinante para optimizar la separación en cromatografía de gases. Igualmente, el sistema debe disponer, al menos, de dos detectores, uno situado al final de la columna principal que sirve para detectar los compuestos transferidos y otro entre las dos columnas acopladas. Este último detector se utiliza para registrar la separación lograda en la precolumna y seleccionar la fracción que se desea transferir.

Por otro lado, el sistema de transferencia o interfaz debe impedir el deterioro de la eficacia lograda en la separación realizada en la precolumna, además de ofrecer una superficie inerte y un volumen muerto mínimo, así como una baja inercia térmica. Una alternativa ventajosa es la basada en el sistema descrito inicialmente por *Deans* en 1968, que permite establecer y controlar diferentes flujos de gas y que se conoce como conexión de tipo Deans o *live switching*.

Además de permitir transferir la fracción de interés evitando el contacto de los analitos con cualquier válvula, el empleo de MDGC puede reducir el tiempo de análisis mediante la purga de aquellos compuestos con tiempos de retención elevados, y sin interés analítico, mediante lo que se denomina *backflush*.

En lo que concierne al uso de esta técnica, es destacable la posibilidad de incrementar la cantidad de compuestos que se pueden resolver correctamente, especialmente en el análisis de muestras complejas. En particular, la MDGC es muy útil para lograr resoluciones enantioméricas de compuestos quirales presentes en muestras de muy diferente naturaleza. Adicionalmente, puede permitir reducir el tiempo de

análisis y mejorar la determinación de compuestos traza eluidos en una zona de la precolumna próxima a la del disolvente (o a la de los compuestos mayoritarios presentes en la muestra). La optimización, de modo independiente, del programa de temperatura en ambas dimensiones evita un calentamiento de la columna principal que, de otro modo, sería necesario para eliminar los compuestos de baja volatilidad que no resulten de interés para el análisis.

El hecho de que en las dos dimensiones involucradas en el acoplamiento se utilice la misma fase móvil implica un evidente alto grado de compatibilidad que ha facilitado en gran medida el rápido desarrollo de la técnica. Ello, a su vez, ha permitido poner de manifiesto la utilidad de su aplicación en diferentes muestras como son las obtenidas en el proceso de refinado del petróleo, ambientales o de aromas, entre otras (Schomburg y col., 1984, 1985; Full y col., 1993; Mondello y col., 1998; de Alencastro y col., 2003; Lorenzo y col., 2005).

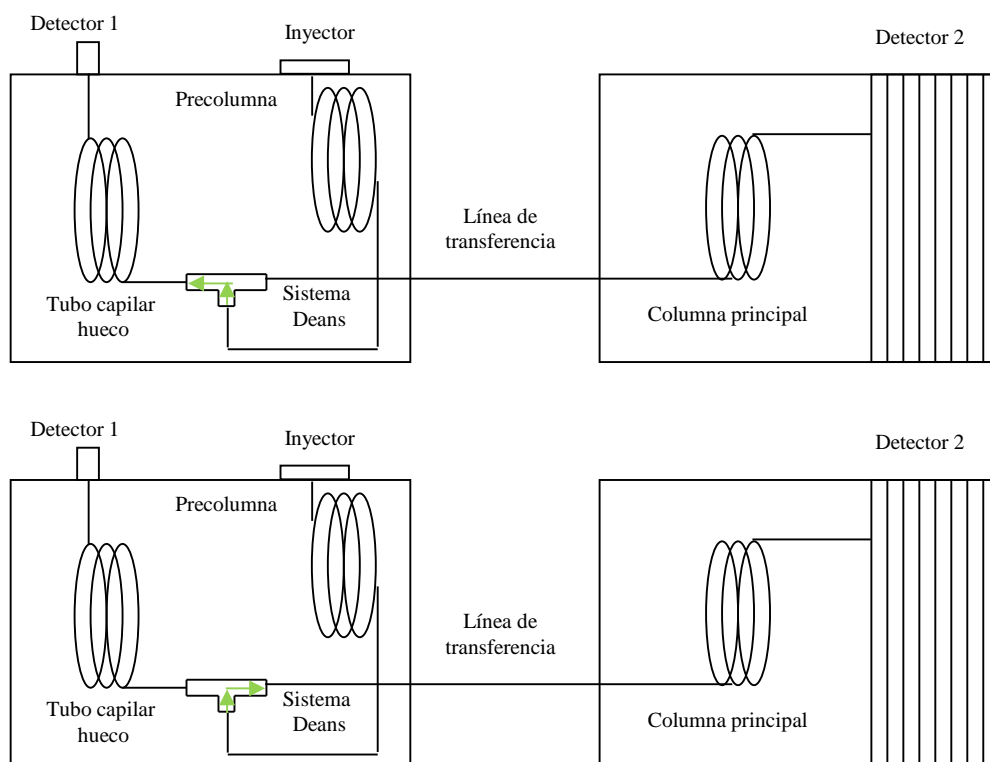


Figura 4: Equipo de cromatografía de gases multidimensional.

1.3. Cromatografía en lecho móvil simulado con fluidos supercríticos (SF-SMB).

Escala preparativa

A lo largo de los siguientes apartados se revisarán los aspectos fundamentales de la SF-SMB, desde su origen y primeras aplicaciones hasta la actualidad.

1.3.1. Introducción cronológica a la cromatografía en lecho móvil simulado

En 1961, *Broughton* y *Gerhold* introdujeron el concepto de simulación del movimiento del lecho (*Simulated Moving Bed*, SMB), como aplicación práctica del concepto denominado *True Moving Bed* (TMB). En el apartado 1.3.3. de este capítulo se revisan, de manera teórica, dichos conceptos. Originariamente, el proceso de SMB se desarrolló para aplicaciones en petroleoquímica, de manera que un determinado número de columnas cromatográficas fijas y mediante una serie de válvulas de entrada y de salida, cuya conmutación podía realizarse en la dirección del flujo del fluido, permitían obtener separaciones a escala industrial (*Broughton* y *Gerhold*, 1961).

A finales de 1990, se desarrolló el proceso denominado *Eluxyl* para la separación de los isómeros de xileno (*Ash* y col., 1994). Al mismo tiempo, se describió el primer ejemplo de separación de enantiómeros mediante cromatografía en lecho móvil simulado (*Negawa* y *Shoji*, 1992; *Ching* y col., 1993; *Nicoud* y col., 1993). Este hecho hizo que aumentara el interés por la técnica, como causa de sus prometedores resultados en separaciones complejas como son, habitualmente, las de compuestos quirales. En 1997, solo cinco años después de lograr la primera separación de enantiómeros, se instaló la primera planta para la producción de fármacos a gran escala en la industria UCB Pharma (*McCoy*, 2000). Por lo tanto, es sorprendente la rápida adaptación de la técnica a nivel industrial.

Años más tarde, en 2002, la FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó la comercialización del fármaco enantiopuro denominado *Lexapro* obtenido mediante SMB (*Anonymous*, 2003). Este evento supuso la primera aparición en el mercado de un fármaco obtenido mediante la tecnología de SMB. Es evidente que el rápido escalado y su aplicación industrial fueron debidos a las ventajas y posibilidades que ofrece la técnica. Sin embargo, debido a las estrictas cláusulas de confidencialidad de las

empresas, es difícil de estimar a día de hoy hasta qué punto está extendido su empleo. El creciente interés por esta tecnología resulta, igualmente, evidente si se considera el número de publicaciones y patentes relacionadas con SMB en esta última década (Rajendran y col., 2009).

En resumen, los trabajos publicados en los últimos años sobre SMB han puesto de manifiesto su potencial para la separación de compuestos a escala preparativa y han permitido afianzar algunos aspectos básicos relativos a su uso (Erdem y col., 2006; Mazzotti, 2006; Amanullah y col., 2007; Paredes y Mazzotti, 2007; Peper y col., 2007; Grossmann y col., 2008a, 2008b; Henke y col., 2008; Rajendran, 2008; Rajendran y col., 2009). En concreto, distintos autores han señalado la utilidad del empleo conjunto de las tecnologías de fluidos supercríticos y de SMB, hasta el punto de destacar esta posibilidad entre las que se consideran como más prometedoras del siglo XXI (Taylor, 2009).

1.3.2. Cromatografía por etapas: antecedentes de SMB

Tradicionalmente, la cromatografía se ha empleado como técnica de separación a escala analítica, pero cada vez es mayor el interés en desarrollar métodos cromatográficos adecuados para la separación y obtención de compuestos a escala preparativa (Schurig, 2001; Subramanian, 2001).

Mediante la cromatografía por etapas (*Batch Process Chromatography*, BPC), es posible obtener altas puridades, como son las requeridas en química fina o farmacéutica, pero tanto los rendimientos como la eficacia del proceso son bajos respecto a los conseguidos en cromatografía trabajando en continuo. Por el contrario, en el caso de la cromatografía por etapas, las sucesivas inyecciones de muestra se realizan en discontinuo. Tal como se muestra en la Figura 5, el proceso incluye las cuatro etapas siguientes: en la primera se realiza la inyección de la mezcla a separar; en la segunda se eluye el producto; en la tercera tiene lugar la recolección de los compuestos separados y en la cuarta se regenera la fase estacionaria mediante la circulación del eluyente empleado en el proceso. Estas etapas se repiten sucesivamente hasta alcanzar los rendimientos necesarios en cada caso concreto. Al trabajar en discontinuo, la cantidad

de eluyente empleada es muy elevada y la fase estacionaria tiene una vida útil corta (Chin y Wang, 2004).

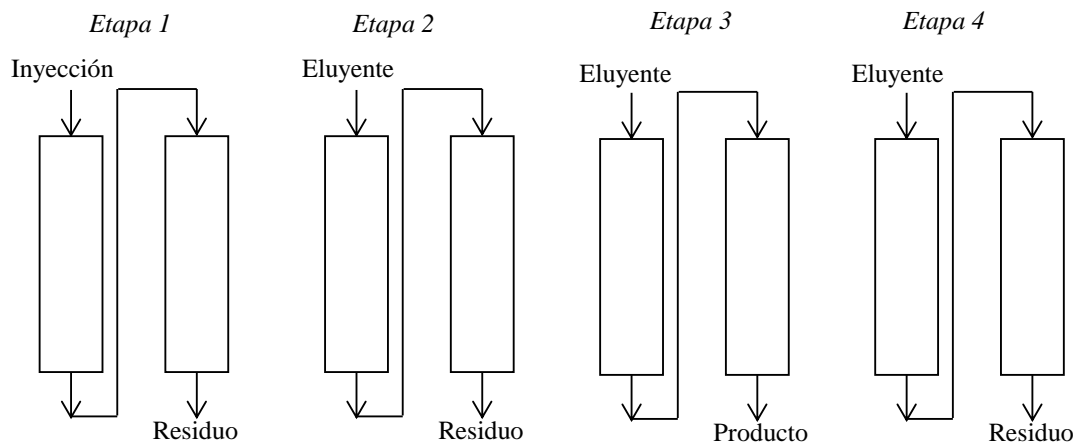


Figura 5: Modo de operación en cromatografía discontinua por etapas.

Las limitaciones de la cromatografía por etapas hace que se hayan desarrollado nuevas técnicas de cromatografía en continuo, como la cromatografía en lecho móvil simulado, que permite disponer de un proceso en el que se lleva a cabo una cromatografía en contracorriente (Subramanian, 2001; Poole, 2003), mejorando tanto la eficacia como los rendimientos obtenidos, especialmente en aquellos casos en los que la separación es de especial dificultad como es, por ejemplo, la de los enantiómeros de un compuesto quiral (Rajendran y col., 2009).

1.3.3. Conceptos teóricos de cromatografía en lecho móvil verdadero (TMB) y SMB

En ocasiones, para explicar el concepto de cromatografía en lecho móvil simulado se recurre a una descripción de la cromatografía en lecho móvil verdadero, por ser más intuitiva o cromatografía en contracorriente verdadera (*True Counter Current, TCC*) (Mazzotti y col., 1997).

En la Figura 6 se muestra un sistema TMB. Según se puede observar, el lecho está dividido en cuatro zonas, cada una de las cuales desempeña un papel específico en la separación de la mezcla de los componentes. El compuesto más retenido (A) se denomina extracto, y el compuesto menos retenido (B), refinado. Si se realiza una inyección, por la parte central del sistema, de una mezcla (A+B), la separación se llevará a cabo en las zonas centrales (2 y 3). El componente A, al ser más retenido, seguirá el sentido del desplazamiento de la fase estacionaria, mientras que el componente B, al estar menos retenido, seguirá el sentido de la fase móvil. Para un sistema cerrado, la fase móvil se introduce por la zona 1, se hace circular hasta la zona 4 y desde ese punto se dirige de nuevo a la zona 1, ya regenerada. De la misma forma, la zona 4 de la fase estacionaria queda regenerada tras la salida del componente menos retenido y la fase móvil se recircula a la zona 1.

Por tanto, respecto a las técnicas cromatográficas preparativas clásicas, la configuración TMB tiene la ventaja de posibilitar la continuidad del proceso y de aumentar el rendimiento de la separación, debido al movimiento a contracorriente de los flujos de fase móvil y fase estacionaria.

Evidentemente, la configuración TMB no es la adecuada para un proceso al que se exija su fácil implementación en un laboratorio debido a las indudables dificultades que genera el movimiento de la fase estacionaria (estática por definición). Por esta razón, en la práctica se realiza una simulación del movimiento del lecho. Esto se consigue mediante el cambio secuencial y continuo de la zona (o columna) por la que se introduce la muestra (A + B), ya que ello permite simular el movimiento del material (concretamente, del utilizado como relleno en las columnas) a contracorriente respecto a la dirección del eluyente que, a su vez, debe circular permanentemente por el sistema. Simultáneamente (y coincidiendo con el sentido del desplazamiento del eluyente), deben conmutarse las válvulas que permiten la entrada del eluyente (D) y las salidas del extracto (A + D) y del refinado (B + D) de la columna correspondiente en cada caso. De este modo, es posible lograr el enriquecimiento progresivo y, en último término, la separación, en zonas diferentes del sistema, de los compuestos de interés.

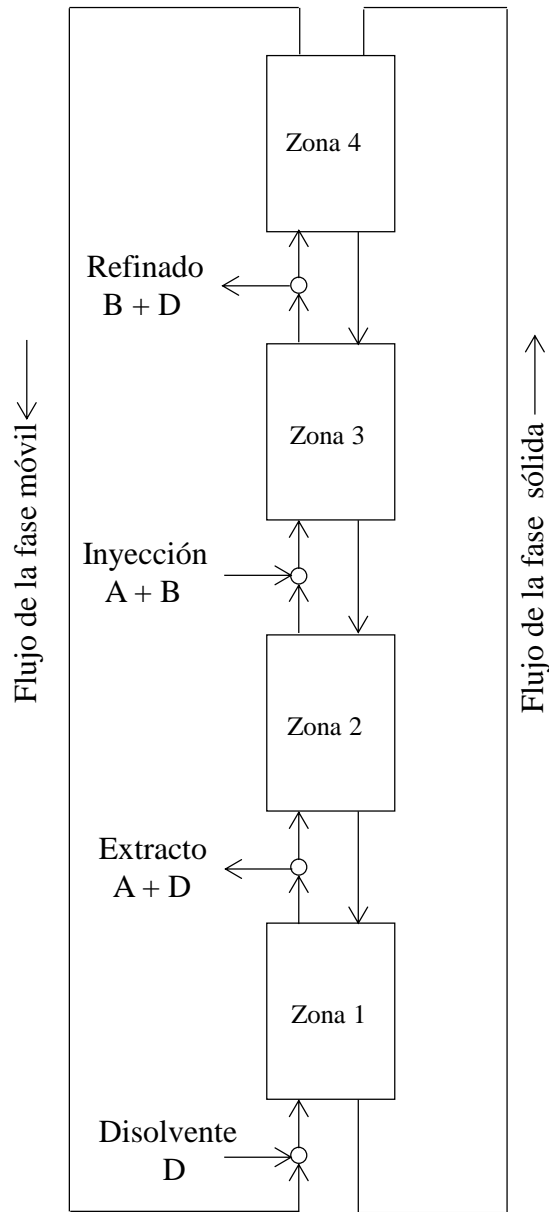


Figura 6: Sistema de cromatografía en contracorriente en lecho móvil verdadero (*True Moving Bed, TMB*) para la separación de dos componentes A y B.

En la Figura 7 se muestra un sistema de cromatografía en lecho móvil simulado, donde cada zona está dividida en secciones o columnas, cada una de las cuales desempeña un papel específico en la separación. Esta configuración corresponde, concretamente, a un sistema de 4 zonas, con dos columnas en cada una de ellas (configuración: 2-2-2-2), lo que hace un total de 8 columnas. La configuración más simple de las posibles en un sistema SMB supone un total de cuatro columnas, distribuidas a razón de una columna en cada zona (configuración 1-1-1-1).

Durante un proceso cromatográfico en lecho móvil verdadero, al ser en continuo y a contracorriente, se adquiere la condición de estado estacionario, así que cada variable del proceso permanece constante en cada sección. Sin embargo, el régimen estacionario alcanzado en la cromatografía en lecho móvil simulado es cíclico. Esto quiere decir que el régimen está determinado por el tiempo de conmutación de las válvulas, la entrada de eluyente y la salida del extracto y la del refinado (*Storti y col., 1992*).

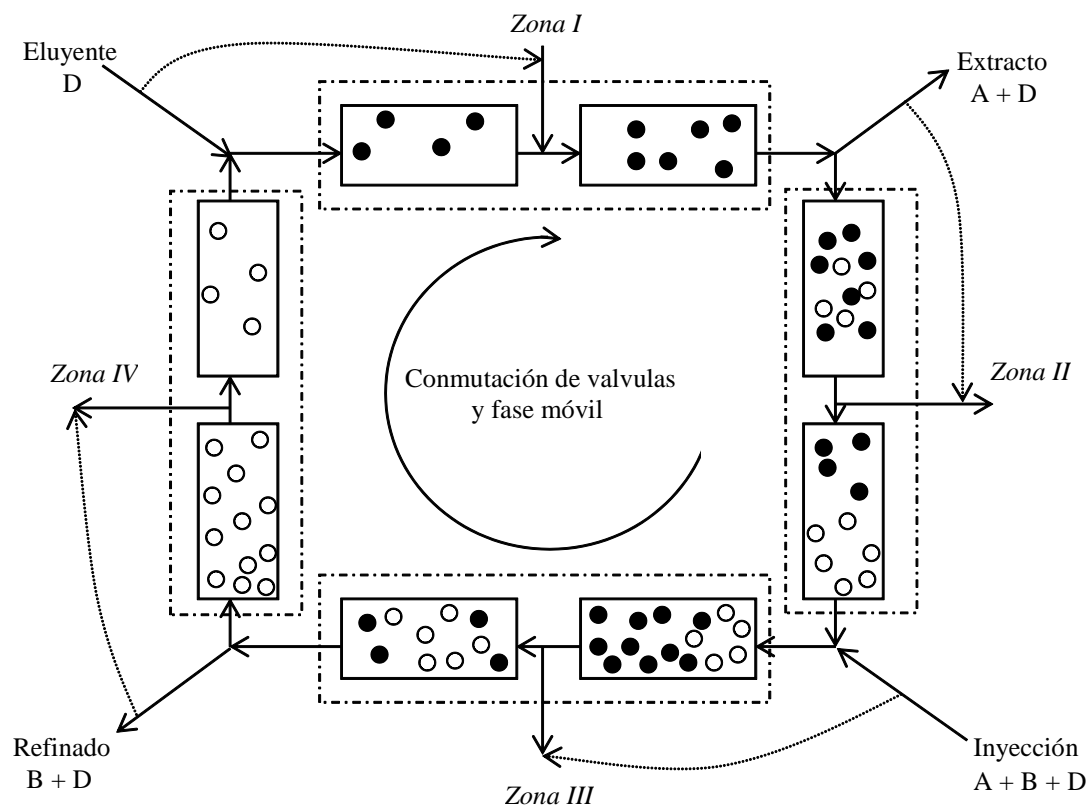


Figura 7: Sistema de cromatografía en lecho móvil simulado (Simulated Moving Bed, SMB) para la separación de dos componentes A (círculos blancos) y B (círculos negros).

En la Figura 8 se muestran los perfiles axiales de concentración en las columnas que forman el sistema de cromatografía en lecho móvil simulado, una vez alcanzado el régimen estacionario. Por las ventajas en rendimiento y eficacia que la técnica ofrece, este tipo de cromatografía se ha empleado para obtener a escala preparativa compuestos, tanto quirales como aquirales, según se resume en el siguiente apartado.

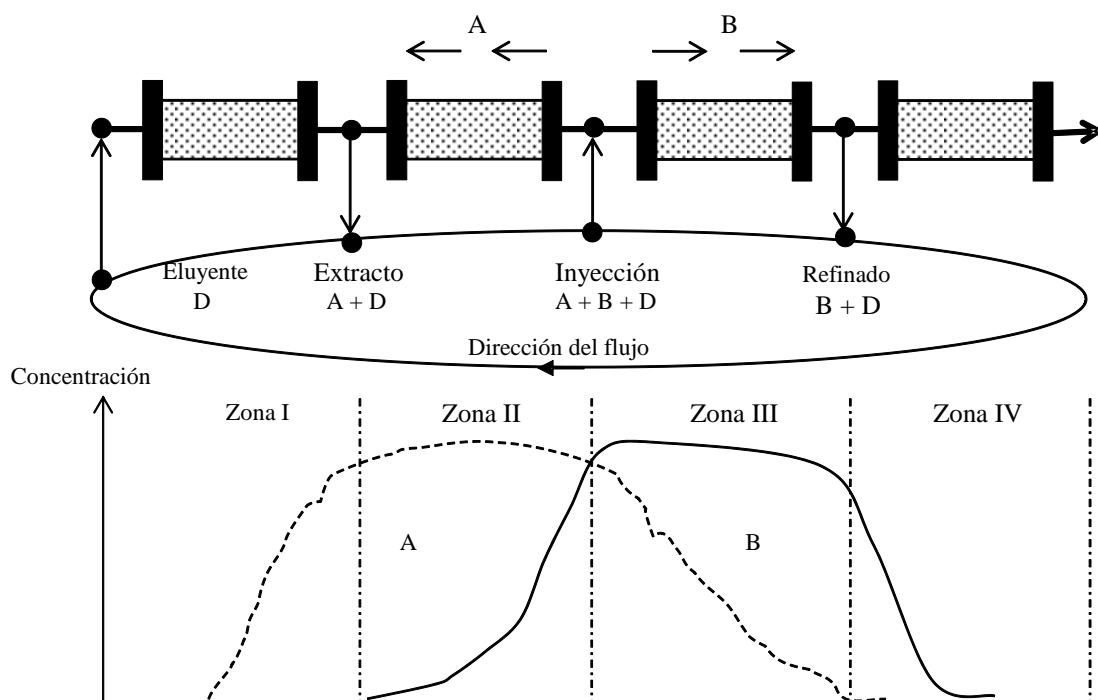


Figura 8: Perfil axial de concentración de los compuestos a separar a lo largo del proceso de cromatografía en lecho móvil simulado. A es el compuesto más retenido en la fase estacionaria (extracto), B es el menos retenido (refinado) y D es el eluyente.

1.3.4. Análisis de muestras reales con SMB

En la última década, se ha comenzado a trabajar con plantas piloto y a escala de laboratorio, lo que ha permitido poner de manifiesto la utilidad de SMB para la separación de compuestos de alto valor añadido en diversas áreas como química fina, biotecnología, farmacología, etc. Aunque su uso se recomienda especialmente para la obtención de enantiómeros puros (*Guest*, 1997; *Juza* y col., 2000; *Subramani* y col., 2004; *Rajendran* y col., 2009), es interesante destacar en este punto la adecuación del proceso para la purificación de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) con actividad biológica; la separación de isómeros *cis-trans* y, en general, de compuestos con propiedades similares (cuya resolución cromatográfica ofrece, por tanto, especial dificultad) presentes en matrices complejas (*Juza* y col., 1998, 2000; *Depta* y col., 1999; *Biressi* y col., 2000; *Denet* y col., 2001; *Johannsen* y col., 2002; *Meissner* y *Carta*, 2002; *Mun* y col., 2003; *Molnár* y col., 2005).

Debido a las muchas y diversas aplicaciones de la cromatografía en lecho móvil simulado, el diseño de las plantas piloto adecuadas para implementar el proceso debe contemplar la necesidad de que sean lo más versátiles posibles para poder realizar el mayor número de separaciones.

1.3.5. Consideraciones en el diseño del equipamiento para plantas piloto de SMB

Al igual que sucede en diferentes campos de investigación, la cromatografía en lecho móvil simulado tiene una terminología específica. Por esta razón, se indican a continuación algunos de los términos más frecuentemente utilizados.

La fase móvil empleada suele ser un líquido y, en este caso concreto, es habitual el empleo de la sigla SMB para denominar la técnica. Sin embargo, cuando la fase móvil es un gas o un fluido supercrítico se designa con las siglas GC-SMB (*Biressi y col.*, 2000) y SF-SMB (*Depta y col.*, 1999; *Denet y col.*, 2001; *Johannsen y col.*, 2002), respectivamente. Además, se han descrito plantas en las que se realiza una reacción química en el interior de las columnas por lo que se cita como *Simulated Moving Bed Reactor* (SMBR) (*Meissner y Carta*, 2002).

Como se ha comentado anteriormente, los sistemas se suelen clasificar según el número de zonas (o regiones de flujo constante) y el número de columnas que tiene cada zona. Las zonas se establecen una vez alcanzado el régimen cíclico estacionario, caracterizándose cada una de ellas por realizar una función determinada en la separación.

Si el circuito es cerrado y la fase móvil se recircula, se denomina *close-loop*; los sistemas abiertos se conocen como *open-loop*. Este tipo de sistemas, aunque consumen más cantidad de disolvente, tienen dos claras ventajas: la estabilidad de la bomba de inyección y la prevención del movimiento de impurezas en el sistema (*Chin y Wang*, 2004).

Aunque la bibliografía existente sobre el tema ofrece una amplia información sobre diseños de plantas piloto de cromatografía en lecho móvil simulado (*Chin y*

Wang, 2004), las referencias concretas a las de SF-SMB (*Depta* y col., 1999) y GC-SMB (*Juza* y col., 1998) son mucho menos frecuentes. El equipo de SMB es distribuido por diferentes casas comerciales, pero la oferta es muy inferior en el caso de GC-SMB y SF-SMB.

También son abundantes las patentes que describen separaciones mediante cromatografía en lecho móvil simulado (*Broughton* y *Gerhold*, 1961; *Masatake* y *Tamura*, 1996). No obstante, en la mayoría de los casos los detalles de diseño y construcción son prácticamente inexistentes.

Capítulo 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con la finalidad de evaluar la adecuación de la heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina como selector quiral para la resolución de compuestos volátiles quirales, así como la complementariedad de diversas técnicas de análisis en relación con la selección de fuentes naturales alternativas de compuestos enantiopuros, se detalla en este apartado la metódica a seguir para lograr, a escala analítica, la resolución enantiomérica de compuestos quirales presentes en muestras complejas. En función de los datos obtenidos sobre la ausencia o presencia de un determinado enantiómero en una muestra real (o sobre los excesos enantioméricos característicos del indicador quiral considerado en cada caso), se pretende, en último término, establecer qué muestras concretas pueden ser de interés para la separación y obtención, a escala preparativa, de enantiómeros puros.

2.1. Preparación de columnas rellenas para GC con heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina

Las columnas se prepararon partiendo de un procedimiento, descrito inicialmente por Juza y col. en 1998, que fue necesario modificar en función de las limitaciones impuestas por el equipo instrumental en el que se instalaron (cromatógrafo de gases Varian, modelo 3800). En los siguientes apartados (2.1.1. a 2.1.6.) se detalla la metódica establecida para la preparación de las citadas columnas.

2.1.1. Tubo

Se utilizó tubo de acero inoxidable, desactivado, de diferentes longitudes y diámetros internos (d.i.). Las dimensiones de las columnas que se emplearon durante la experimentación oscilaron entre valores de 1 y 3 m de longitud y 1 y 2,1 mm de d.i. Con objeto de facilitar la posterior introducción del relleno en el tubo, se secó a 100°C durante una hora en un cromatógrafo de gases, haciendo circular a través del mismo un flujo de helio. Posteriormente, se conectó uno de los extremos a un tubo capilar de sílice fundida de 9 cm de longitud y 0,25 mm de d.i. para que actuara como restrictor. De esta manera, el gas circulaba a través del tubo sin provocar el sangrado de la columna. Para facilitar lo máximo posible la introducción del relleno, se prestó especial atención a evitar el estrangulamiento del extremo de la columna por el que se introduce el relleno.

2.1.2. Soporte sólido

Como soporte de la fase estacionaria se empleó Chromosorb P AW DMCS (0,149 - 0,177 mm) que consiste en una tierra de diatomeas lavada con ácido. Este soporte es inerte y no produce ni adsorción ni actividad catalítica, de modo que los picos finalmente obtenidos presentan la simetría comúnmente deseada en cromatografía.

2.1.3. Fase estacionaria

Se empleó la fase estacionaria formada por SE-54 (1% vinil-5% fenil-94% metilpolisiloxano) y heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina (β -CD-per-Me, número CAS: 55216-11-0) para lograr la diferenciación quiral deseada en los análisis realizados con las columna rellenas preparadas.

La fase estacionaria SE-54 es tradicionalmente empleada en cromatografía de gases y en cromatografía de fluidos supercríticos.

La β -CD-per-Me es también frecuentemente empleada en cromatografía (König, 1992). Dicho selector quiral está formado por oligosacáridos cíclicos que ofrecen diferente enantioselectividad en función de su estructura. Los macrociclos están

formados por siete unidades de α -D-glucopiranosas, sustituidas en las posiciones 2, 3 y 6 por un grupo metilo, ofreciendo un amplio intervalo de polaridades y selectividades para determinar compuestos quirales de diferentes familias de compuestos. La unión de estos oligosacáridos cíclicos a cadenas de polisiloxanos (SE-54) proporciona fases estacionarias de elevada estabilidad química y térmica, así como de baja viscosidad por lo que han sido de gran utilidad para la separación de enantiómeros en muestras complejas.

2.1.4. Impregnación del soporte con la fase estacionaria

Se pesaron las cantidades de fase estacionaria quiral, SE-54 (0%, 10%, 20%) y quiral, β -CD-per-Me (5%, 10%, 25%, 50%) necesarias para obtener los correspondientes porcentajes de impregnación en el soporte utilizado. Ambas (SE-54 y β -CD-per-Me) se disolvieron en 125 ml de cloroformo, previamente secado con tamiz molecular. La disolución se mantuvo durante 180 minutos en un matraz redondo de volumen 250 ml con agitación y a reflujo, a la temperatura de 60°C. Transcurrido este tiempo la fase estacionaria estaba completamente disuelta en cloroformo, se añadió peróxido de dicumilo (DCUP) en una proporción de 0,4 mg/100 mg. Posteriormente, se introdujo la cantidad de Chromosorb P AW DMCS necesaria en cada caso. La mezcla se agitó manualmente hasta que se convirtió en una masa homogénea y, a continuación, el disolvente se eliminó empleando un rotavapor, manteniendo el baño del mismo a 40°C y aumentando paulatinamente el vacío durante 10 horas para eliminar muy lentamente el disolvente; de este modo se evitó formación de grumos del relleno. Una vez eliminado completamente el disolvente, el relleno se pasó por un tamiz de 0,250 mm, para así eliminar tanto los finos como los gruesos y evitar variaciones de presión. El relleno homogéneo, en cuanto al tamaño de partícula se refiere, se mantuvo en una atmósfera de etanol para evitar la energía estática de las partículas y así facilitar su posterior introducción en la columna, según se describe a continuación.

2.1.5. Introducción del relleno en la columna

Se introdujo el relleno en un recipiente cilíndrico de acero inoxidable de 10 cm de longitud y 1,5 cm de diámetro interno con un extremo terminado en forma de cono y soldado a un adaptador de 1/16" a la que se fijó, con una conexión de acero inoxidable, el extremo abierto de la columna. El otro extremo del recipiente cilíndrico se conectó a una línea de nitrógeno puro a una presión inicial de 20 bar que, con objeto de lograr el grado adecuado de compactación del relleno, se aumentó, hasta 200 bar, de forma gradual a lo largo del procedimiento de preparación de la columna. Se colocó al inicio del tubo cilíndrico una hebra de lana de vidrio bañada en etanol para evitar la carga estática de las partículas del soporte. Inicialmente, el tubo se estiró para intentar que el relleno cayera por gravedad y, a continuación, se introdujo un flujo de nitrógeno. Al mismo tiempo, se metió en un baño de ultrasonidos hasta llenar completamente el volumen interno. Se realizaron tres pesadas de la columna hasta alcanzar un valor constante.

Asimismo, se utilizó otro sistema de introducción de relleno en la columna empleando una bomba de vacío y aumentando éste progresivamente hasta llenar completamente el volumen interno de la columna, teniendo ésta lo más estirada posible para facilitar la entrada por gravedad. Al igual que en el procedimiento anterior, se comprobó mediante pesada constante, que la columna se había rellenado adecuadamente.

2.1.6. Inmovilización del relleno en la columna

El peróxido de dicumilo se empleó como agente de entrecruzamiento generando radicales libres. La reacción se llevó a cabo al mismo tiempo que se realizó el acondicionamiento de la columna. De este modo, se colocó esta última en el cromatógrafo de gases, sin conectar al detector y se aumentó la temperatura del horno desde 70°C hasta 150°C con un gradiente de 2°C/min; la temperatura máxima de trabajo se mantuvo durante 120 minutos pasando un flujo de helio de 10,5 ml/min.

2.2. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina en columnas rellenas para GC en función de su concentración en la fase estacionaria

Las columnas rellenas preparadas según el procedimiento descrito en el apartado anterior se evaluaron en términos de parámetros cromatográficos fundamentales como, por ejemplo, eficacia y selectividad realizando las medidas necesarias en cromatografía de gases. A continuación, se describe la metodología experimental aplicada para dicho estudio.

2.2.1. Descripción del equipo

Se empleó para todas las experiencias un cromatógrafo de gases Varian 3800, equipado con un inyector PTV, que permitió la introducción de muestra con y sin división de flujo (*split/splitless*), y un detector de ionización de llama (FID). Debido a que tanto inyector como detector estaban configurados para su uso con columnas capilares, fue preciso adaptar las columnas preparadas al cromatógrafo de gases mediante dos segmentos de tubo capilar de sílice fundida de 4 cm de longitud y 0,25 mm de d.i.. Para ello, se empleó una conexión de acero inoxidable de 1/16" a un 1/32". En la Figura 9 se ilustra el montaje del dispositivo empleado para instalar las columnas rellenas en el cromatógrafo de gases.

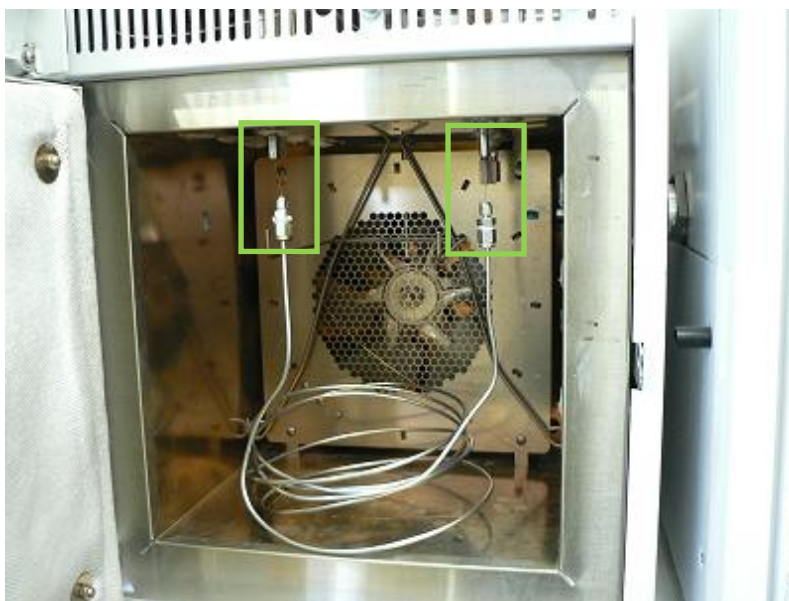


Figura 9: Detalle de la instalación de la columna rellena de 3 m de longitud y 2,1 mm de diámetro interno en el horno cromatográfico mediante un capilar de sílice fundida.

2.2.2. Muestras

En la evaluación del comportamiento de las columnas rellenas se emplearon disoluciones modelo de concentración 100, 300, 500, 1000, 3000 y 5000 mg/l de los racematos limoneno y carvona en etanol.

2.2.3. Caracterización de columnas rellenas

Las columnas rellenas preparadas, se evaluaron en función de parámetros cromatográficos con la intención de seleccionar la fase estacionaria idónea para la determinación de los compuestos quirales de interés. Ya que es bien sabido 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, se calcularon varios parámetros cromatográficos para cada compuesto quiral. Concretamente, los parámetros calculados fueron: el número de platos teóricos (N), la altura de plato teórico (H), el factor de retención (k), el número de platos efectivos (N_{eff}), el factor de separación (α) y la resolución (R_s).

El número de platos teóricos (N) se calcula mediante el cociente entre el tiempo de retención (t_r) de un determinado compuesto y la anchura de pico (w) elevado al cuadrado y multiplicado por el factor 16, si la anchura del pico se mide en la base, o 5,54 si esa medida se realiza a mitad de la altura ($w_{1/2}$), tal y como se muestra en la Ecuación 1. El número de platos teóricos de una columna no es útil a efectos de comparar columnas de diferente longitud, ya que depende directamente de esta magnitud. Sin embargo, el parámetro que permite comparar columnas de diferente longitud es la altura equivalente a un plato teórico (H); dicho parámetro se calcula con el cociente entre la longitud de la columna (L) y el número de platos teóricos (N), como se indica en la Ecuación 2.

$$N = 16 \left[\frac{t_r}{w} \right]^2 = 5,54 \left[\frac{t_r}{w_{1/2}} \right]^2 \quad \text{Ec. 1}$$

$$H = \frac{L}{N} \quad \text{Ec. 2}$$

Además, para una correcta caracterización de la columna, es necesario determinar el valor del factor de retención (k) al que se realiza la medida de la altura equivalente a un plato teórico (H), ya que tanto N como H son valores que dependen de la retención. El factor de retención se calcula, según la Ecuación 3, mediante el cociente entre el tiempo de retención corregido ($t_r - t_0$) de un determinado compuesto y el tiempo muerto (t_0) (o tiempo básico, t_M).

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad \text{Ec. 3}$$

Para evitar el efecto de la retención cromatográfica en la medida de la eficacia de una determinada columna, se determina el número de platos efectivos (N_{eff}). Dicho parámetro cromatográfico se calcula mediante el cociente entre el tiempo de retención corregido ($t_r - t_0$) de un determinado compuesto y la anchura de pico (w) elevado al cuadrado y multiplicado por el factor 16 o 5,54 dependiendo de si la anchura se mide en la base del pico registrado (w) o a mitad de su altura ($w_{1/2}$), respectivamente, tal y como se muestra en la Ecuación 4.

$$N_{\text{eff}} = 16 \left[\frac{t_r - t_0}{w} \right]^2 = 5,54 \left[\frac{t_r - t_0}{w_{1/2}} \right]^2 \quad \text{Ec. 4}$$

Por otra parte, las columnas fabricadas deben separar los enantiómeros de los compuestos quirales que se pretenden analizar. Por tanto, otro factor a tener en cuenta es la selectividad del sistema cromatográfico o, en otras palabras, su capacidad para separar una determinada pareja de compuestos, en este caso enantiómeros. La selectividad, que se representa con el factor de separación (α), se calcula mediante el cociente entre los tiempos de retención corregidos de dos determinados compuestos, como se muestra en la Ecuación 5.

$$\alpha = \frac{t_2 - t_0}{t_1 - t_0} \quad \text{Ec. 5}$$

En cromatografía se considera que si $\alpha > 1,14$ la separación es factible y si $\alpha < 1,01$ se estima que la separación es difícil. En este sentido, otro parámetro cromatográfico importante es la resolución (R_s) que se define como la separación entre dos picos consecutivos con relación a la media de sus anchuras en la base. Dicho factor, que da una idea del grado de solapamiento que puede existir entre picos, se calcula según la Ecuación 6. La R_s es un parámetro muy útil debido a que quedan relacionados tanto la eficacia (N), como el factor de retención (k) y el factor de separación (α) (*Dabrio y col., 2000*).

$$R_s = \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k}{k + 1} \frac{\sqrt{N}}{4} \quad \text{Ec. 6}$$

2.2.4. Elección del porcentaje de heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina

Se pesaron las cantidades de heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina necesarias para obtener los porcentajes de selector quiral de 10%, 25% y 50% respecto a la cantidad de soporte sólido. Las columnas rellenas preparadas variaron entre 1m de longitud y 2,1 mm de d.i.; 1 m de longitud y 1,0 mm de d.i.; 3 m de longitud y 2,1 mm de d.i. y 3 m de longitud y 1 mm de d.i. con soporte Chromosorb P AW DMCS (0,149 - 0,177 mm) impregnado con SE-54 (0%, 10%, 20%) y, en todos los casos, 0,4 mg/ 100 mg de peróxido de dicumilo. Se realizaron diversos análisis mediante cromatografía de gases. Todas las experiencias se realizaron en isoterma a la temperatura de: 40°C, 80°C, 100°C, 125°C y 150°C, con diferentes flujos de helio a la salida de la columna: 10,5 ml/min, 14,5 ml/min, 24,5 ml/min y 28,5 ml/min. La temperatura del inyector y del detector fue, en todos los casos, 250°C y 300°C, respectivamente.

2.3. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina en columnas capilares para GC en función de la temperatura

Para la obtención de una buena resolución no solo es limitante el porcentaje de selector quiral empleado, sino que es de sobra conocida la importancia de la temperatura en el reconocimiento quiral. Dicho efecto es especialmente relevante en cromatografía de gases. De la temperatura depende el grado de separación de los analitos, en nuestro caso enantiómeros; por lo tanto debe ajustarse con precisión y, para ello, se planteó el estudio de la variación de la enantioselectividad del selector quiral β -CD-per-Me en columnas capilares con la temperatura.

2.3.1. Descripción del equipo

Se empleó un equipo de Konik, modelo HRGC 4000 con detector FID. Se realizaron los análisis en una columna de 30 m de longitud x 0,25 mm de diámetro interno recubierta con un espesor de película de 0,25 μ m de heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina (Chirasil- β -Dex, Varian). El programa de temperaturas aplicado en el horno cromatográfico fue: isoterma a 80°C, 100°C, 125°C y 150°C. La temperatura del inyector y detector fue 250°C y 300°C, respectivamente.

2.3.2. Muestras

El estudio se realizó con disoluciones modelo de la mezcla racémica de los compuestos de α -pineno, carvona, 1-feniletanol, limoneno y linalol. Los compuestos también se analizaron mediante inyección del espacio de cabeza de los racematos.

2.3.2.1. Inyección convencional

Las muestras se inyectaron mediante la dilución de los compuestos mencionados en etanol a 10 mg/l en un inyector PTV, modo *splitless*.

2.3.2.2. Inyección del espacio de cabeza (HS)

Cada mezcla racémica se introdujo en un vial de 5 ml. Dicho vial se calentó durante 20 minutos a 80°C en un baño termostatzado. Posteriormente, y con una jeringa para inyectar en el cromatógrafo de gases, se tomó 5 μ l del espacio de cabeza del vial para introducirlo en el inyector PTV en modo *splitless*.

2.4. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina en columnas analíticas y semi-preparativas para HPLC en función de la composición de la fase móvil y del pH

En este apartado se plantea el estudio del efecto de la fase móvil en el selector quiral heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina, además de la influencia del pH en el proceso de discriminación quiral.

2.4.1. Descripción del equipo

Se empleó un cromatógrafo de líquidos de alta presión (HPLC) de Jasco que consta de un detector Diodo Array (MD-2015 Plus), bomba de alta presión (PU-2089 Plus), un horno cromatográfico (CO-2067 Plus) e inyector (Rheodyne).

2.4.2. Muestras

El estudio se realizó para las disoluciones modelo de los racematos α -pineno, carvona, 1-feniletanol, limoneno y linalol a 1000 mg/l en etanol, inyectando un volumen de 20 μ l. Los análisis se registraron a 210 nm. Aunque, evidentemente, la respuesta del detector para cada uno de los compuestos a 210 nm fue diferente; se consideró conveniente llevar a cabo todos los análisis a una misma concentración para evaluar comparativamente la respuesta proporcionada por el detector a una determinada longitud de onda.

2.4.3. Fase móvil

La fase móvil escogida se seleccionó teniendo en cuenta las especificaciones de la empresa distribuidora de las columnas de cromatografía de líquidos empleadas. A este respecto, se considera que tanto el metanol como el acetonitrilo y el agua de pureza de HPLC son adecuados para la columna Nucleodex- β -CD-per-Me (Macherey & Nagel). Además, es recomendable el empleo de un buffer para controlar el pH de la fase móvil; en concreto el acetato de trietilamonio (TEAA) (Fluka). El intervalo de pH de trabajo varió entre 3 y 8 y se ajustó al valor deseado con ácido acético. Los disolventes de grado HPLC utilizados fueron: metanol, agua y acetonitrilo (Lab-Scan).

La evaluación de las distintas fases móviles consideradas se realizó en términos cromatográficos calculando: el factor de retención (k), la selectividad (α) y la resolución (R_s) con las Ecuaciones 3, 5, 6, respectivamente.

2.4.4. Fase estacionaria

La importancia de la fase estacionaria para alcanzar resoluciones deseadas radica tanto en las propiedades químicas del relleno como en las propiedades físicas. En cuanto a estas última se tiene en cuenta parámetros como la longitud, el diámetro o el tamaño de partícula de la columna.

En lo que se refiere al relleno de las columnas Nucleodex (Macherey-Nagel), según la casa comercial, dicha fase estacionaria se ha desarrollado principalmente para la separación de compuestos racémicos. Además se realizaron una serie de análisis con la columna Chiracel OD.

Por otra parte, se han empleado diferentes dimensiones para realizar el estudio de la variación de la enantioselectividad en función de algunos de estos parámetros tales como el diámetro y la longitud de la columna.

2.4.4.1. Columna Nucleodex- β - ciclodextrina-per-metilada (100 mm x 4,6 mm)

Los derivados de β -ciclodextrina están enlazados covalentemente a las partículas de sílice esféricas de tamaño 5 μm y diámetro de poro promedio de 100 Å. La dimensión de la columna empleada es 100 mm x 4,6 mm, lo que se enmarca dentro de la cromatografía micropreparativa ya que se emplea para realizar purificaciones o separaciones del orden de μg o mg (Jusforgues y Shaimi, 1998).

2.4.4.2. Columna Nucleodex- β - ciclodextrina-per-metilada (200 mm x 4,0 mm)

Se recurrió a su empleo en aquellos casos en los que fue necesario disponer de una columna con mayor número de platos para alcanzar mejores eficacias y resoluciones para los compuestos analizados. La columna de dimensiones 100 mm x 4,6 mm se unió a la de 200 mm x 4,0 mm mediante un tubo de acero de 1/16".

2.4.4.3. Conexión de columnas Nucleodex- β - ciclodextrina-per-metilada

De la misma forma, para conseguir una eficacia adecuada para la separación de algunos compuestos se unieron las dos columnas anteriormente citadas. En primer lugar, se colocó la columna de dimensiones 100 mm x 4,6 mm y, a continuación, la de 200 mm x 4,0 mm para evitar que se produjera sobrepresión. En la Figura 10 se muestra la conexión de dichas columnas en el cromatógrafo de líquidos.



Figura 10: Detalle de la unión entre las columnas de 100 mm x 4,6 mm y 200 mm x 4.0 mm en el horno del equipo de HPLC.

2.4.4.4. Columna Chiracel OD (250 mm x 4,6 mm)

Los análisis se realizaron con un equipo de HPLC Agilent modelo 1200 provisto de un detector Diodo Array empleando una longitud de onda de 254 nm. Se utilizó para todos los análisis la columna Chiracel OD-H (Chiral Technologies Europe) de dimensiones 250 mm x 4,6 mm con un tamaño de partícula de 20 μm .

Es de destacar que el trabajo llevado a cabo con esta columna se realizó durante la estancia en el laboratorio de Dr. Ajay K. Ray, en el Departamento de Ingeniería Química y Bioquímica de la Facultad de Ingeniería de la *University of Western Ontario* (London, Canadá), grupo de investigación que tiene una amplia experiencia en el campo del diseño, desarrollo, simulación, y optimización de reactores químicos. En la mayor parte de sus proyectos combina tanto los fundamentos teóricos como experimentales para desarrollar modelos teóricos y computacionales y así poder optimizar el diseño y el modo de operación de sistemas complejos.

2.5. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina para SFC en función de la densidad de la fase móvil

Se incluyen en este apartado los procedimientos experimentales realizados mediante cromatografía de fluidos. Tanto para el diseño como para la construcción de la planta de SMB se ha colaborado con el Grupo de Ingeniería y Control de Procesos del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), así como con la Empresa PID Eng&Tech (Colmenar Viejo, Madrid) que fue inicialmente una *spin-off* del CSIC.

2.5.1. Descripción del equipo

El equipo consta de: módulo de alimentación, módulo de inyección, módulo de separación y módulo de recogida de muestra.

2.5.1.1. Módulo de alimentación

El dióxido de carbono se alimenta en condiciones supercríticas mediante una bomba dosificadora de líquidos. El CO₂ se encuentra en una bala a su presión de vapor, aproximadamente 45 bar (a 10°C) y 70 bar (a 30°C). Un tubo, que desciende hasta la base de ese cilindro, permite que el CO₂ fluya al exterior cuando se abre una válvula de cierre situada a la salida del mismo. En todas las experiencias se empleó CO₂ con pureza mayor del 99% (Carburos Metálicos, Madrid, España). El módulo de alimentación consta de los siguientes elementos:

1. Bomba de alimentación de CO₂ (Dosapro - Milton Roy)

Se trata de una bomba de desplazamiento positivo alternativo de pistón que permite alimentar al sistema con el CO₂ en condiciones supercríticas. Su presión y caudal máximo de diseño son 390 bar y 3 ml/min, respectivamente. Con el fin de asegurar que el dióxido de carbono se encuentra en estado líquido y evitar la cavitación de la bomba, tanto la conducción por la que circula el dióxido de carbono antes de su paso por la bomba como el cabezal de la misma se refrigeran a -20°C, aproximadamente. Para producir este enfriamiento circula, en dirección opuesta a la entrada de CO₂, un líquido

refrigerante, por lo que se logra el intercambio de calor entre este último y el CO₂. La presión en esta línea se mide mediante un manómetro cuyo intervalo de medida es de 0 a 600 bar.

2. Válvula antirretorno (Swagelok)

Se encuentra situada después de la bomba e impide que el fluido pueda circular en sentido inverso a través de la línea. La presión máxima de diseño de esta válvula es de 413 bar a una temperatura de 20°C. La línea de CO₂ se conduce hacia un precalentador, de manera que el CO₂ alcance y mantenga las propiedades de fluido supercrítico.

3. Precalentador

Con el fin de precalentar la corriente de CO₂ antes de ser dirigida a la columna de separación, en el interior de la caja caliente se ha situado un evaporador, que consiste en una conducción en espiral, de diámetro externo 1/8", enrollada sobre una resistencia eléctrica de 165 W de potencia. La temperatura máxima de la corriente a la salida del evaporador es de 80°C.

2.5.1.2. Módulo de inyección

Para permitir la alimentación de la muestra, el sistema consta de los siguientes elementos:

1. Inyector (Rheodyne)

La válvula de inyección empleada (modelo 7725) tiene seis puertos y un *loop* de 20 µl. El máximo de temperatura permitido es 80°C y la presión máxima que soporta es 483 bar. Los materiales con que está fabricada incluyen: acero, aluminio, cerámica y un polímero inerte.

2. Bomba de dosificación de líquidos para alta presión (Gilson)

Se usa una bomba de desplazamiento positivo alternativo que permite alimentar la muestra al sistema. Su presión y caudal máximo de diseño son 600 bar y 5 ml/min, respectivamente.

3. Válvula antirretorno (Swagelok)

La válvula antirretorno situada en el módulo de inyección tiene las mismas especificaciones que la mencionada anteriormente como integrante del módulo de alimentación.

4. Pre calentador

De la misma forma que se ha señalado anteriormente en relación con la corriente de CO₂, con el fin de precalentar la corriente de muestra antes de ser dirigida a las columnas de separación, en el interior de la caja caliente se ha situado otro evaporador, que consiste en una conducción en espiral, de diámetro externo 1/8", arrollada sobre una resistencia eléctrica de 165 W de potencia. La temperatura máxima de la corriente a la salida del evaporador es de 80°C.

2.5.1.3. Módulo de separación

El módulo de separación consta de los siguientes elementos:

1. Columna cromatográfica

Es la zona del sistema en la cual tiene lugar la separación. Se trata de una columna Nucleodex-β-CD-per-Me de 250 mm x 10 mm. En el cuerpo de la misma se encuentra enrollada una resistencia para que se alcance la temperatura deseada. A la entrada de la columna hay un transductor para medir la presión y comprobar la pérdida de carga en el equipo por comparación con los valores que proporciona el lazo de control de presión a la salida de la columna.

2. Caja caliente

Es un horno que permite termostatar el sistema. Para mantener la temperatura constante en todos los puntos del horno hay un ventilador centrífugo que origina una convección forzada.

3. Válvula de regulación de caudal servomotorizada (Hoke)

Esta válvula controla la presión a la entrada del recolector (depósito en el que se recogen los productos separados en el proceso). La válvula de aguja regula el microcaudal a alta precisión y actúa mediante un servomotor que controla su apertura. La presión de trabajo de la línea de salida después de la válvula es la atmosférica. La presión y temperatura máximas de diseño de esta válvula es de 345 bar y 232°C, respectivamente. Además, la válvula está calefactada a 80°C, con el fin de evitar la formación de nieve carbónica debido a la expansión adiabática producida al pasar la corriente a través de ella.

4. Válvula de aguja manual (Hoke)

Esta válvula controla el flujo a la salida de la columna. Actúa de manera manual para controlar el flujo de CO₂ necesario en cada experiencia, dependiendo del caudal de la bomba de CO₂, la apertura de la válvula y la presión del sistema.

5. Medidor de flujo (Bronkhorst)

A la salida del recolector se sitúa un medidor de flujo que permite controlar el flujo de salida. Los medidores de flujos másico están calibrados para medir un flujo de CO₂ de 0 - 100 g/min.

2.5.1.4. Módulo de recogida

A la salida de la columna se recogen las fracciones eluidas en viales de 5 ml.

2.5.2. Muestras

El estudio se realizó para disoluciones modelo de la mezcla racémica de los compuestos de α -pineno y limoneno disueltos a 10000 mg/l y 8000 mg/l en metanol, respectivamente.

2.5.3. Fase móvil

Se emplea CO₂ en condiciones supercríticas (temperatura de 40°C y presión entre 100 y 150 bar), y metanol como modificador para aumentar la polaridad de la fase móvil. El porcentaje de modificador empleado en todos los análisis fue del 5%.

Puesto que en el equipo de fluidos supercríticos no se disponía de detector *on-line*, se recogieron muestras, cada dos minutos, a la salida de la columna y posteriormente se analizaron mediante cromatografía de gases y cromatografía de líquidos (con los equipos descritos en los apartados 2.3.1 y 2.4.1.), calculando, según se detalla en la Ecuación 7, el exceso enantiomérico de los compuestos quirales presentes en cada una de las muestras recogidas.

2.5.4. Fase estacionaria: columna Nucleodex- β -ciclodextrina-per-metilada (250 mm x 10 mm)

Se empleó la columna Nucleodex- β -ciclodextrina-per-metilada de 250 mm x 10 mm con la que también se trabajó en cromatografía de líquidos, aspecto que se desarrolló en el apartado 2.4.

2.6. Determinación de excesos enantioméricos de compuestos quirales en muestras complejas mediante RPLC-GC-MS y MDGC-MS

Se incluyen en este apartado los procedimientos experimentales establecidos para el análisis de muestras complejas reales mediante RPLC-GC-MS y MDGC-MS.

A partir de las concentraciones relativas de los dos enantiómeros de un compuesto quiral (E_1 y E_2), se establece el exceso de un enantiómero sobre otro

mediante lo que se denomina exceso enantiomérico que se representa por “ee”, se expresa habitualmente como % y se calcula según la Ecuación 7 en la que E₁ representa el enantiómero mayoritario y E₂ el minoritario.

$$ee = \frac{E_1 - E_2}{E_1 + E_2} 100 = \% E_1 - \% E_2 \quad \text{Ec. 7}$$

2.6.1. Análisis de muestras complejas mediante RPLC-GC-MS

Con el empleo del acoplamiento RPLC-GC-MS se pretende poner a punto un método de análisis adecuado para lograr altas resoluciones enantioméricas de compuestos quirales minimizando, o incluso obviando, la etapa de preparación de muestra.

2.6.1.1. Muestras

Se utilizaron varias muestras de aceites esenciales comerciales (*Mentha spicata* y *Carum carvi*), y los obtenidos a partir de *Mentha crispata* y *Anethum graveolens*, *Mentha piperita*, de los que además se disponía de la planta (hojas) y de las semillas con las que previamente se habían obtenido los correspondientes aceites esenciales proporcionados por el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA). Se prepararon disoluciones (de 20 µl del aceite esencial en 2 ml, 6 ml, 10 ml y 100 ml de *n*-hexano) que, con anterioridad a su introducción en LC, fueron percoladas a través de un filtro de PVDF (*polyvinylidene difluoride*), con un tamaño de poro de 0,45 µm, sin ningún otro tipo de tratamiento previo. Para confirmar la identificación de algunos de los compuestos detectados en las muestras analizadas se utilizaron como patrones: α-pineno, carvona, 1-feniletanol, linalol y limoneno (50 mg/l en etanol).

2.6.1.2. Preseparación de muestra en LC

El cromatógrafo de líquidos utilizado (Konik, modelo HPLC 560) está provisto de un inyector con capacidad de 20 μ l, una bomba cuaternaria y un detector ultravioleta-visible. El software empleado para procesar los datos es el Konikrom Plus.

En la columna del cromatógrafo de líquidos se lleva a cabo la preseparación para seleccionar la fracción que interesa transferir al cromatógrafo de gases. Se emplea una columna de 100 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, rellena con una fase C₄ de 10 μ m de tamaño de partícula (Hypersil, Phenomenex) que se mantiene a 25°C en todos los análisis. La inyección se realiza con una microjeringa de 50 μ l. La composición de la fase móvil empleada es metanol/agua (85/15) con un flujo de 1 ml/min hasta que comienza la elución de los compuestos que interesa transferir. En ese momento se reduce el flujo a 0,1 ml/min y se mantiene este valor hasta que termina la transferencia. Después de transferir el volumen total que contiene la fracción de interés (en este caso 0,84 ml), y con la finalidad de limpiar la columna, se aumenta el flujo hasta 1 ml/min y se eluye 100% metanol durante, al menos, 15 min.

2.6.1.3. Transferencia de LC a GC empleando la interfaz TOTAD

Para transferir la fracción de interés, desde el cromatógrafo de líquidos al de gases, se emplea la interfaz TOTAD situada en la parte superior del cromatógrafo de gases. En su interior se coloca un *glass-liner* de 95 mm de longitud, 1 mm de diámetro interno y 3 mm de diámetro externo. Previamente al análisis, el citado *glass-liner* puesto que es de vidrio debe haber sido desactivado, relleno con un material adsorbente como Tenax TA 80/100 mesh (óxido de poli-(2,6-difenil-1,4-fenileno)) y acondicionado en el inyector del cromatógrafo pasando un flujo de helio y aumentando gradualmente (a razón de 5°C/min) la temperatura desde 40°C hasta alcanzar los 300°C. El adsorbente colocado en el interior del *glass-liner* ocupa una longitud de 2,5 cm.

Durante la transferencia, la temperatura de la interfaz se establece en 50°C, 75°C o 120°C y se mantiene un flujo de helio de 200 ml/min para eliminar el disolvente del interior de *glass-liner*. Una vez completada la transferencia, se gira la válvula de seis vías y se envía al desecho, empujado por un flujo de helio, el eluyente del cromatógrafo

de líquidos. De esta modo, se elimina asimismo el eluyente que pudiera permanecer en la línea de transferencia (que es un tubo de sílice fundida de 1 m de longitud y 0,32 mm de diámetro interno) utilizada para conectar la citada válvula de seis vías con la interfaz.

El modo de operación de la interfaz TOTAD es totalmente automático, por lo que el software que incluye permite programar las etapas de estabilización, transferencia, eliminación de restos de disolventes y limpieza, necesarias para realizar la transferencia.

2.6.1.4 Determinación de excesos enantioméricos mediante GC-MS

El equipo utilizado es de Konik, modelo HRGC 4000 e incluye con la interfaz TOTAD (Konik K2) y un detector de masas de cuadrupolo (Konik MS Q12).

Se realiza la separación cromatográfica en una columna de 25 m de longitud x 0,25 mm de diámetro interno recubierta con un espesor de película de 0,25 μm de heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina (Chirasil- β -Dex, Varian). La desorción térmica de los analitos retenidos en el material empacado en el *glass-liner* se realizó aumentando la temperatura del inyector a 10°C/min hasta 225°C y manteniéndola durante 10 min. El programa de temperatura empleado comienza a 40°C (durante 15 min) para posteriormente ir aumentándola, con un gradiente de 6°C/min, hasta alcanzar los 180°C que se mantienen durante 15 min. La temperatura programada en la línea de transferencia fue de 150°C. Los espectros de masas se registraron en modo FULL SCAN en el intervalo de *m/z* de 40 a 650 y además se registraron en modo SIM a determinadas fragmentaciones de interés. Los compuestos identificados por MS se compararon con la biblioteca de compuestos del *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Para confirmar la identificación de algunos compuestos se inyectaron, en las mismas condiciones experimentales utilizadas para las muestras reales, una disolución de los patrones indicados en el apartado 2.6.1.3.

2.6.2. Análisis de muestras complejas mediante MDGC-MS

2.6.2.1. Muestras

Con objeto de evaluar la complementariedad y adecuación de las dos técnicas multidimensionales utilizadas a escala analítica, se decidió emplear ambas para analizar las mismas muestras (concretamente las descritas en el apartado 2.6.1.1.). Asimismo, se decidió considerar la circunstancia de que se disponía tanto del aceite esencial como de la planta o semilla con la que se había extraído dicho aceite esencial, así que se analizó tanto uno como otra para realizar el estudio del exceso enantiomérico de algunos compuestos mayoritarios como carvona y limoneno.

2.6.2.2. Análisis de compuestos volátiles mediante inyección directa en un PTV

Para la determinación de volátiles mediante inyección directa en un PTV, se introduce en el *glass-liner* la muestra (0,8 - 0,9 mg) y en los extremos una pequeña cantidad de lana de vidrio para mantenerla en el *glass-liner*. Antes del análisis se optimizó la cantidad de muestra analizada para evitar saturaciones en la columna. Para facilitar la desorción de los compuestos volátiles de la muestra, la temperatura del PTV aumentó de 40°C (a 200°C/min) hasta 250°C, temperatura a la que se mantuvo 6 minutos.

2.6.2.3. Determinación de excesos enantioméricos mediante MDGC-MS

El equipo de MDGC con el que se ha trabajado consta de dos cromatógrafos de gases Varian modelo CP-3800. Uno de ellos, el de la precolumna, está provisto de un detector de ionización de llama (FID) y el otro, en el que se instala la columna principal, tiene un detector de masas de trampa iónica de Varian, modelo Saturn 2000. El sistema de adquisición de datos es el *Star Toolbar System*. El sistema consta de una válvula Deans y de una válvula solenoide que permite que se realice la transferencia de un cromatógrafo a otro. Los compuestos identificados por masas se contrastaron con la biblioteca NIST y, adicionalmente, se confirmó su identificación por comparación con

los resultados obtenidos inyectando las disoluciones de patrones mencionadas en el apartado 2.6.1.1.

Cuando la válvula solenoide del equipo de MDGC está desactivada, el gas portador circula a través del sistema Deans desde la precolumna (o primera columna) al tubo capilar hueco que se utiliza para compensar presiones. A partir de la separación obtenida en la precolumna, y monitorizada por el detector correspondiente, se determina la fracción a transferir. Cuando se activa la válvula solenoide a los tiempos seleccionados, el gas portador se desplaza, desde la precolumna a la columna principal (o segunda columna), produciéndose la transferencia de la fracción previamente seleccionada, a través de la línea de transferencia calefactada a 280°C.

La introducción de muestra en el sistema cromatográfico se realiza mediante un inyector PTV que se mantiene a 250°C, y en modo *splitless*, durante la etapa de desorción térmica de los compuestos previamente introducidos en el inyector o inyectados en disolución (de manera convencional). El detector FID empleado para detectar la separación lograda en la precolumna se calienta a 250°C. Las temperaturas de la línea de transferencia, el *manifold* y la trampa del detector de masas son 180°C, 120°C y 220°C, respectivamente. Los espectros de masas se registraron en modo FULL SCAN para el intervalo de m/z de 40 a 650 y además se registraron en modo SIM a determinadas fragmentaciones de interés.

La separación en la primera dimensión se lleva a cabo con una columna de sílice fundida de 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno impregnada con una película de 5% fenil- 95% polidimetilsiloxano de 0,25 µm de espesor (ZB-Wax, Micron Analítica). El programa de temperaturas del horno comienza a 60°C, se mantiene 1 min, y aumenta a 2°C/min hasta 200°C durante 5 min.

En la segunda dimensión se colocó una columna de sílice fundida de 30 m de longitud x 0,25 mm de diámetro interno con un espesor de película de 0,25 µm de heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)-β-ciclodextrina (Chirasil-β-Dex, Varian). El programa de temperaturas aplicado comienza a 50°C, se mantiene durante 15 min y aumenta con sucesivos gradientes de 1°C/min hasta alcanzar 70°C, de 2°C/min hasta 140°C y de 4°C/min hasta 200°C.

En el caso de compuestos con un único centro quiral, se determinó el exceso enantiomérico, según se detalla en el apartado 2.1.1.

Todos los análisis fueron realizados, al menos, por triplicado.

2.7. Diseño y construcción de una planta de SF-SMB

2.7.1. Planta de SF-SMB

Dado que uno de los objetivos fundamentales de este trabajo ha sido el diseño y la construcción de una planta de SF-SMB para, en último término, su posterior utilización para la obtención de enantiómeros puros, se ha considerado que la descripción del proceso de construcción de dicha planta es uno de los resultados relevantes de este trabajo y, por tanto, se detalla en el apartado de *Resultados y discusión*. Asimismo, en dicho apartado se desarrollará la puesta en marcha de la planta, así como el proceso de parada y mantenimiento de la misma.

Capítulo 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tanto los resultados como su discusión están divididos según los objetivos planteados. De este modo, se diferencia entre los resultados obtenidos en el estudio del reconocimiento quiral de la heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina (β -CD-per-Me) en cromatografía con distintas fases móviles: gas, líquido y fluido supercrítico, que concierne al objetivo uno del trabajo, según se señala en la Presentación y objetivos de la Memoria, así como en el Esquema de la página 7. A continuación, se presentan los resultados que responden al objetivo dos del trabajo en el que se revisan algunas técnicas de cromatografía multidimensional (RPLC-GC-MS y MDGC-MS) para seleccionar fuentes naturales alternativas adecuadas para la obtención de compuestos enantiopuros. Por último, se desarrolla la discusión de los resultados obtenidos en la experimentación relativa al objetivo tres en el cual se lleva a cabo el diseño, construcción y puesta a punto de la planta de cromatografía en lecho móvil simulado con fluidos supercríticos (SF-SMB).

3.1. Reconocimiento quiral de heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina mediante GC, HPLC y SFC utilizando disoluciones modelo

El objeto de este apartado es el estudio de la interacción de la heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina con determinados compuestos volátiles de origen natural que forman parte de la composición de aceites esenciales que son de especial interés en sectores industriales como, por ejemplo, el alimentario, el farmacéutico y el cosmético. En concreto, se han considerado los siguientes compuestos: α -pineno, carvona, 1-

feniletanol, limoneno y linalol. Todos ellos, en general, intervienen en el aroma de muchos productos, pero además son compuestos quirales por lo que tienen la particularidad, como se ha mencionado a lo largo del texto, de que sus enantiómeros pueden tener diferente actividad, toxicología o metabolismo.

Según la bibliografía, el selector quiral seleccionado, la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina, permite resolver un amplio espectro de compuestos quirales (Macaudière y col., 1989; König y col., 1992; Schneiderman y Stalcup, 2000; Mookdasanit y Tamura, 2002). Un hecho a destacar es que el estudio se plantea desde la consideración de que el reconocimiento quiral a nivel molecular depende de la fase móvil empleada. En este sentido, los complejos diastereoméricos formados por la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina y cada uno de los racematos estudiados puede ser significativamente diferente dependiendo de si el análisis se realiza en cromatografía de gases, líquidos o fluidos supercríticos (Fogassy y col., 1994; Bargmann-Leyder y col., 1995)

Obviamente, en el reconocimiento quiral no solo influye la fase móvil implicada en cromatografía, sino que parámetros como la longitud, diámetro de la columna, flujo, pH o temperatura tiene especial incidencia, en cada una de las diferentes técnicas que se estudian a lo largo del apartado, en la eficacia y resolución cromatográficas obtenidas en cada caso concreto.

3.1.1. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina en columnas rellenas para GC en función de su concentración en la fase estacionaria

La naturaleza del disolvente empleado para la impregnación de la fase estacionaria en el soporte sólido tiene poca incidencia en algunas de las características de la columna como, por ejemplo, en su eficacia. Sin embargo, la optimización de una determinada separación exige una cuidadosa evaluación del sistema cromatográfico. Por esta razón, la selección de cada una de las variables que participan en la separación cromatográfica es fundamental para obtener resultados adecuados en cuanto a lo que a eficacia y selectividad se refiere.

La elección de la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina (oligosacárido cíclico quiral) se justifica por la versatilidad que ofrece su estructura en el reconocimiento de compuestos quirales. Contiene siete unidades de α -*D*-(+)-glucopiranosas metiladas selectivamente en las posiciones dos, tres y seis. Por esta razón, muestra enantioselectividades especiales debido a los grupos introducidos, además de una mayor estabilidad térmica (König, 1992). Posteriormente, en el apartado 3.1.2., se comenta el interés cromatográfico de las ciclodextrinas en general y, en particular, de la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina.

Por otro lado, la unión de la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina a cadenas de polisiloxanos, como SE-54, proporciona fases estacionarias quirales de baja viscosidad y elevada estabilidad térmica. Además, se emplea el soporte sólido Chromosorb P AW DMCS ya que, según los datos bibliográficos existentes, junto con un selector quiral adecuado y SE-54 permite la resolución de determinados racematos (Juza y col., 1998).

La elección de DCUP como agente de entrecruzamiento se justifica porque su empleo ha sido recomendado por distintos autores (Grob y col, 1981a, Grob y Grob 1981b) debido a la escasa formación de residuos que pueden afectar a la estabilidad química de la fase inmovilizada. El uso de DCUP es imprescindible en el caso de que la fase móvil empleada sea un fluido supercrítico. Además, el empleo de fases inmovilizadas con DCUP permite, en general, una mejora de la columna frente a la asimetría o distorsión de picos (*tailing*), a la eficiencia y a la posible pérdida de fase estacionaria por lo que, evidentemente, su uso es recomendable en columnas rellenas (Schomburg y col, 1982; Herraiz, 1983; Ibáñez y col., 1993).

Con los componentes anteriormente seleccionados (heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina, Chromosorb P AW DMCS, SE-54 y DCUP), el objetivo del estudio planteado es seleccionar el porcentaje de fase estacionaria quiral heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina favorable para trabajar en GC. En este sentido, se prestó especial atención a la necesidad de establecer un compromiso entre la concentración de selector quiral y la resolución obtenida para un determinado racemato. Se realizó la evaluación de una serie de columnas rellenas con idénticas dimensiones (1 m de longitud y 2,1 mm

de d.i.), soporte (Chromosorb P AW DMCS, 0,149-0,177 mm) y porcentaje de impregnación (20% de fase estacionaria SE-54 respecto a la cantidad de soporte sólido). Se emplearon en todos los casos 0,4 mg de DCUP cada 100 mg de soporte sólido.

Las columnas rellenas preparadas contienen un 10% (columna 1), 25% (columna 2) y 50% (columna 3) de heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina respecto del soporte sólido. Para cada una de las columnas se calculó (con las Ecuaciones de la página 63 del apartado de *Materiales y métodos*) el número de platos teóricos (N), la altura equivalente a un plato teórico (H), el factor de retención (k), el número de platos efectivos (N_{eff}) y el factor de separación (α).

Tabla 2: Parámetros cromatográficos de las columnas rellenas preparadas

	longitud (m)	d.i. (mm)	flujo He (ml/min)	temperatura (°C)	SE-54 %	β -CD-per- Me %	N	H (cm)	parámetros cromatográficos*		
								k	N_{eff}	α	
columna 1	1	2,1	24,5	150	20	10	1248	0,9	9,1	1007	1
columna 2	1	2,1	24,5	125	20	25	936	1,4	21,8	686	1
columna 3	1	2,1	24,5	125	20	50	1104	2,5	24,5	700	1

* Calculados para el análisis de 1 μ l de una disolución de 1000 mg/l del racemato del limoneno

Previamente al estudio se seleccionó el flujo necesario para el empleo de las columnas preparadas. En este sentido, el flujo óptimo teórico, dado por el mínimo de la curva de Van Deemter, debe establecerse siempre para cada una de las columnas consideradas. A efectos comparativos, se generalizó y se estableció que el flujo óptimo para columnas de 1 m de longitud y 2,1 mm de diámetro interno es 12,5 ml/min. Sin embargo, a 12,5 ml/min la retención del racemato de limoneno a temperaturas moderadamente elevadas es muy alta; por esta razón se trabajó finalmente con un flujo de 24,5 ml/min.

A la vista de los resultados de la Tabla 2 se deduce que las columnas rellenas que contienen un 10% y 25% de heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina (columnas 1 y 2, respectivamente) no tienen la eficacia adecuada para resolver el racemato de limoneno. Del mismo modo, en la columna 3 que contiene un 50% de heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina, porcentaje considerablemente alto para facilitar las

interacciones del compuesto a resolver con el selector quiral, tampoco se registraron buenas resoluciones. Además, el aumento en el porcentaje de fase estacionaria quiral, no supuso un aumento en la retención del compuesto estudiado. Los tiempos de retención registrados para el limoneno a 100°C de temperatura, son 94,1, 69,7 y 55,1 minutos para la columna 1, 2 y 3, respectivamente. Por lo tanto, la retención viene determinada principalmente por la fase estacionaria SE-54.

En la Figura 11 se muestran los cromatogramas obtenidos en el análisis del racemato de limoneno a diferentes temperaturas del horno cromatográfico (100°C, 125°C y 150°C) con la columna 3. Se observa que la selectividad no mejora a las temperaturas estudiadas. Por tanto, en estos análisis, la temperatura tan solo afecta a la retención del compuesto en la columna, de modo que únicamente se aprecia la esperada disminución de la retención de los dos enantiómeros ((*R*)- y (*S*)-limoneno) al aumentar la temperatura. Idéntico comportamiento se registra para las columnas 1 y 2 evaluadas a las mismas temperaturas.

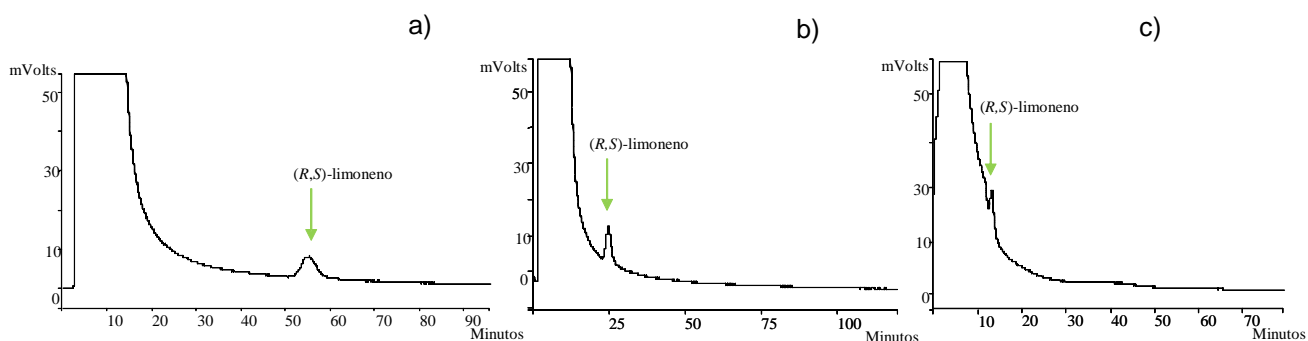


Figura 11: Cromatogramas obtenidos mediante GC con la columna 3 en isoterma: a) 100°C; b) 125°C; c) 150°C.

Debido a los resultados obtenidos hasta este punto, se optó por modificar algunas de las características fijadas inicialmente en las columnas y preparar una nueva serie de columnas rellenas (números 4, 5, 6, 7 y 8) que se describen en la Tabla 3.

Tabla 3: Parámetros cromatográficos de las columnas rellenas preparadas

	longitud	d.i.	flujo He	temperatura	SE-54	β-CD-per-Me		parámetros cromatográficos*			
	(m)	(mm)	(ml/min)	(°C)	%	%	N	H (cm)	k	N _{eff}	α
columna 4	1	2,1	10,5	100	0	5	128	1,2	33,1	82,8	1
columna 5	1	1	10,5	100	0	5	108	0,9	36,1	103	1
columna 6	1	1	12,5	100	20	10	300	0,3	34,2	284	1
columna 7	3	1	9,4	90	20	50	547	0,5	11,3	462	1
columna 8	3	2,1	24,5	100	20	10	938	0,4	5,6	687	1

* Calculados para el análisis de 1 µl de una disolución de 1000 mg/l del racemato de limoneno

A la vista de los parámetros cromatográficos obtenidos con la columna 4, eliminando la SE-54 con la intención de disminuir la retención del soluto para trabajar a flujos cercanos al óptimo, el número de platos efectivos de la columna disminuyó considerablemente. En relación con la columna 5, se había optado por disminuir su diámetro interno (manteniendo el resto de sus características idénticas a las de la columna 4), con objeto de aumentar el número de platos efectivos respecto a los obtenidos con la columna 4. Sin embargo, tampoco en estas condiciones se obtuvo un número de platos efectivos suficiente para resolver el racemato del limoneno. En lo que se refiere a las columnas 6 y 7, el porcentaje de SE-54 es del 20% y se modificó el diámetro interno y la longitud de la columna, respectivamente. Los resultados no fueron favorables en ambos casos. A modo de ejemplo, se muestran los cromatogramas obtenidos empleando la columna 7, Figura 12, en los que se observa la idéntica retención para los compuestos (*R*)- y (*S*)-limoneno y, por tanto, la falta de resolución para el análisis del racemato de limoneno.

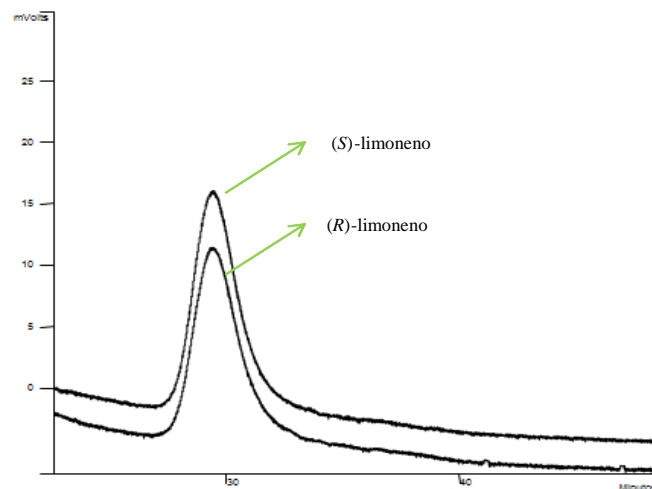


Figura 12: Cromatogramas obtenidos mediante GC con la columna 7 en isoterma a 90°C.

Es de destacar el hecho de que la columna 8 se rellenó según el modo descrito en el apartado 2.1.5. de *Materiales y métodos*, en el que se emplea una bomba de vacío en lugar de un flujo de nitrógeno para mejorar la forma de rellenar la columna. No obstante, los resultados registrados con la nueva serie de columnas rellenas preparadas tampoco son favorables, en el sentido de que el número de platos efectivos no es suficiente para resolver los racematos estudiados.

Por lo tanto, y ante la dificultad de obtener columnas rellenas de las características propuestas con un alto número de platos efectivos, se planteó continuar el estudio trabajando con columnas comerciales, tanto de cromatografía de gases (columnas capilares) como de cromatografía de líquidos (columnas analíticas), en las cuales el selector quiral involucrado es la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina. Este estudio se desarrolla en los dos siguientes apartados: 3.1.2 y 3.1.3.

3.1.2. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina con columnas capilares para GC en función de la temperatura

La columna empleada en el estudio es una columna capilar de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno recubierta con un espesor de película de 0,25 μ m de heptakis-(2,3,6-*O*-metil)- β -ciclodextrina (Chirasil- β -Dex).

Puesto que el selector quiral seleccionado a lo largo de todo el trabajo es típico de cromatografía de gases con columnas capilares, se comentan en este apartado las características generales de las β -ciclodextrinas y, en concreto, de la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina.

Las β -ciclodextrinas son oligosacáridos formados por siete unidades de α -D-(+)-glucopiranosas unidas entre sí por enlaces 1,4 glucosídicos. Se obtienen fácilmente por la acción de la amilasa de *Bacillus macerans* sobre almidón. Tienen forma de toroide cónico con los grupos OH secundarios (correspondientes a los carbonos 2 y 3 de la glucosa) en la cara más ancha, los grupos OH primarios (correspondientes al carbono 6) en la cara opuesta y los H orientados hacia el interior de la cavidad. Por tanto, tienen una cavidad hidrófoba y una parte externa hidrófila. Además, son capaces de formar complejos de inclusión con muchos compuestos de diferentes características químicas. El interés cromatográfico de las β -ciclodextrinas se basa principalmente en su capacidad para reconocer compuestos quirales (König, 1992; Martínez Castro y col., 1993; Schurig, 2001, 2002).

En el desarrollo del trabajo se evidenció que la posibilidad de metilar las posiciones 2, 3 y 6 de la β -ciclodextrina permitía aumentar considerablemente la selectividad. No obstante, desde hace tiempo, algunos derivados de β -ciclodextrinas, en concreto la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina cuya estructura se muestra en la Figura 13, se emplean para separar isómeros de hidrocarburos (Casu y col., 1979) y enantiómeros de diamidas quirales (König, 1988, 1992). Con la sustitución de las posiciones 2, 3 y 6 de la β -ciclodextrina por grupos metilo se consigue un intervalo de

polaridades que diversifica la capacidad de reconocimiento quiral respecto a las β -ciclodextrinas no sustituidas. El hecho de metilar los grupos OH del macrociclo hace que disminuyan los múltiples enlaces de hidrógeno en los que la β -ciclodextrina podría estar implicada y, por tanto, pierda cierta rigidez, aumentando por ello su potencial para reconocer ciertos compuestos quirales. En el caso concreto de este estudio, se planteó la posibilidad de que el empleo de la β -CD-per-Me permitiera mejorar la interacción con los racematos de α -pineno, 1-feniletanol, limoneno y linalol.

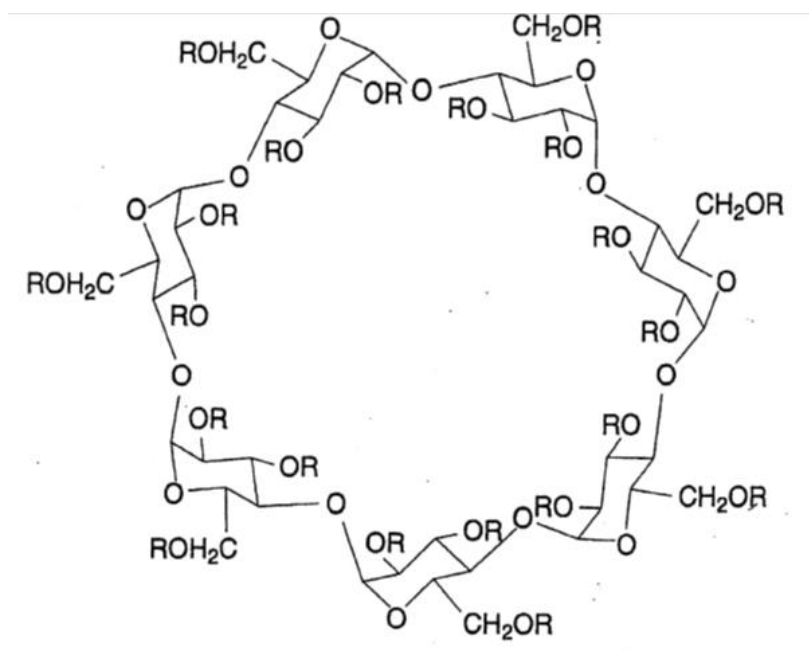


Figura 13: Estructura de la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina ($R = CH_3$).

El mecanismo de reconocimiento quiral de la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina depende, principalmente, del tamaño de la cavidad del macrociclo y de los sustituyentes de sus grupos hidróxilo y, evidentemente, del compuesto analizado. No cabe duda de que las características especiales de su cavidad constituyen el factor más importante de su capacidad para reconocer compuestos quirales. Diversos autores tras realizar una serie de determinaciones fisicoquímicas, postularon dos tipos de interacción: el primero debido al proceso de inclusión y el segundo a interacciones externas o a asociaciones múltiples o a ambas a la vez (*Berthod y col.*, 1992).

El objetivo del estudio que se desarrolla en este apartado es analizar el comportamiento de la heptakis-(2,3,6-*O*-metil)- β -ciclodextrina a diversas temperaturas: 80°C, 100°C, 125°C y 150°C. Las temperaturas se seleccionaron para que los tiempos de retención de los compuestos analizados fueran razonables. En concreto, se pretendía que la temperatura no fuera tan elevada como para que el pico cromatográfico del compuesto de interés coeluyera con el disolvente ni que fuera tan baja como para que la retención fuera elevada y, por tanto, los tiempos de análisis resultaran excesivamente largos. Aunque la temperatura también es un factor a optimizar, tanto en cromatografía de líquidos como en cromatografía de fluidos supercríticos, es en cromatografía de gases donde ocupa un lugar determinante. Precisamente por esta razón, se emplea la cromatografía de gases para estudiar el efecto de la temperatura en la enantioselectividad en la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina. Para los análisis realizados se calcula (mediante la Ecuación 5 de la página 64) el valor del factor de separación (α), parámetro que se emplea para la evaluación de la capacidad de reconocimiento de un determinado selector quiral (Martínez Castro y col., 1993).

3.1.2.1. Inyección convencional

Las disoluciones preparadas de los racematos de α -pineno, 1-feniletanol, limoneno y linalol (10 mg/l en etanol) se inyectan en el cromatógrafo de gases en isoterma. El modo de inyección en los análisis es *split/splitless*, de tal forma que, en el momento en que el equipo está preparado para realizar el ensayo, el inyector se encuentra en modo *split*. Al iniciar el análisis pasa a modo *splitless* durante 1 min. Transcurrido este tiempo, cambia a modo *split* con lo que es posible eliminar la distorsión del pico del disolvente. La temperatura inicial del horno está 10°C por debajo de la temperatura de ebullición del disolvente, para provocar el estrechamiento de banda y mejorar la resolución de los picos cromatográficos.

A la vista de la Figura 14, en la que se muestra el cromatograma obtenido en el análisis en isoterma (100°C) de la disolución del racemato de 1-feniletanol (modo de inyección: *split/ splitless* (1:10/1min)), se observa un efecto que podemos denominar de división de pico (*peak splitting*). Además, dicho efecto aparece igualmente en los

análisis realizados para los racematos de α -pineno, limoneno y linalol. Del mismo modo, se aprecia a las diferentes temperaturas programadas del horno en isoterma a: 80°C, 100°C, 125°C y 150°C. En este sentido, una de las causas descritas en la bibliografía para explicar el mencionado efecto es el denominado ensanchamiento de banda en el espacio (*Band Broadening in Space*, BBS) descrito por Grob en 1981. Se postula como un efecto habitual en la inyección *splitless* ya que el disolvente puede depositarse al inicio de la columna y, de esta forma, se favorece que el soluto se extienda a lo largo de la zona inundada (*solvent flooding*), pudiendo mojar la superficie de la fase estacionaria. La distorsión de dichos picos es consecuencia de que el disolvente en el que está diluida la muestra es repelido por la superficie de la fase estacionaria (Saravalle y col., 1983; Grob y col., 1985).

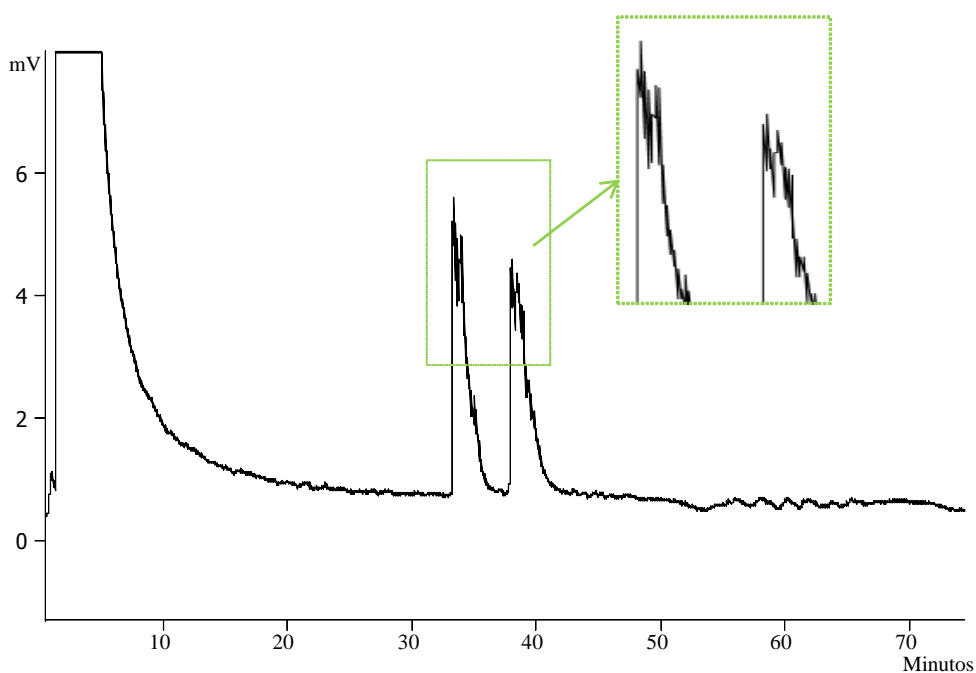


Figura 14: Cromatograma con *peak splitting* (y ampliación) obtenido mediante GC.

No obstante, hay que diferenciar en este punto el efecto anteriormente descrito (*solvent flooding*) del denominado efecto del disolvente (*solvent effect*), que se origina estableciendo las condiciones experimentales adecuadas para provocar su condensación (no inundación) a la entrada de la columna, de manera que permite enfocar las zonas o bandas en las que se depositan aquellos compuestos de la muestra que se eluyen precisamente después del disolvente. Esa condensación causa el aumento localizado y temporal de la fase estacionaria, según la denominación habitualmente empleada para hacer alusión a la consiguiente disminución del valor de β (relación de fases de la columna) y, por tanto, al incremento (para un compuesto y temperatura determinados) del valor del correspondiente factor de retención (k).

El proceso de evaporación de disolvente, que se produce en el mismo sentido de avance del gas portador, coincide con la migración de otros compuestos de volatilidad similar cuyas zonas cromatográficas son enfocadas precisamente en el punto en que finaliza dicho proceso. Ello es debido a que las velocidades relativas de migración en la zona de la columna en la que se ha producido la condensación del disolvente y en aquella zona en la que la única retención posible es la ocasionada por la fase estacionaria, provocan el retardo de las moléculas de soluto situadas en la parte frontal de la banda cromatográfica y la aceleración de las posicionadas en la parte posterior. Esa diferencia propicia finalmente el estrechamiento (o enfoque) de la correspondiente banda cromatográfica (*Grob*, 1982; *Grob* y *Schilling*, 1983a, 1983b).

Una de las soluciones habitualmente descritas con la que afrontar el problema del citado ensanchamiento de banda en el espacio es recurrir a otro tipo de inyección o de disolvente empleado para la muestra. Aunque, en principio, no es éste un caso clásico de BBS, ya que la inyección no se realiza en modo *splitless* sino *split /splitless*, se decidió llevar a cabo una serie de análisis con ciertas modificaciones. Para ello, se cambió el modo de inyección a modo *split*. Además, se varió el disolvente en el que se diluye la muestra con la intención de favorecer lo máximo posible su eliminación al inicio del proceso cromatográfico.

Como se observa en la Figura 15a y b, en las inyecciones de la muestra de 1-feniletanol en metanol (10 mg/l) con *split* 1:2 y 1:10 se aprecia asimismo la distorsión de los picos resultantes. Del mismo modo, aparece el mencionado efecto con el empleo de otros disolventes: *n*-hexano y diclorometano, aunque no se ilustran todos los cromatogramas. En la Figura 15c se muestra el cromatograma obtenido en el caso de utilizar *n*-hexano (10 mg/l) con *split/splitless* (1:10/1min) en el que continúa observándose el mismo efecto.

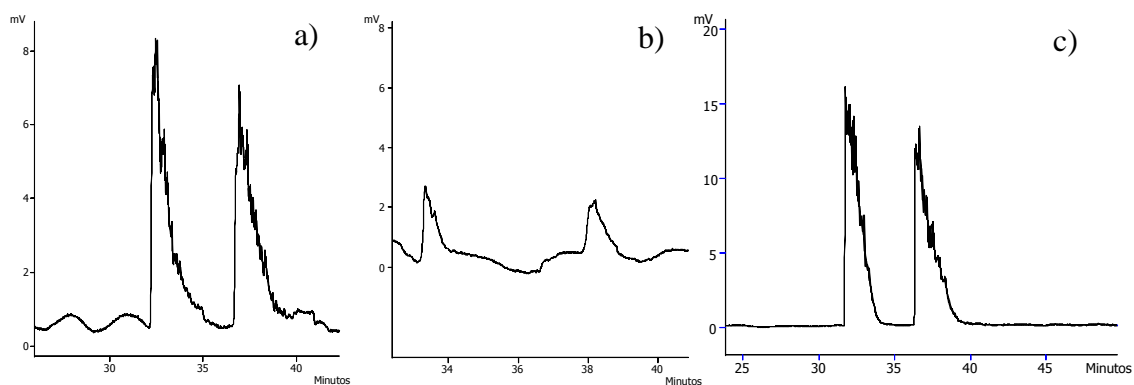


Figura 15: Cromatogramas con *peak splitting* obtenidos mediante GC. Disolvente y modo de inyección: a) metanol, *split* 1:2; b) metanol, *split* 1:10; c) *n*-hexano, *split/splitless* (1:10/1min).

Como se aprecia en la Figura 16, el efecto BBS desaparece completamente al trabajar con programación de temperatura en el horno (40°C durante 1 min y elevando la temperatura con rampa de 10°C/min hasta 180°C) y modo de inyección *split/splitless* 1:10 (1 min).

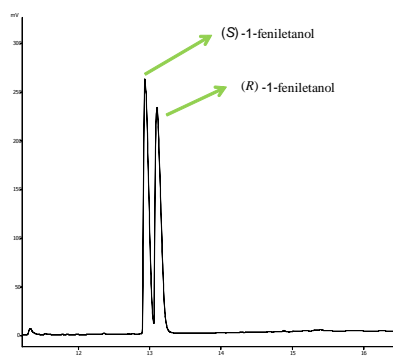


Figura 16: Cromatograma obtenido mediante GC con temperatura programada.

En cualquier caso, ante la dificultad de realizar el estudio en isoterma debido al efecto BBS, se decidió recurrir a la inyección del espacio de cabeza de los diferentes racematos para evitar el uso de disolvente en el proceso cromatográfico.

3.1.2.2. Inyección del espacio de cabeza (HS)

Como se describe en el apartado, 2.3.2.2., de *Materiales y métodos*, en un baño a 80°C se introduce un vial conteniendo la mezcla racémica de los patrones: α -pineno, 1-feniletanol, limoneno o linalol. Posteriormente, se inyecta el espacio de cabeza, en el cromatógrafo de gases, con la temperatura del horno en isoterma a: 80°C, 100°C, 125°C y 150°C. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura 17.

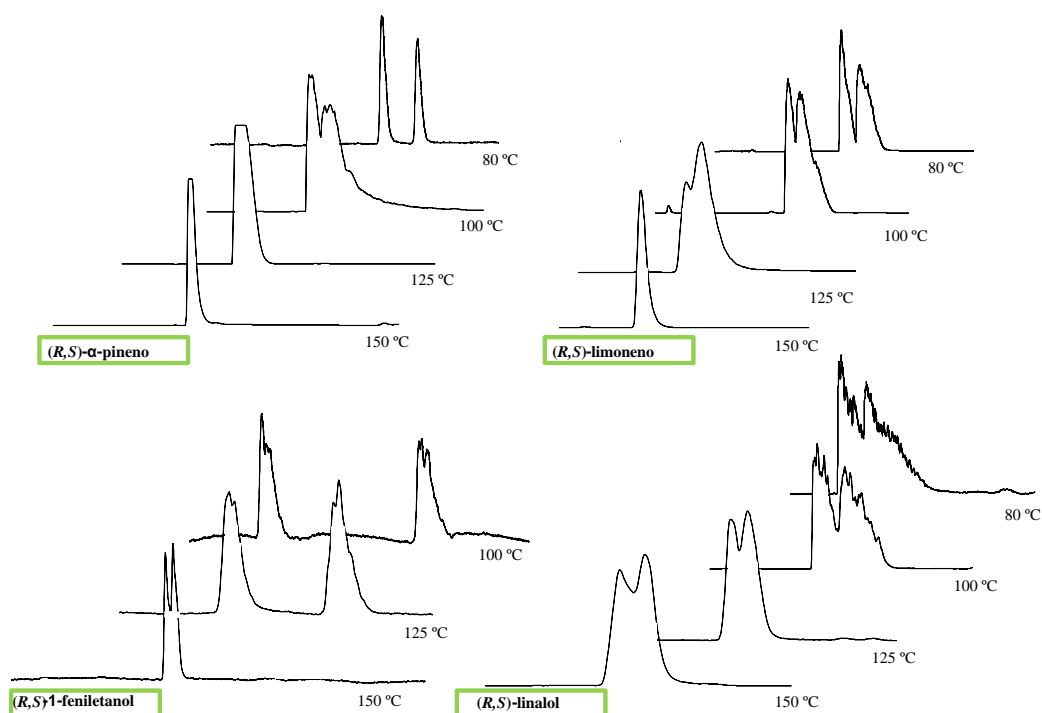


Figura 17: Cromatogramas obtenidos mediante GC de la inyección del HS.

En la Tabla 4 se muestra el factor de separación o selectividad (α) para cada pareja de enantiómeros, calculado mediante el cociente de sus tiempos de retención corregidos, a las diferentes temperaturas estudiadas. En este caso concreto, la estimación del tiempo muerto se llevó a cabo mediante la inyección del espacio de cabeza de *n*-hexano. A la vista de los resultados, se puede generalizar que para los compuestos estudiados la selectividad aumenta al disminuir la temperatura en el intervalo de 80°C a 150°C. Para los racematos de α -pineno, limoneno y linalol, el valor de α a 80°C es superior a 1,04, lo que en términos cromatográficos, se conoce como una buena separación o una separación factible. El valor de α para el racemato del 1-feniletanol a 100°C tiene un valor de 1,1 lo que se define, igualmente, como una buena separación cromatográfica. En estos casos, precisamente, en los que el reconocimiento quiral es muy efectivo, el mecanismo de interacción de la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina implica muy probablemente un proceso de inclusión e interacciones externas o asociaciones múltiples o ambas a la vez.

Tabla 4: Parámetros cromatográficos obtenidos mediante GC (columna caapilar)

Compuesto	t_1 (min.)	t_2 (min.)	α	t_1 (min.)	t_2 (min.)	α	t_1 (min.)	t_2 (min.)	α	t_1 (min.)	t_2 (min.)	α
	80°C			100°C			125°C			150°C		
α -pineno	13,5	14,4	1,1	5,3	5,5	1,03	2,8	2,8	1	1,8	1,8	1
1-feniletanol	n.d.	n.d.	n.d.	26,6	30,3	1,1	9	9,7	1,1	3,7	3,8	1,0
limoneno	17,9	18,7	1,0	7,3	7,5	1,0	3,5	3,5	1,0	2,3	2,3	1
linalol	62,4	64,7	2,3	18,4	19	1,03	5,8	5,9	1,0	2,9	3	1,0

Posiblemente el problema de la distorsión de picos observado para algunos compuestos en la Figura 17 fue debido a una inestabilización local de la fase estacionaria depositada en la columna. A su vez, esta alteración de la fase pudo haber sido provocada por la introducción previa en la columna del disolvente (o del eluyente) utilizados en análisis anteriores a los realizados mediante la introducción del espacio de cabeza.

Aceptando la hipótesis de trabajo planteada, consideramos que la consiguiente inundación (*solvent flooding*) de una porción de la columna podría haber ocasionado un ensanchamiento de banda en el espacio (*Band Broadening in Space*, BBS) causante, en último término, de la significativa distorsión apreciada en los picos eluidos.

Los resultados finalmente obtenidos mediante la inyección del espacio de cabeza confirman la hipótesis de partida ya que al aumentar la temperatura y, por tanto, al acelerar la migración de las bandas (o zonas) cromatográficas se minimiza el efecto señalado, con lo que se logra evitar en gran medida la distorsión de picos observada inicialmente.

Por otra parte, la temperatura es un factor muy importante en el reconocimiento selector quiral-compuesto quiral en cromatografía de gases. Por el contrario, la temperatura en HPLC no es un parámetro determinante, debido a la baja presión de vapor de la mayoría de los disolventes empleados habitualmente como eluyentes que hace que el intervalo de temperatura de trabajo no sea muy grande. Sin embargo, sí es destacable la optimización de otros parámetros, como la fase móvil o el pH. Puesto que, como se ha mencionado, el estudio se plantea desde la consideración del diferente comportamiento de la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina dependiendo de la fase móvil implicada en cromatografía, se estudia en el siguiente apartado la relación de algunos parámetros cromatográficos con el reconocimiento quiral en HPLC.

3.1.3. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina con columnas analíticas para HPLC en función de la composición de la fase móvil y el pH

Las columnas empleadas para realizar el estudio son la Nucleodex- β -ciclodextrina-per-metilada (Nucleodex-CD- β -per-Me) con las siguientes dimensiones: 100 mm x 4,6 mm; 200 mm x 4,0 mm y 100 mm x 4,6 mm unida a 200 mm x 4,0 mm. El selector quiral que contiene el relleno de todas ellas es la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina.

Sin duda, HPLC es una de las técnicas más empleadas para la separación y obtención de enantiómeros tanto a escala analítica como semi-preparativa y preparativa. La progresiva mejora de fases estacionarias quirales, en cuanto a sus selectividades y estabildades térmicas, así como la disponibilidad de detectores adecuados para la determinación de compuestos quirales hace que sea la técnica que, mayoritariamente, se escoja en la industria para obtener compuestos enantiopuros (*Mookdasanit* y *Tamura*, 2002). Sin embargo, no es tan habitual recurrir a esta técnica para analizar compuestos

volátiles quirales como es el caso de los racematos de α -pineno, carvona, 1-feniletanol, limoneno y linalol. Esto se debe a que los mencionados compuestos son habitualmente analizados mediante cromatografía de gases debido a su elevada volatilidad. No obstante, es evidente que el empleo de HPLC es una alternativa a tener en cuenta para la obtención de enantiómeros puros, principalmente por la facilidad que ofrece para recuperar los productos separados, aunque, evidentemente, sea imprescindible llevar a cabo la eliminación del eluyente.

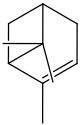
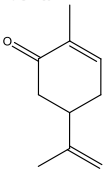
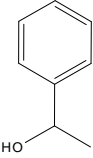
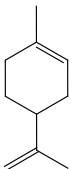
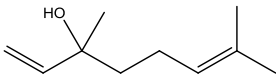
Además, la separación de una mezcla de enantiómeros en una determinada fase quiral viene determinada por el compuesto a separar, la columna escogida y la fase móvil, así como por una serie de parámetros cromatográficos a optimizar en cada caso concreto para alcanzar una buena resolución.

El objetivo del estudio que se detalla a continuación es analizar el comportamiento de los parámetros más importantes en HPLC, tales como la fase móvil y el pH, así como su influencia en el reconocimiento quiral por la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina, de los racematos seleccionados. Evidentemente, el eluyente que se debe emplear es aquel que esté específicamente recomendado para que la columna tenga un tiempo de vida adecuado. Es bien conocido que, en el caso de trabajar en fase inversa, la fase estacionaria es apolar y la fase móvil ha de tener una polaridad moderada. Por el contrario en fase normal, la fase estacionaria es polar y la fase móvil es apolar. En general, las aplicaciones que se realizan en fase normal son significativamente menores que en el caso de trabajar en fase inversa. Por esta razón, se optimiza un método para cromatografía de líquidos en fase inversa. El eluyente escogido es una mezcla de metanol y agua. El metanol es un disolvente habitualmente empleado cuando el selector quiral es una β -ciclodextrina, ya que permite desplazar con facilidad a los analitos por la cavidad de la misma (*Lai y Ng, 2004*).

Es importante clasificar al analito según sus propiedades químicas. Tanto α -pineno como limoneno son apolares; sin embargo 1-feniletanol y linalol tienen un grupo hidroxilo que los hace más polares que los anteriores. Por último, la carvona tiene un grupo carbonilo que marca su polaridad. En el caso de fases móviles polares, la retención será menor para aquellos compuestos de mayor polaridad como carvona, 1-feniletanol y linalol. En general, la retención disminuye al aumentar el porcentaje de

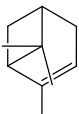
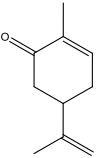
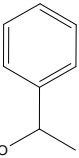
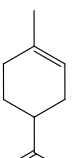
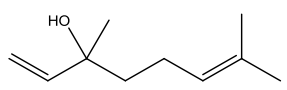
metanol empleado como eluyente. Se muestran en la Tabla 5 los parámetros cromatográficos de los análisis obtenidos con la columna Nucleodex- β -CD-per-Me, de dimensiones 100 mm x 4,6 mm, para los racematos indicados con las condiciones de metanol y agua (v/v) que se especifican a continuación: 1: metanol (100); 2: metanol/agua (90/10); 3: metanol/agua (80/20); 4: metanol/agua (60/40); 5: metanol/agua (40/60); 6: metanol/agua (20/80). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: flujo constante: 0,7 ml/min; detección: $\lambda = 210$ nm y temperatura: 25°C. En las Tablas 5, 6, 7 y 8 se emplea n.d. para indicar que un compuesto no se ha detectado y > 60 o > 120 para indicar que el tiempo de retención es superior a 60 o 120 minutos, respectivamente.

Tabla 5: Parámetros cromatográficos obtenidos mediante HPLC (columna Nucleodex- β -CD-per-Me 100 mm x 4,6 mm)

Compuesto	Parámetros cromatográficos						Condiciones	
	t_0 (min.)	t_1 (min.)	t_2 (min.)	k_1	k_2	α		Rs
α-pineno 	2,2	3,7	3,7	0,6	0,6	1	0	1
	2,2	3,8	3,8	0,7	0,7	1	0	2
	2,4	10,5	10,5	3,3	3,3	1	0	3
	2,6	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4
	2,1	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5
	2,0	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6
carvona 	2,2	3,4	3,4	0,5	0,5	1	0	1
	2,2	4,6	4,6	3,6	3,6	1	0	2
	2,4	9,3	9,3	2,8	2,8	1	0	3
	2,6	19,0	19,0	6,3	6,3	1	0	4
	2,1	29,9	29,9	13,1	13,1	1	0	5
	2,0	16,5	16,5	7,1	7,1	1	0	6
1-feniletanol 	2,2	2,7	2,7	0,2	0,2	1	0	1
	2,2	3,9	3,9	0,7	0,7	1	0	2
	2,4	11,2	11,2	3,6	3,6	1	0	3
	2,6	27,9	27,9	9,7	9,7	1	0	4
	2,1	32,1	32,1	14,1	14,1	1	0	5
	2,0	16,5	16,5	7,1	7,1	1	0	6
limoneno 	2,2	3,1	3,1	0,3	0,3	1	0	1
	2,2	3,4	3,4	2,4	2,4	1	0	2
	2,4	3,7	3,7	0,5	0,5	1	0	3
	2,6	7,8	7,8	2,0	2,0	1	0	4
	2,1	12,3	12,3	4,8	4,8	1	0	5
	2,0	35,1	35,1	16,1	16,1	1	0	6
linalol 	2,2	3,2	3,2	0,4	0,4	1	0	1
	2,2	4,2	4,2	0,9	0,9	1	0	2
	2,4	13,4	13,4	4,5	4,5	1	0	3
	2,6	26,2	26,2	9,1	9,1	1	0	4
	2,1	55,5	55,5	25,1	25,1	1	0	5
	2,0	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6

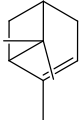
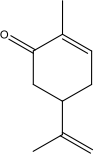
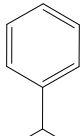
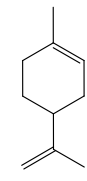
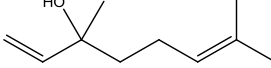
La variación de la polaridad con la fase móvil tiene sorprendentes resultados en la separación de una pareja de enantiómeros (Armstrong y Zukowski, 1994), por lo que es necesario probar diversos disolventes para encontrar el óptimo para la separación. En la Tabla 6 se muestran algunos parámetros cromatográficos obtenidos en los análisis realizados en las condiciones en las que se sustituye el agua, empleada en las anteriores experiencias, por un disolvente polar aprótico (acetonitrilo) y por metanol. Las condiciones de fase móvil utilizadas son (v/v): 1: metanol/acetonitrilo (70/30); 2: metanol/acetonitrilo (50/50); 3: metanol/acetonitrilo (30/70). Las condiciones cromatográficas fueron: flujo constante: 0,7 ml/min; detección: $\lambda = 210$ nm y temperatura: 25°C. A la vista de los valores de estos parámetros cromatográficos resulta evidente que, tampoco en esta ocasión, se aprecia una mejora significativa en los resultados respecto a los obtenidos en la Tabla 5, en cuanto a eficacia y selectividad se refiere.

Tabla 6: Parámetros cromatográficos obtenidos mediante HPLC (columna Nucleodex- β -CD-per-Me 100 mm x 4,6 mm)

Compuesto	Parámetros cromatográficos						Condiciones	
	t_0 (min.)	t_1 (min.)	t_2 (min.)	k_1	k_2	α	R_s	
α-pineno 	1,5	12,6	12,6	7,4	7,4	1	0	1
	1,6	13,2	13,2	7,2	7,2	1	0	2
	1,7	14,7	14,7	13,7	13,7	1	0	3
carvona 	1,5	2,5	2,5	0,7	0,7	1	0	1
	1,6	5,7	5,7	2,5	2,5	1	0	2
	1,7	3,2	3,2	0,8	0,8	1	0	3
1-feniletanol 	1,5	2,4	2,4	0,6	0,6	1	0	1
	1,6	3,4	3,4	1,1	1,1	1	0	2
	1,7	2,6	2,6	0,5	0,5	1	0	3
limoneno 	1,5	3,2	3,2	1,1	1,1	1	0	1
	1,6	4,4	4,4	1,7	1,7	1	0	2
	1,7	10,1	10,1	4,7	4,7	1	0	3
linalol 	1,5	3,2	3,2	1,1	1,1	1	0	1
	1,6	15,5	15,5	8,6	8,6	1	0	2
	1,7	16,3	16,3	8,3	8,3	1	0	3

Por otra parte, es de especial importancia en el reconocimiento quiral y, en último término, en la separación de moléculas, el tipo de interacción establecido entre el soluto y el selector quiral. En este sentido, es bien conocido que las interacciones pueden ser de distinto tipo: puente de hidrógeno, dipolo-dipolo o interacciones estéricas. En este punto, el efecto del pH de la fase móvil está estrechamente relacionado con el hecho de que se facilite o dificulte la presencia del analito en la fase móvil. El pH puede intervenir en la interacción del analito con la parte apolar de la ciclodextrina haciendo más estable el complejo de inclusión o favoreciendo las interacciones polares con la parte externa de la β -ciclodextrina. Por esta razón, el control del pH de la fase móvil permite mejorar la resolución tanto en compuestos quirales como aquirales (*Ching y col.*, 2000; *Fung y col.*, 2006). No obstante, valores extremos de pH no suelen favorecer las interacciones analito-selector quiral. En los análisis realizados, el buffer empleado para el control del pH es el TEAA. Se prepara disolviendo TEAA en ácido acético glacial para ajustarlo al pH deseado. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 7, a pH moderadamente ácido (aproximadamente pH=5) y ácido (pH=3) la retención aumenta considerablemente, sin apreciarse una mejora de la resolución en los compuestos analizados para las condiciones de fase móvil (v/v): 1: metanol/agua (40/60), 1% TEAA, pH=5,14; 2: metanol/agua (60/40), 1% TEAA, pH=5,88; 3: metanol/agua (40/60), 1% TEAA, pH=3; 4: metanol/agua (60/40), 1% TEAA, pH=3. Las condiciones cromatográficas fueron: flujo constante: 0,7 ml/min; detección: $\lambda = 210$ nm y temperatura: 25°C.

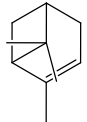
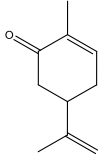
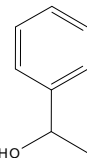
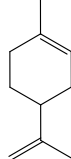
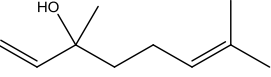
Tabla 7: Parámetros cromatográficos obtenidos mediante HPLC (Nucleodex- β -CD-per-Me 100 mm x 4,6 mm)

Compuesto	Parámetros cromatográficos							Condiciones
	t_0 (min.)	t_1 (min.)	t_2 (min.)	k_1	k_2	α	R_s	
α-pineno 	2,5	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1
	2,1	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2
	2,5	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3
	2,1	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4
carvona 	2,5	46,2	46,2	17,5	17,5	1	0	1
	2,1	12,2	12,2	4,5	4,5	1	0	2
	2,5	34,6	34,6	12,8	12,8	1	0	3
	2,1	6,7	6,7	2,1	2,1	1	0	4
1-feniletanol 	2,5	11,8	11,8	3,7	3,7	1	0	1
	2,1	5,1	5,1	1,3	1,3	1	0	2
	2,5	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3
	2,1	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4
limoneno 	2,5	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1
	2,1	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2
	2,5	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3
	2,1	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4
linalol 	2,5	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1
	2,1	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2
	2,5	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3
	2,1	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4

La regulación del pH a 7,14, así como la conexión de las dos columnas empleadas anteriormente presenta una mejora sustancial en la resolución alcanzada para α -pineno, 1-feniletanol y limoneno. Los parámetros cromatográficos que se muestran en la Tabla 8 se obtienen con las siguientes condiciones de fase móvil (v/v): 1: columna 100 mm x 4,0 mm y metanol/agua (70/30), 0,1% TEAA; 2: columna 200 mm x 4,6 mm y metanol/agua (70/30), 0,1% TEAA; 3: columna 200 mm x 4,6 mm y metanol/agua (25/75), 0,1% TEAA; 4: columna 100 mm x 4,0 mm + columna 200 mm x 4,6 mm y metanol/agua (70/30), 0,1% TEAA; 5: columna 100 mm x 4,0 mm + columna 200 mm x 4,6 mm y metanol/agua (25/75), 0,1% TEAA; 6: columna 100 mm x 4,0 mm + columna 200 mm x 4,6 mm y metanol/agua (50/50), 0,1% TEAA. El caso más sorprendente es el que se ilustra en la Figura 18 en el que aprecia la mejora de la selectividad lograda tanto por el efecto de la regulación del pH a 7,14 como por el aumento de la longitud de la columna o, lo que es lo mismo, por el incremento del

número de platos efectivos, resultante de la unión de las dos columnas mencionadas. Además, es de destacar el hecho de que, hasta la fecha, no se tiene constancia, según la bibliografía publicada y la base de datos *Chirobase ISIS*, de haberse realizado la separación del racemato del limoneno mediante HPLC.

Tabla 8: Parámetros cromatográficos obtenidos mediante HPLC (Nucleodex-β-CD-per-Me 100 mm x 4,6 mm; 200 mm x 4,6 mm y la unión de ambas)

Compuesto	Parámetros cromatográficos							Condiciones
	t ₀ (min.)	t ₁ (min.)	t ₂ (min.)	k ₁	k ₂	α	Rs	
α-pineno 	2,3	44,7	46,6	18,2	19,1	1,0	0	1
	2,9	43,2	45,7	13,9	14,7	1,1	3,0	2
	2,6	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3
	1,4	77,2	84,4	54,2	59,3	1,1	13,1	4
	3,8	>120	>120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5
	3,3	76	76	21,7	21,7	1	0	6
carvona 	2,3	5,8	5,8	1,5	1,5	1	0	1
	2,9	6,2	6,2	1,1	1,1	1	0	2
	2,6	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3
	1,4	>120	>120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4
	3,8	>120	>120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5
	3,3	41,7	41,7	11,4	11,4	1	0	6
1-feniletanol 	2,3	3,9	3,97	0,7	0,7	1	0	1
	2,9	4,4	4,4	0,5	0,5	1	0	2
	2,6	25,6	27,1	8,8	9,4	1,1	1,9	3
	1,4	7,6	7,8	4,4	4,6	1,0	5,8	4
	3,8	43,1	46,1	10,3	11,1	1,1	8,8	5
	3,3	16,1	17,0	3,8	4,1	1,1	9,7	6
limoneno 	2,3	41,3	41,3	16,8	16,8	1	0	1
	2,9	34,3	35,3	10,8	11,1	1,0	0,6	2
	2,6	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3
	1,4	58,7	61,2	40,9	42,7	1,0	3,0	4
	3,8	>120	>120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5
	3,3	>120	>120	n.d.	n.d.	n.d.	0	6
linalol 	2,3	6,6	6,6	1,8	1,8	1	0	1
	2,9	6,4	6,4	1,2	1,2	1	0	2
	2,6	>60	>60	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3
	1,4	10,6	10,6	0,2	6,6	1	0	4
	3,8	>120	>120	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5
	3,3	52,5	52,5	14,7	14,7	1	0	6

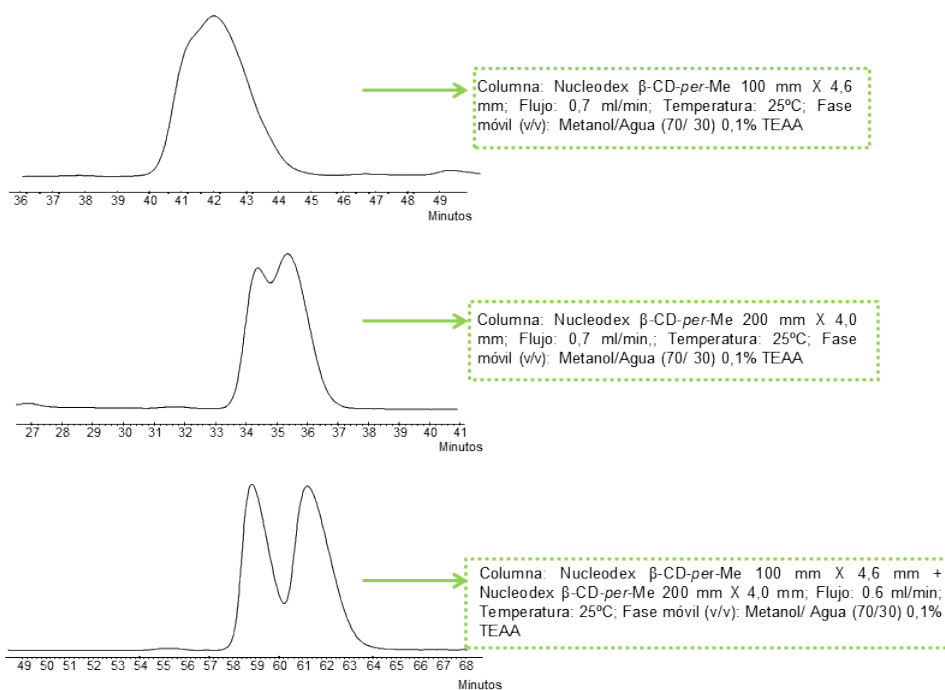


Figura 18: Cromatogramas obtenidos mediante HPLC en los análisis del racemato de limoneno.

Por último, se analizan los compuestos con la columna Chiracel OD-H de dimensiones 250 x 4,6 mm. Las interacciones que determinan la selectividad en el caso de la celulosa se basan, principalmente, en interacciones débiles. Se emplea como fase móvil *n*-hexano/etanol con las siguientes proporciones (v/v): 40/60, 50/50, 60/40, 80/20 y 90/10 con 0,2% de TEAA. La selectividad obtenida no resultó adecuada, excepto para el racemato de 1-feniletanol para el que se lograron muy buenas resoluciones utilizando los porcentajes 80/20 y 90/10 ya que se alcanzan valores para α de 1,2 y 1,3, respectivamente.

Pese a que HPLC es la técnica habitualmente empleada para realizar separaciones en fase inversa, cada vez más se aceptan las ventajas de la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), especialmente para aplicaciones que se podrían llevar a cabo utilizando fases móviles apolares. Generalmente, se estima que SFC es de tres a cinco veces más rápida que HPLC debido tanto a la baja viscosidad como a la alta difusividad de los fluidos supercríticos que permiten acortar los tiempos de retención e incrementar la productividad respecto a HPLC. Además, el empleo de fluidos supercríticos permite la recolección de los productos mediante despresurización y, por tanto, sin necesidad de eliminar el disolvente. Por estas razones, se consideró

conveniente evaluar la enantioselectividad del selector quiral objeto de estudio empleando CO₂ en condiciones supercríticas.

3.1.4. Evaluación de la enantioselectividad de heptakis-(2,3,6-tri-O-metil)- β -ciclodextrina para SFC en función de la densidad de la fase móvil

Para el estudio se emplea una columna de Nucleodex- β -CD-per-Me, de dimensiones 250 mm x 10 mm, instalada en la planta diseñada y construida de SF-SMB. Por esta razón, los datos obtenidos se comentan en el apartado 3.3.11 de *Resultados y discusión*.

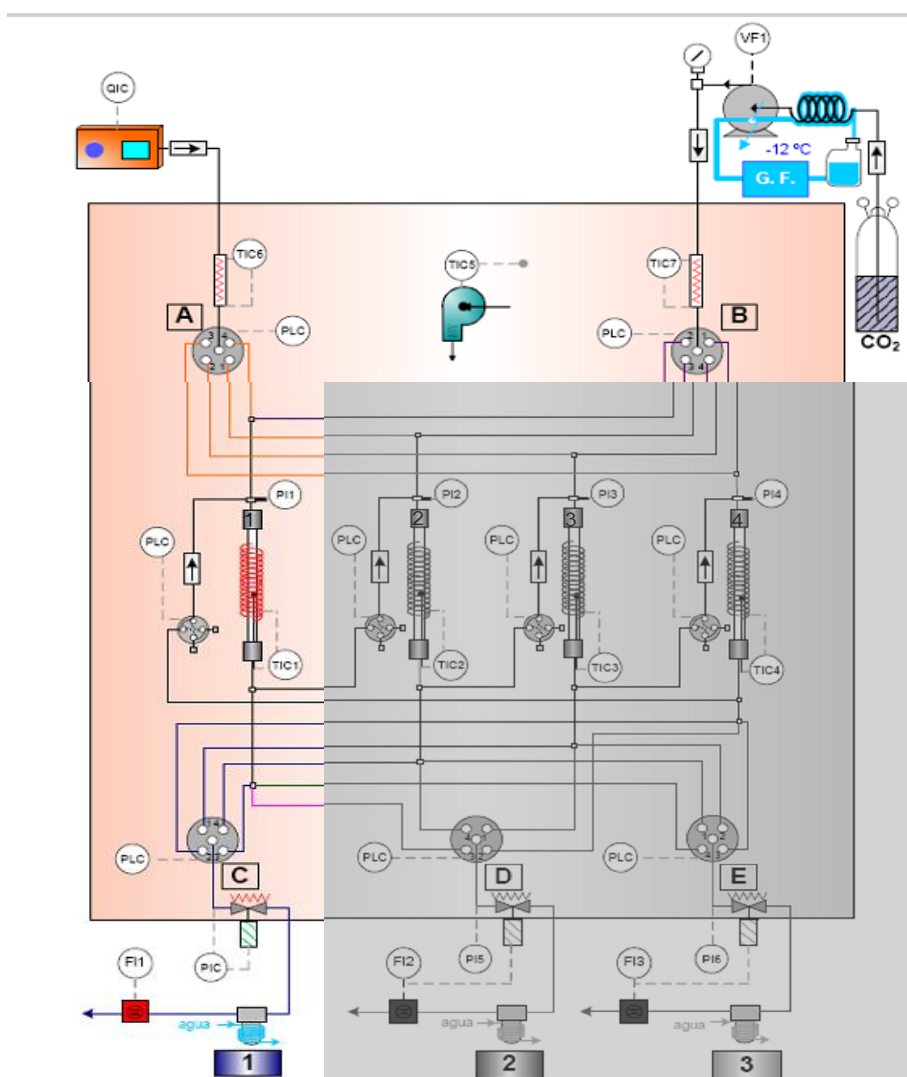


Figura 19: Planta de SF-SMB. Se muestra en color aquellos dispositivos empleados para la experimentación realizada en la modalidad SFC.

3.2. Determinación de excesos enantioméricos de compuestos quirales en muestras complejas mediante RPLC-GC-MS y MDGC-MS

Como ya se ha indicado en el apartado de *Presentación y objetivos*, en este trabajo se plantea el desarrollo de métodos analíticos para la selección de fuentes naturales alternativas que sean adecuadas para la obtención de enantiómeros puros. Para ello, se recurre a técnicas multidimensionales de análisis ya que se trata de muestras en las que habitualmente destaca su complejidad y, por tanto, exigen disponer de altas capacidades de picos. De este modo, se maximiza el número de parejas de compuestos que pueden ser separados con una resolución específica y en un intervalo de tiempo determinado. Precisamente por esta razón, frecuentemente, se desaconseja el empleo de técnicas analíticas convencionales para el estudio de los excesos enantioméricos de compuestos quirales presentes en mezclas complejas. El hecho de optimizar dos metodologías de análisis con dos sistemas multidimensionales diferentes (cromatografía de líquidos acoplada a cromatografía de gases y cromatografía de gases multidimensional), se debe a que los compuestos pueden tener muy diversa volatilidad, polaridad y naturaleza química, por lo que cada una de esas técnicas puede ser más adecuada para una determinada familia de compuestos (*Marriott y col., 2001*). Además, la complementariedad de las citadas técnicas multidimensionales nos permite, por ejemplo, comparar la composición enantiomérica de un determinado compuesto, tanto de un aceite esencial como de la planta a partir de la cual se realiza su extracción. Por estas razones, se consideró conveniente hacer uso de la posibilidad que ofrecen los sistemas cromatográficos multidimensionales, en el sentido de permitir lo que podemos denominar una introducción selectiva, en la segunda dimensión del sistema, de la fracción de muestra previamente seleccionada en la primera dimensión. A efectos del estudio planteado, pareció igualmente favorable la simplificación que supone la integración, en la primera dimensión, de la etapa de preparación de muestra.

El hecho de recurrir a fuentes naturales para la obtención de enantiómeros puros parece un procedimiento inmediato, ya que la Naturaleza es quiral y muchas fuentes naturales, como las plantas officinales, los aceites esenciales y los subproductos alimentarios son fuentes potenciales de enantiómeros puros o altamente enriquecidos debido a que, generalmente, se observa una marcada preferencia por una de las formas enantioméricas (homoquiralidad biológica).

Por otra parte, hay que destacar que un proceso relativamente frecuente, como es el de racemización, causa la alteración de los excesos enantioméricos característicos de compuestos quirales. Al ser los enantiómeros compuestos con las mismas propiedades físicas y químicas, excepto en su interacción con la luz polarizada u otra molécula quiral, en ocasiones pequeñas variaciones de pH, temperatura u otras propiedades como la agitación, favorecen la conversión de enantiómero en otro. Ello es debido a la pequeña barrera energética que hay entre enantiómeros (del orden de 10^{-14} J/mol). Por estas razones, en el estudio planteado se ha prestado especial atención al control de las variables experimentales que puedan acentuar el riesgo de que se produzca la racemización de un determinado compuesto quiral.

A continuación, se describen los trabajos desarrollados con las diferentes técnicas multidimensionales empleadas: cromatografía de líquidos en fase inversa acoplada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (RPLC-GC-MS) y cromatografía de gases multidimensional acoplada a espectrometría de masas (MDGC-MS).

3.2.1. Separación de enantiómeros en muestras complejas reales mediante RPLC-GC-MS

Para la optimización del procedimiento a seguir, se analizaron los aceites esenciales de *Mentha spicata*, *Carum carvi*, *Mentha crispera* y *Anethum graveolens*. Según los datos bibliográficos existentes sobre el tema, estos aceites esenciales contienen un alto contenido en carvona y limoneno (*Bouwmeester* y col., 1995; *de Carvalho y da Fonseca*, 2006; *de Sousa* y col., 2007). Además, mientras que *Mentha spicata* está enriquecida en (*R*)-carvona y (*S*)-limoneno, *Carum carvi* y *Anethum graveolens* lo están en (*S*)-carvona y (*R*)-limoneno, por lo que parece evidente que dichos aceites podrían considerarse fuentes alternativas para la obtención de enantiómeros puros. No obstante, tanto la variabilidad natural como las posibles adulteraciones hacen que sea necesario disponer de métodos que permitan un estricto control de la composición enantiomérica de dichas muestras a escala analítica, con objeto de partir de datos fiables que faciliten el posterior escalado y obtención, a escala preparativa, de enantiómeros puros.

Como se ha citado a lo largo de la *Memoria*, estos compuestos quirales son muy valorados, entre otras, en la industria cosmética, agroquímica y alimentaria. En concreto, la carvona es apreciada en la industria de aromas, pero también se emplea como inhibidor de la germinación, agente antimicrobiano, indicador bioquímico ambiental y repelente de insectos, así como en aplicaciones en medicina. Sin embargo, es la (*S*)-carvona, y no su imagen especular, la que presenta, por ejemplo, la actividad de inhibición de brotes en patatas, por lo que la separación de dichos enantiómeros parece una necesidad evidente (*de Carvalho y da Fonseca, 2006*). También es conocido el hecho de que el (*R*)-limoneno es el responsable del olor característico a naranja, mientras que el (*S*)-limoneno posee el olor típico de la trementina y que ello justifica la importancia que se otorga a la obtención de compuestos enantiopuros.

Por otra parte, la legislación relativa al uso de aromatizantes, en la que se indica la necesidad de establecer la composición enantiomérica a efectos de caracterizar un determinado aroma, ha propiciado un aumento de la demanda de compuestos enantiopuros y, en consecuencia, la exigencia de controlar de modo fiable los excesos enantioméricos de compuestos volátiles quirales (*Sciarrone y col., 2011*). En este sentido, también es más cuantiosa la legislación en el caso de la industria alimentaria, de manera que son más exigentes las especificaciones necesarias en ingredientes o aditivos en alimentos. No sería sorprendente que, debido a la posible diferente actividad biológica, toxicología y metabolismo que pueden tener las formas enantioméricas de un compuesto quiral, sea también regulada, en un futuro, la composición enantiomérica de determinados compuestos quirales en alimentos (*Armstrong y col., 1990*).

Los aceites esenciales están formados por lípidos simples y multitud de compuestos volátiles, constan de numerosos componentes con diferentes volatilidades, polaridades y concentraciones. Además, si se considera que la mayoría de los compuestos que forman estos aceites esenciales son quirales, la complejidad de su separación aumenta significativamente. Es evidente, según se observa en las Figuras 20, 21, 22 y 23, la dificultad del análisis (inyección de 0,5 μ l de una disolución de 20 μ l/6 ml de *n*-hexano en GC-MS siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.6.1.4). Aunque la eficacia de la columna es la adecuada, como se comentó en el apartado 3.1.2. de *Resultados y discusión*, no es posible separar los compuestos racémicos de interés debido a la concentración y cantidad presente en la muestra. La detección e

identificación en MS es compleja debido al inevitable solapamiento de distintos picos cromatográficos, de manera que, con cierta frecuencia, se puede dar la circunstancia de que se identifiquen dos picos cromatográficos como el mismo compuesto. En el estudio llevado a cabo, la identificación se ha realizado tentativamente con la biblioteca NIST del MS.

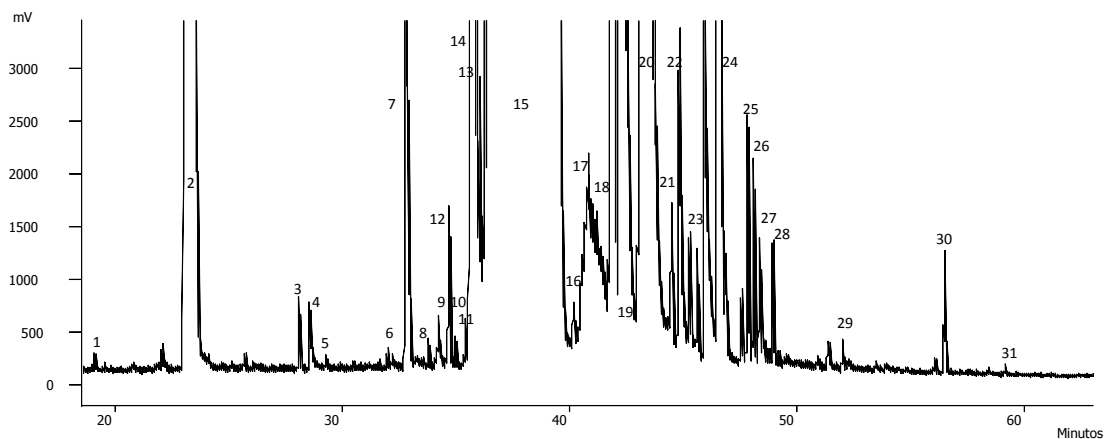


Figura 20: Cromatograma obtenido mediante GC-MS de *Mentha spicata*. Identificación: 1: β -pineno, 2: **limoneno**, 3: eucaliptol, 4: 3-octanol, 5: nonanal, 6: *trans*-óxido de limoneno, 7: isomentona, 8: acetato de octilo, 9: isovalerato de hexenilo, 10: propan-2-amina, 11: fenilmetileno, 12: dihidrocarvona, 13: acetato de metilo, 14: farnesol, 15: **carvona**, 16: acetato de nonanilo, 17: mentol, 18: α -terpineol, 19: β -bourboneno, 20: *cis*-dihidrocarveol, 21: cubebeno, 22: *cis*-carveol, 23: β -cariofileno, 24: jasmonato de metilo, 25: geraniol, 26: γ -elemeno, 27: aloaroma de dendreno, 28: β -cubebeno, 29: δ -cadineno, 30: óxido de cariofileno, 31: linalol.

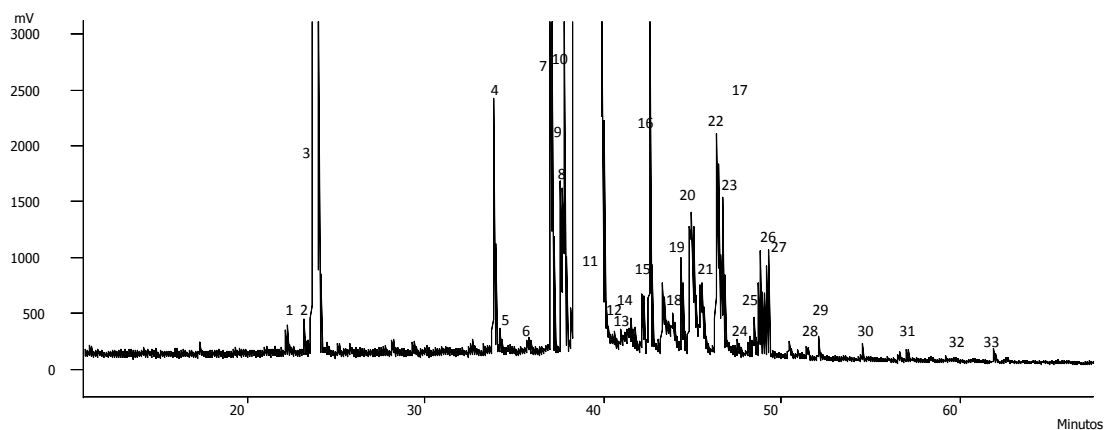


Figura 21: Cromatograma obtenido mediante GC-MS de *Carum carvi*. Identificación: 1: p-cimeno, 2: octanal, 3: **limoneno**, 4: estragol, 5: β -linalol, 6: canfenol, 7: dihidrocarvona, 8: dihidrocarvona, 9: estragol, 10: terpineol, 11: **carvona**, 12: octanol, 13: α -copaeno, 14: verbenona, 15: quinolina-2,4-diol, 16: α -terpineol, 17: *cis*-carveol, 18: nonanal, 19: α -amorfeno, 20: dihidrocarveol, 21: *cis*-carveol, 22: neo-dihidrocarveol, 23: β -cariofileno, 24: α -cariofileno, 25: γ -muroleno, 26: β -chamigreno, 27: α -selineno, 28: α -copaen-11-ol, 29: δ -cadineno, 30: óxido de cariofileno, 31: aloaroma de dendreno, 32: spatulenol, 33: epiglobulol.

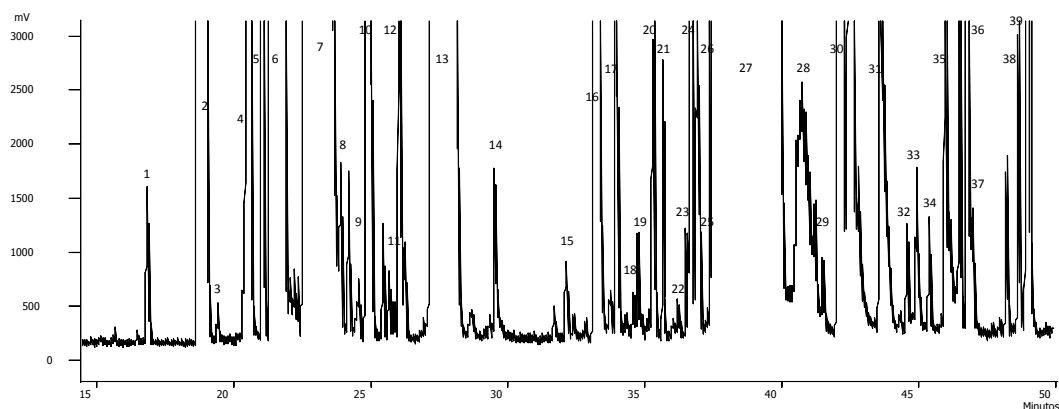


Figura 22: Cromatograma obtenido mediante GC-MS de *Mentha crispata*. Identificación: 1: α -felandreno, 2: α -pineno, 3: isobutil-2-metil-butirato, 4: β -pineno, 5: terpineno, 6: 3-careno, 7: **limoneno**, 8: β -pineno, 9: β -felandreno, 10: γ -terpineno, 11: α,α -dimetilestireno, 12: terpinoleno, 13: eucaliptol, 14: 1-octen-3-ol, 15: 1-octen-3-ol, 15: óxido de limoneno, 16: *cis*- β -terpineol, 17: β -linalol, 18: verbenol, 19: isopulegona, 20: canfenona, 21: *cis*-3-hexenil-isovalerato, 22: *trans*- β -terpineol, 23: *trans*-dihidrocarvona, 24: isopulegona, 25: 4-isopropil-1-metil-2-ciclohexen-1-ol, 26: terpinen-4-ol, 27: **carvona**, 28: *cis*-terpineol, 29: α -copaeno, 30: α -terpineol, 31: *cis*-carveol, 32: β -cubebeno, 33: γ -cadineneo, 34: α -cubebeno, 35: jasmonato de metilo, 36: *trans*-carveol, 37: *trans*-cariofileno, 38: aloaroma de dendreno, 39: α -humuleno.

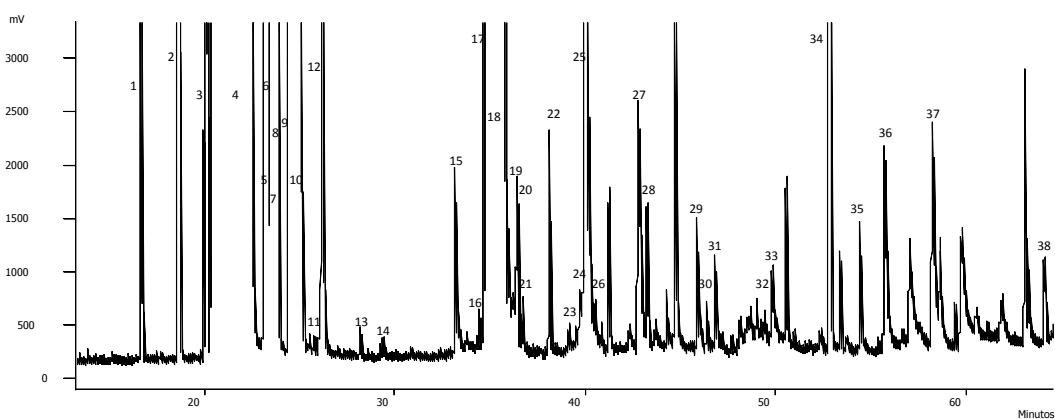


Figura 23: Cromatograma obtenido mediante GC-MS de *Anethum graveolens*. Identificación: 1: α -felandreno, 2: β -pineno, 3: α -pineno, 4: β -pineno, 5: α -pineno, 6: α -felandreno, 7: limoneno, 8: β -pineno, 9: β -felandreno, 10: **limoneno**, 11: 2,3-dihidro-1,8-cineol, 12: β -pineno, β -felandreno, 13: eucaliptol, 14: *trans*-3-caren-2-ol, 15: *cis*-sabinol, 16: óxido-limoneno, 17: *trans*-2-caren-4-ol, 18: hexahidrobencofurano, 19: α -tujona, 20: carvenona, 21: acetil-xileno, 22: acetato de bornilo, 23: β -terpineol, 24: piperitona, 25: óxido de piperitona, 26: sabina cetona, 27: *cis*-sabinol, 28: óxido de piperitona, 29: ascarilol, 30: diepóxido de limoneno, 31: ascarilol, 32: ascarilol, 33: isopulegona, 34: miristicina, 35: timol, 36: pinane-2,3-ol, 37: óxido de piperitona, 38: dihidrocarveol.

Ni siquiera el ajuste de la retención y de la selectividad mediante la programación de temperatura son efectivos, ya que se consigue únicamente evitar algunos solapamientos a costa de provocar otros. En cualquier caso, en este punto de la experimentación pareció indudable que, ante la dificultad de mejorar la separación lograda para los compuestos objeto de estudio utilizando un sistema cromatográfico unidimensional, se debía recurrir a técnicas multidimensionales. En suma, la complejidad cromatográfica hace que para la correcta identificación de los compuestos sea necesario el empleo de RPLC-GC-MS, ya que permite preseparar, seleccionar y transferir al cromatógrafo de gases la fracción que contenga los compuestos de interés, con lo que se obtienen cromatogramas mucho más sencillos y que, por consiguiente, aportan mayor fiabilidad para la etapa de identificación a realizar en la tercera dimensión del sistema.

No se ha de olvidar que una de las grandes dificultades del acoplamiento LC-GC es precisamente la eficiente eliminación del eluyente, es decir, la adecuación de las técnicas para ajustar la compatibilidad entre ellas. La naturaleza de la fase móvil utilizada en la primera dimensión no debe impedir el funcionamiento y la optimización de la separación que se lleva a cabo en la segunda dimensión. En este caso concreto, se realiza mediante la interfaz TOTAD, con la que se aplica un flujo de helio, desde la parte inferior del *glass-liner* (camisa de vidrio situada en el interior del PTV) a la superior, con objeto de facilitar la adsorción de los compuestos de interés en el Tenax TA, mientras se elimina el eluyente. Es de destacar en este punto que la preseparación que se realiza en HPLC es RPLC, y no NPLC, lo que supone una dificultad añadida debido al mayor volumen de vaporización que, por unidad de volumen de líquido, producen los eluyentes polares. Sin embargo, se emplea RPLC por ser una técnica más demandada, al ser mayor el número de aplicaciones que se realiza con la misma y, por lo tanto, el método optimizado es más versátil.

Un parámetro importante a optimizar en RPLC-GC-MS es la temperatura inicial del PTV a la que se realiza la transferencia, ya que junto con el flujo de helio que pasa a través del *glass-liner*, interviene directamente en la correcta eliminación del eluyente (en este caso, metanol/agua). Para un flujo de helio de 200 ml/min, se varía la temperatura del PTV a 50°C, 75°C y 120°C (mantenida 16 minutos) hasta que se hace la transferencia completa. En la Figura 24 se pueden observar los cromatogramas

obtenidos para la transferencia realizada (de 1,2 ml) de la muestra *Mentha spicata* a las tres temperaturas del PTV. En la Figura 24a observa el cromatograma del análisis que se realiza con el PTV a 50°C en el que, aunque aparece un pequeño pico al inicio del cromatograma, se aprecia que se consigue eliminar prácticamente todo el eluyente. Cabe destacar que la eliminación del eluyente es completamente efectiva si la comparamos, incluso, con el análisis realizado mediante una inyección convencional (GC-MS) en la que, habitualmente, el pico del disolvente aparece al inicio del cromatograma. Este hecho favorece el análisis de compuestos muy volátiles sin que solapen con el pico del disolvente. En la Figura 24b se muestra el cromatograma obtenido en el análisis realizado a la temperatura del PTV de 75°C. La temperatura y el flujo de helio no deben ser muy elevados para evitar que se volatilicen y se eliminen ciertos compuestos retenidos en el Tenax TA. Por otro lado, esa temperatura no debe ser muy baja para evitar el eluyente al inicio del cromatograma, lo que además, tendría un efecto negativo para el detector de masas. Por tanto, debe establecerse un compromiso entre la temperatura del PTV y su efecto en la viabilidad de lograr la detección de los compuestos de interés. En la Figura 24c se puede observar que, con la temperatura del PTV a 120°C, no se identifica algunos de los compuestos como, por ejemplo, el limoneno. Además, se observa una disminución sustancial en el área del pico correspondiente a la carvona. Por tanto, la temperatura del PTV óptima, para eliminar el eluyente sin provocar la pérdida por coevaporación de limoneno y carvona, es de 75°C.

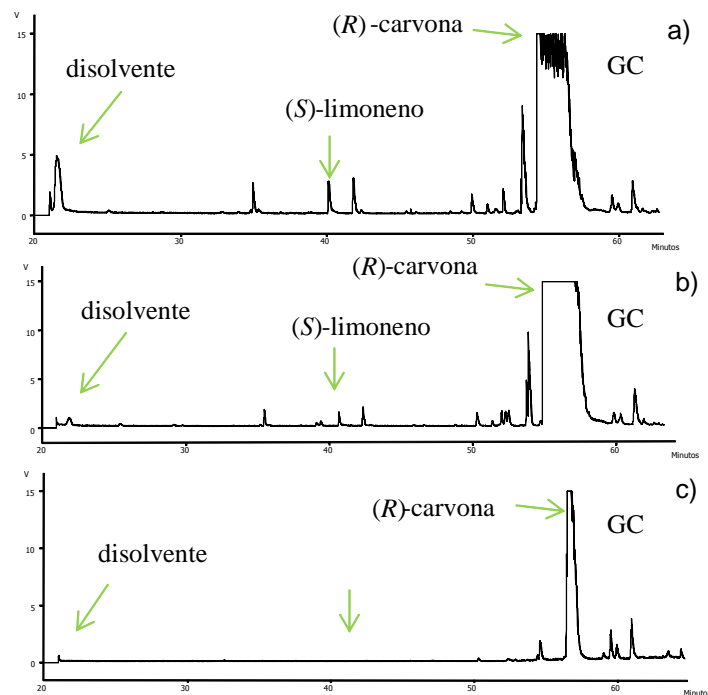


Figura 24: Cromatogramas obtenidos mediante RPLC-GC-MS de *Mentha spicata* a la temperatura del PTV durante la transferencia de: a) 50°C; b) 75°C; c) 120°C.

En las Figuras 25 y 26 se muestran los cromatogramas obtenidos a partir de las transferencias de 0,92 a 2,12 minutos y de 2,12 a 3,63 minutos para los aceites esenciales de *Mentha spicata* y *Carum carvi* (inyectando 20 μ l de una disolución de 20 μ l/6 ml de *n*-hexano), respectivamente. A la vista de los cromatogramas, se puede destacar, principalmente, su simplicidad y la eficiente eliminación del disolvente (con la temperatura inicial del PTV a 75°C durante la transferencia), para un volumen transferido de 1,2 y 1,5 ml, respectivamente. Es innegable que la identificación es más sencilla y, por tanto, más fiable en comparación con los cromatogramas obtenidos mediante GC-MS mostrados en las Figuras 20 y 21.

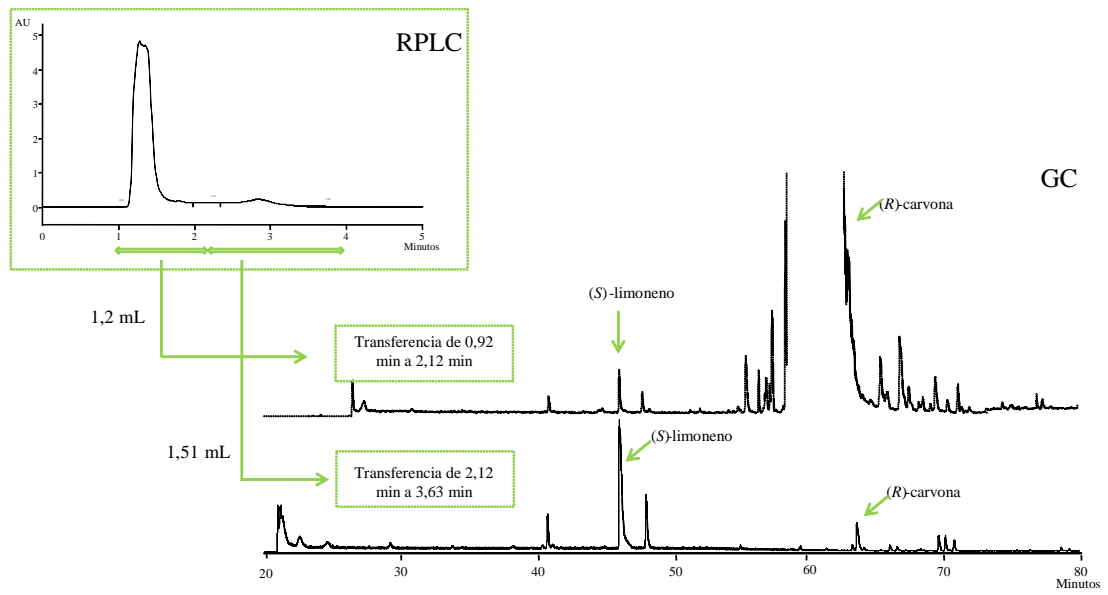


Figura 25: Cromatograma obtenido mediante RPLC-GC-MS de *Mentha spicata*.

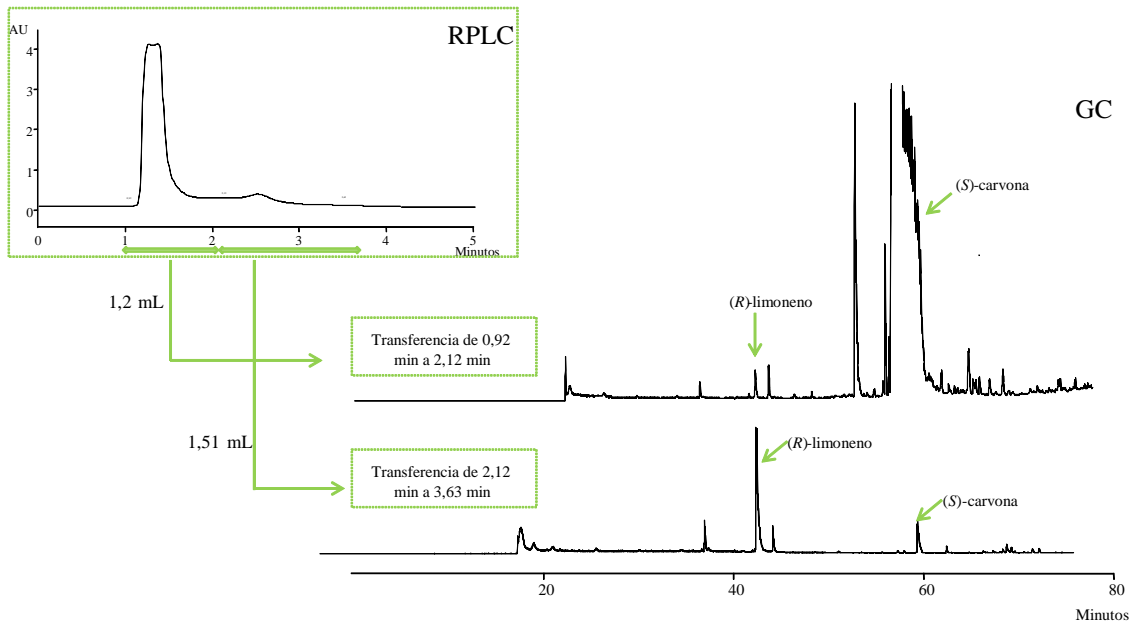


Figura 26: Cromatograma obtenido mediante RPLC-GC-MS de *Carum carvi*.

Un aspecto importante en relación con el acoplamiento *on-line* RPLC-GC se refiere a la posibilidad de lograr excelentes resoluciones enantioméricas, para compuestos quirales presentes en muestras complejas, mediante la inyección directa de la muestra (es decir, sin preparación y concentración previas). Realmente, éste es exactamente el caso de la aplicación descrita puesto que, como ya se ha mencionado en *Materiales y métodos*, únicamente es necesario filtrar la muestra antes de su introducción en el cromatógrafo de líquidos (primera dimensión) para el posterior análisis por cromatografía de gases (segunda dimensión) de la fracción seleccionada y transferida. Por esta razón, se trata de un procedimiento que evita, o minimiza en gran medida, el riesgo de racemización que, muy frecuentemente, implican los diversos procedimientos requeridos durante las etapas de preparación y concentración de muestra que son habitualmente necesarias para alcanzar la sensibilidad que proporciona GC. Además, este método permite realizar este tipo de análisis con las exigencias que actualmente plantea el estudio de los excesos enantioméricos de compuestos quirales en muestras reales.

Todos los análisis se realizaron por triplicado. El RSD (%) calculado para el (*S*)-limoneno, (*S*)-carvona, (*R*)-limoneno y (*R*)-carvona es 4,5%; 13,1%; 2,1% y 4,6% respectivamente. El límite de detección para los mismos compuestos es $1,2 \cdot 10^{-4}$ mg/l; $1,5 \cdot 10^{-5}$ mg/l; $7,1 \cdot 10^{-5}$ mg/l; $7,1 \cdot 10^{-5}$ mg/l; $1,7 \cdot 10^{-5}$ mg/l, respectivamente.

Por otra parte, la fracción de interés se puede aislar selectivamente en la etapa de RPLC (lo que implica mayor selectividad en el análisis). Como ejemplo, en la Figura 27 se muestra la transferencia optimizada (0,92 - 2,12 min) en *Mentha spicata* y *Carum carvi* (inyectando 20 μ l de una disolución de 25 μ l/100 ml de *n*-hexano). Un hecho a destacar es la selección de la transferencia para analizar la carvona, además de los tiempos de análisis más cortos y la mayor fiabilidad, en comparación con las técnicas cromatográficas unidimensionales, del resultado al evitar la manipulación de muestra, así como la elevada eficacia y sensibilidad alcanzada.

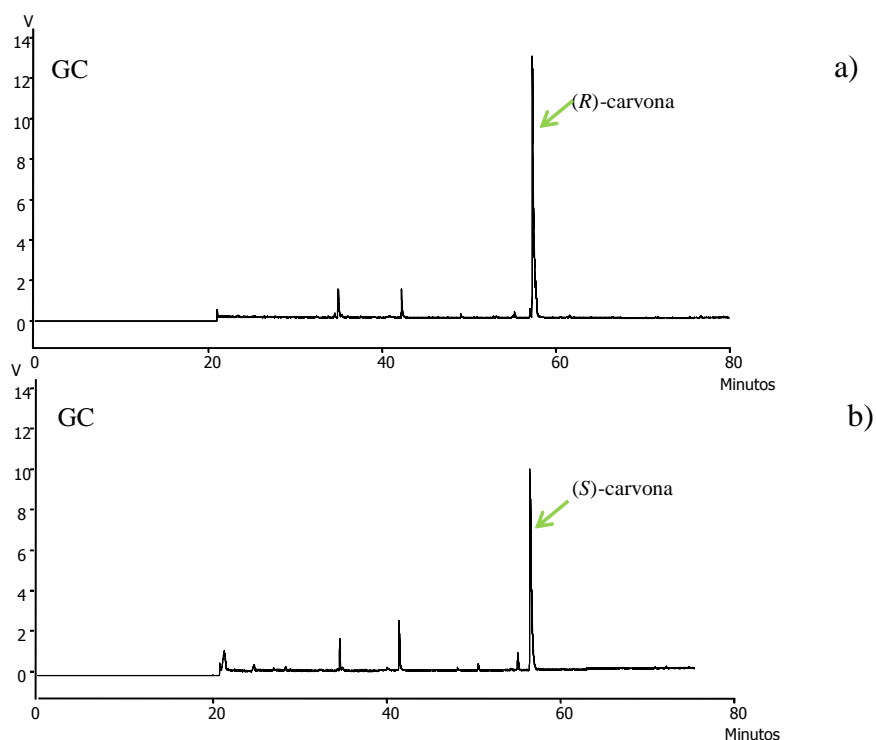


Figura 27: Cromatograma obtenido mediante RPLC-GC-MS de a) *Mentha spicata*; b) *Carum carvi*.

Así mismo, la versatilidad de la técnica permite realizar la transferencia de fracciones estrechas obteniendo cromatogramas más sencillos que los resultantes cuando se lleva a cabo una transferencia de una fracción muy ancha. En la Figura 28 se muestran seis fracciones transferidas a la segunda dimensión de la muestra del aceite esencial de *Anethum graveolens* (20 μ l/6 ml de *n*-hexano).

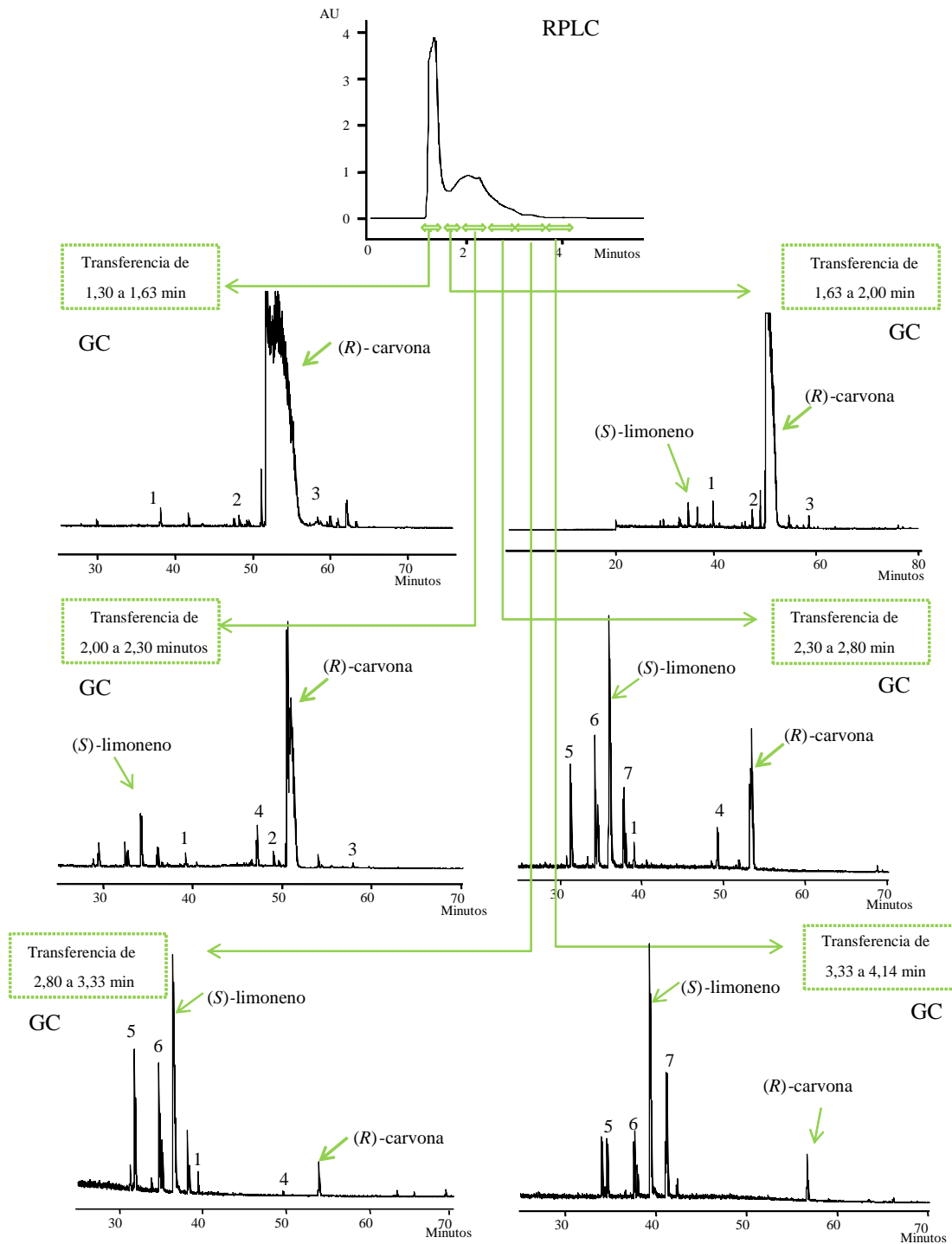


Figura 28: Cromatogramas obtenidos mediante RPLC-GC-MS de *Anethum graveolens*. Identificación: 1: 1,8-cineol, 2: isopulegona, 3: (Z)-jasmonato de metilo, 4: (Z)-isovalerato de 3-hexenilo, 5: mirceno, 6: β -ocimeno, 7: γ -terpineno.

3.2.2. Separación de enantiómeros en muestras complejas reales mediante MDGC-MS

Las muestras escogidas para realizar el estudio fueron el aceite esencial de *Menta piperita* y el aceite esencial obtenido de la semilla de *Carum carvi*. Además, se disponía de la planta (hojas) y de las semillas con las que previamente se habían obtenido los correspondientes aceites esenciales. Los racematos de limoneno y carvona se inyectaron inicialmente en la precolumna del equipo de MDGC para determinar los parámetros cromatográficos relativos a su retención en la primera dimensión. A partir de los datos obtenidos, se establecieron las fracciones que se debían transferir a la columna principal. Para ello, fue necesario optimizar las presiones requeridas para actuar sobre la válvula *Deans*, de manera que el compuesto o compuestos de interés fueran transferidos completamente a la segunda dimensión. El hecho de que en los cromatogramas resultantes se pudiera comprobar que los picos de los racematos de limoneno y carvona no solapaban en la segunda dimensión permitió establecer la viabilidad de transferir varios cortes en un mismo análisis, estimando en todo momento el riesgo de coelución con algún componente de la muestra real que se pretendía analizar posteriormente. Una vez optimizada la transferencia, se realizó el análisis por MDGC-MS de la muestra real compleja.

En las Figuras 29a y 30a se muestran los cromatogramas obtenidos en la precolumna y la columna principal de los aceites esenciales de *Mentha piperita* y *Carum carvi*, respectivamente. Se indican los cortes realizados en la primera dimensión. Es evidente que, también en este caso, el hecho de transferir a la segunda columna únicamente aquellas fracciones previamente seleccionadas por contener los compuestos de interés redundaba en beneficio de la simplicidad de los cromatogramas obtenidos y, en consecuencia, en la mayor fiabilidad de los datos relativos a los excesos enantioméricos de los compuestos volátiles quirales estudiados.

El potencial de la MDGC para lograr resoluciones enantioméricas satisfactorias en muestras complejas y, por consiguiente, su adecuación para seleccionar fuentes naturales alternativas de enantiómeros puros queda especialmente de manifiesto en los análisis que se han realizado tanto a partir del aceite esencial como de la introducción directa de la correspondiente planta (hojas o semillas) en el interior del *glass-liner* para

su posterior desorción en el interior del inyector. No hay que olvidar que la posibilidad de realizar una introducción directa permite comprobar la variación de la composición enantiomérica tras el agresivo proceso, en cuanto a temperatura se refiere, de la preparación del aceite esencial. Aunque la inyección directa con diversos procedimientos, bien mediante la introducción en el *glass-liner*, bien vía PTV-PTV, para el análisis de compuestos quirales ya se ha descrito anteriormente (Reglero y col., 1989; Caja y Herraiz, 2009), no sucede lo mismo para la determinación de compuestos volátiles quirales.

En las Figuras 29b y 30b se incluyen los cromatogramas obtenidos en la precolumna y la columna principal de la muestra introducida directamente en el *glass-liner*, de *Mentha piperita* y *Carum carvi*, respectivamente. Es de destacar el hecho de que el exceso enantiomérico no varía, sustancialmente, en ningún caso (Tabla 9).

Todos los análisis se hicieron por triplicado. El RSD calculado para el (*S*)-limoneno, (*S*)-carvona, (*R*)-limoneno y (*R*)-carvona es 6,8%, 8,9%, 3,1% y 5,6%, respectivamente. Sin embargo, para los análisis realizados introduciendo la muestra directamente en el interior del *glass-liner*, el RSD es de 10% para el compuesto (*R*)-carvona de las hojas de *Mentha piperita*. No es de extrañar la mayor desviación estándar relativa en el caso de la inyección directa, aunque se intentó, mediante molienda, homogeneizar el material a analizar en cada caso.

Tabla 9: Excesos enantioméricos obtenidos a partir del aceite esencial y de hojas o semillas introducidas directamente en MDGC

	ee (%) (<i>R</i>)-limoneno	ee(%) (<i>R</i>)-carvona
<i>Mentha piperita</i>	9	100
<i>Carum carvi</i>	18	0
(hojas) <i>Mentha piperita</i>	0	100
(semillas) <i>Carum carvi</i>	11	0

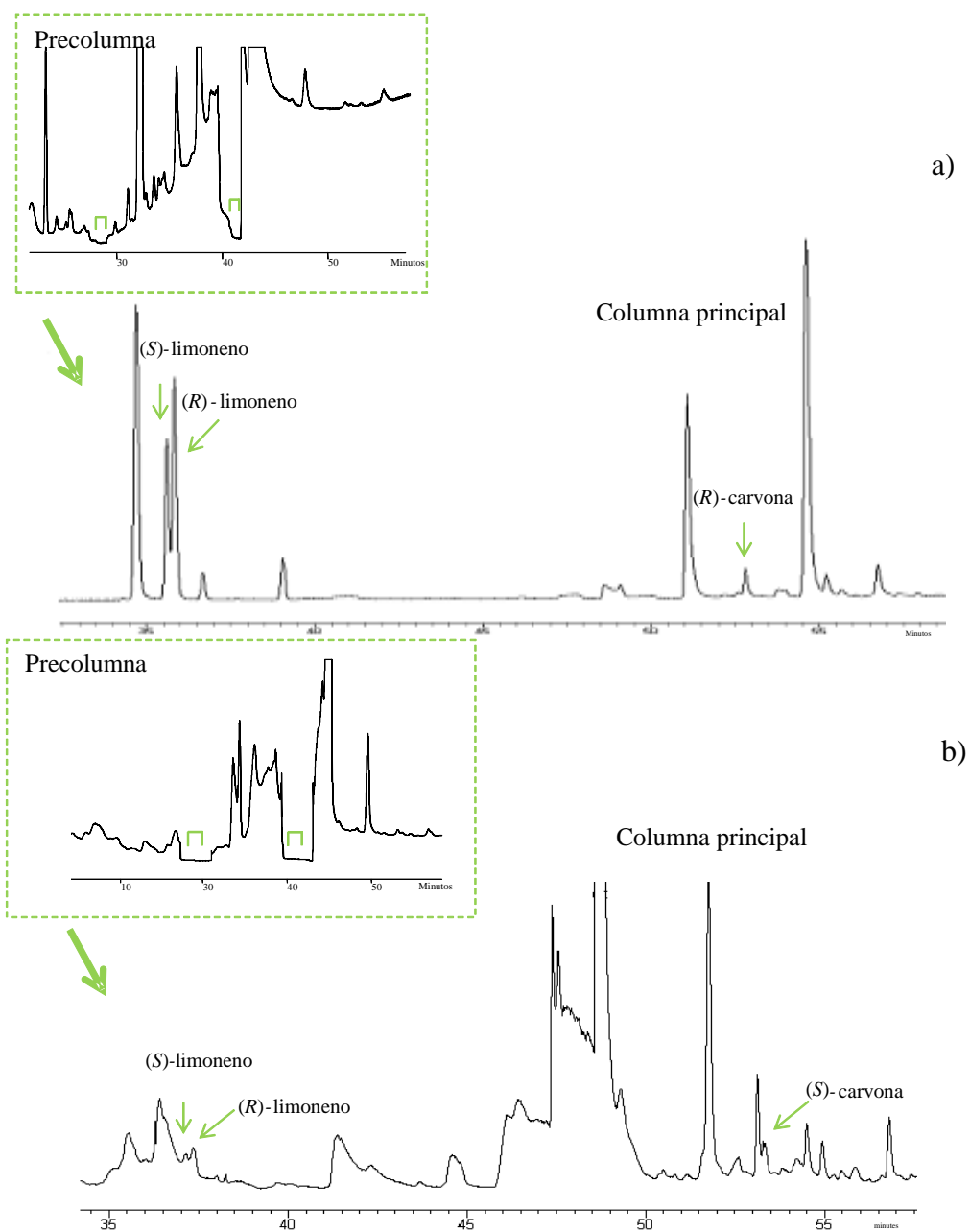


Figura 29: Cromatogramas obtenidos mediante MDGC-MS del análisis de: a) aceite esencial de *Mentha piperita*; b) introducción directa de hojas de *Mentha piperita* en el glass-liner.

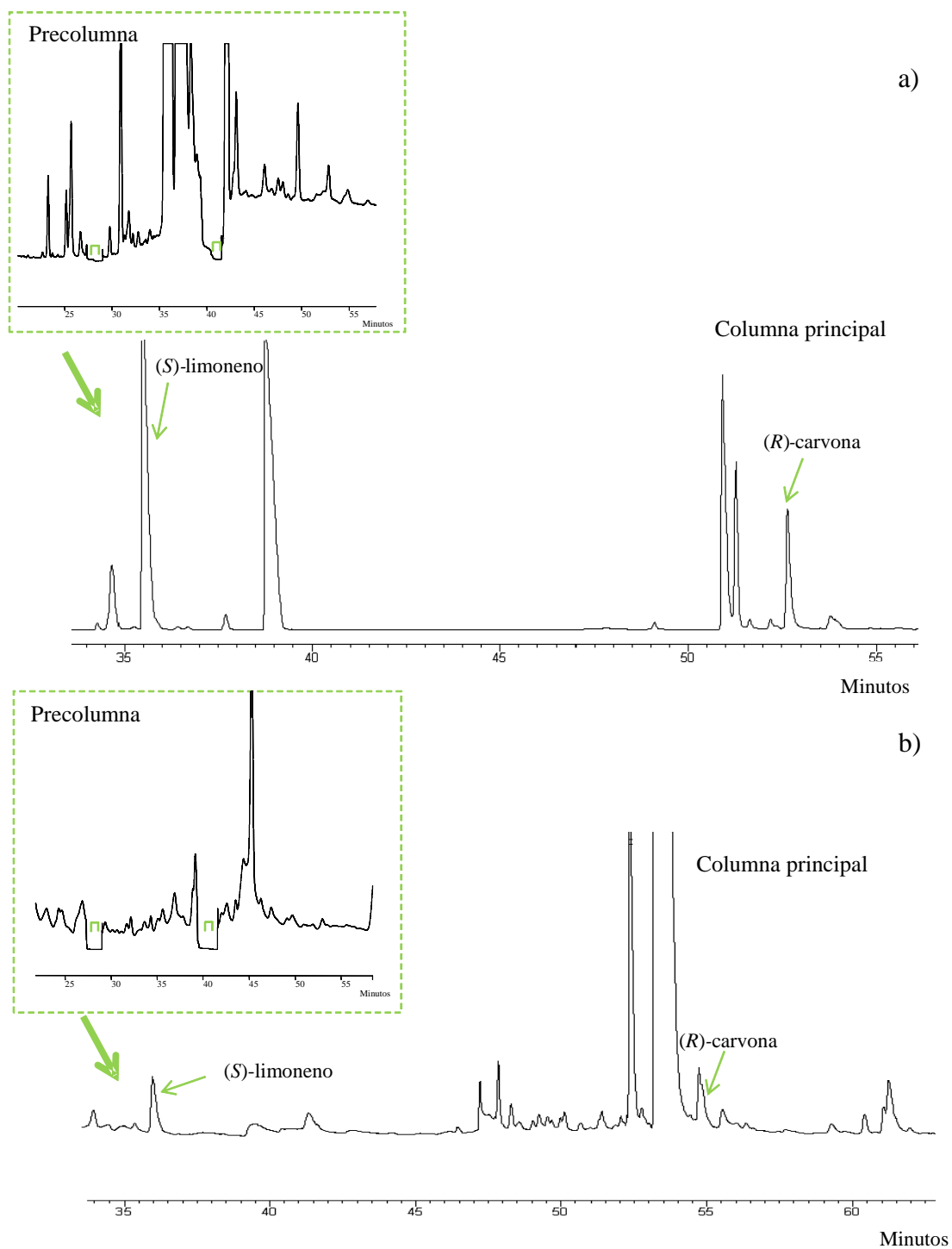


Figura 30: Cromatogramas obtenidos mediante MDGC-MS del análisis de: a) aceite esencial de *Carum carvi*; b) introducción directa de semillas de *Carum carvi* en el *glass-liner*.

3.2.3. Comparación de excesos enantioméricos de compuestos volátiles quirales en muestras complejas

Puesto que a lo largo de los dos apartados anteriores se destaca la versatilidad y complementariedad de las dos técnicas multidimensionales empleadas, a continuación se muestra en la Tabla 10 los excesos enantioméricos del limoneno y carvona obtenidos en los análisis realizados, para los distintos aceites esenciales, con cada una de las técnicas. Como se puede comprobar, los resultados alcanzados son similares con ambas técnicas, por lo que se puede afirmar que tanto una como otra pueden evitar la racemización durante el análisis de compuestos quirales.

Tabla 10: Comparación de excesos enantioméricos obtenidos mediante RPLC-GC-MS y MDGC-MS

	ee (%) (<i>R</i>)-limoneno		ee (%) (<i>R</i>)-carvona	
	LC-GC-MS	MDGC-MS	LC-GC-MS	MDGC-MS
<i>Mentha spicata</i>	0	0	100	100
<i>Mentha crispa</i>	0	0	100	100
<i>Anethum graveolens</i>	17	38	100	n.d.
<i>Menta piperita</i>	0	0	0	100
<i>Carum carvi</i>	22	18	n.d.	0

3.3. Diseño y construcción de la planta SF-SMB

3.3.1. Condiciones previas para el diseño de la planta de SF-SMB

Para realizar el diseño de la planta de SF-SMB se tuvieron en cuenta una serie de consideraciones previas, con objeto de establecer los requisitos necesarios para cumplir con las exigencias del proceso. También se planteó un protocolo de operación que permitiera trabajar automáticamente y de manera segura. Los requisitos mencionados se resumen en los siguientes puntos:

a. Simulación del movimiento del lecho

El sistema debe disponer de una serie de columnas, de modo que cada una de ellas tenga su salida unida a la entrada de la siguiente. Además, cada una de estas columnas debe estar conectada a un sistema de válvulas que, en cualquier momento del proceso, debe permitir la introducción de la mezcla (muestra) a separar o la del eluyente, o bien la recogida de fracciones (extracto o refinado) correspondientes a los compuestos más o menos retenidos, respectivamente.

b. Empleo de CO₂ en condiciones supercríticas como fase móvil

El uso de CO₂ en condiciones supercríticas como fase móvil supone que todos los elementos del sistema deban soportar altas presiones y moderadas temperaturas. Contemplando este requisito será posible que, mediante la modulación de estas variables de presión y temperatura, se optimice el poder de solvatación del fluido. El CO₂ en condiciones supercríticas ejerce un papel de especial importancia, ya que participa en las asociaciones moleculares *quasi* diastereoméricas que son responsables de la discriminación quiral y, en consecuencia, de la resolución de un racemato. Por tanto, mediante el uso en este trabajo de un fluido en condiciones supercríticas se pretenden lograr mayores interacciones moleculares estereoselectivas que con los disolventes tradicionales, ya que se necesita provocar cambios conformacionales favorables para el reconocimiento quiral. De esta forma, se consideró previsible que la

separación de los correspondientes complejos diastereoméricos facilite finalmente la resolución enantiomérica.

c. Relleno de las columnas cromatográficas

Las columnas deben ser módulos versátiles, de modo que se adecuen a las necesidades del proceso y que se pueda introducir en ellas el relleno preparado en el laboratorio o bien instalar columnas comerciales. En este sentido, se consideró conveniente la posibilidad de trabajar con diferentes longitudes de columna, ya que ello facilitará, en la práctica, la optimización de su eficacia (altura equivalente a un plato teórico, H y número de platos teóricos, N).

d. Automatización del sistema

El sistema debe poder manejarse desde un ordenador, de manera que las etapas del proceso se realicen cíclicamente una vez programadas las sesiones de trabajo. Igualmente, deberá ser posible que el proceso evolucione con unos periodos de tiempo y eventos prefijados previamente.

e. Seguridad de la planta piloto

La planta de SF-SMB debe ser un sistema seguro y debe cumplir con todas las normas de seguridad que requiere un sistema sometido a altas presiones.

Sobre la base de las consideraciones enumeradas se diseñó el diagrama que se muestra en la Figura 31.

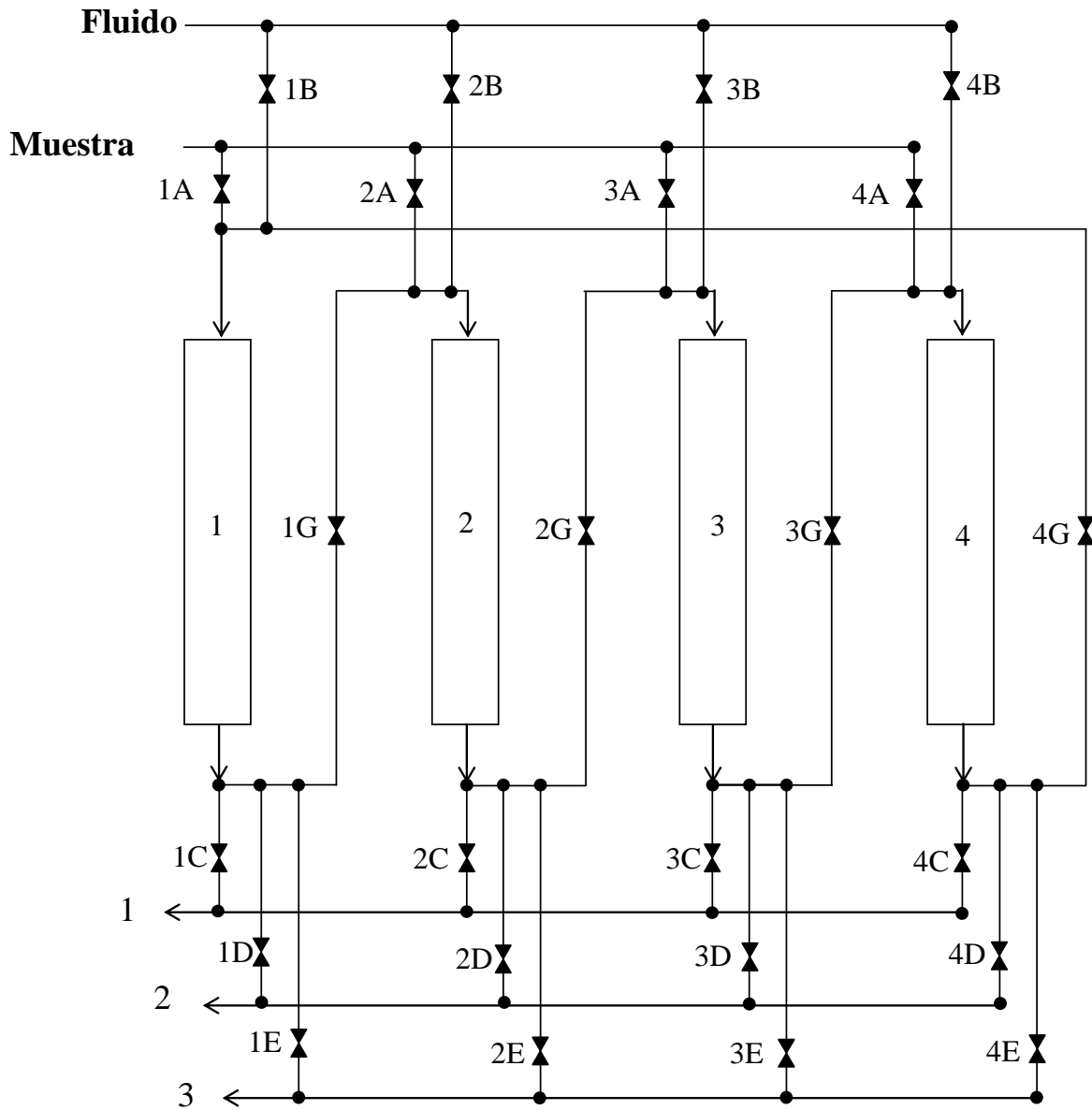


Figura 31: Diagrama del equipo de SF-SMB que se propone construir. Incluye cuatro unidades de lecho o columnas (representadas por los rectángulos identificados como 1, 2, 3 y 4) y veinticuatro válvulas que permiten el control del movimiento de los fluidos (eluyente y muestra), así como la salida de los compuestos de interés. Todas las columnas disponen de tres entradas y cuatro salidas. Las válvulas **B** controlan la distribución del eluyente (fluido supercrítico). Las válvulas **A** y **G** controlan la distribución de la muestra y la comunicación entre las columnas, respectivamente. Las válvulas **C** y **E** controlan las salidas de los compuestos a separar (1 y 3) y las válvulas **D** controlan la salida de un tercer componente (2) o de la fracción que incluya el resto de los componentes en el caso de partir de muestras complejas.

3.3.2. Optimización del diseño de la planta de SF-SMB

Al comenzar la construcción de la planta de SF-SMB según el diseño inicial (Figura 31), se constató la conveniencia de tomar ciertas decisiones en relación con la adecuación y robustez de su sistema de automatización. En este sentido, se estimó necesario sustituir algunas de las válvulas del diseño inicial por otras más fiables (multivías), así como utilizar sistemas de posicionamiento microelectrónico para las válvulas de control de las columnas.

En concreto, el citado diseño de la Figura 31 incluye un total de veinticuatro válvulas cuya apertura y cierre habría permitido introducir corrientes por distintos puntos del sistema, pero a expensas de exigir un modo de operación tedioso y laborioso. Adicionalmente, era previsible que su automatización pudiera haber resultado altamente afectada por la gran probabilidad existente de fallo en el proceso.

Por las razones expuestas, se decidió proyectar un nuevo diseño con el que se pretendía, fundamentalmente, simplificar el inicialmente propuesto y, en definitiva, facilitar su completa automatización, así como reducir su coste económico.

El sistema así diseñado, que se muestra en la Figura 32 y que ha sido finalmente el utilizado para la construcción de la planta, consta de varias válvulas multivía que permiten conmutar el punto de alimentación y extracción de las corrientes implicadas en el proceso con unos determinados tiempos programados para que se produzca la separación deseada. Un aspecto importante a destacar en relación con los resultados obtenidos en este contexto es que el empleo de dichas válvulas ha facilitado la automatización del proceso y ha simplificado sensiblemente su diseño.

Por otra parte, y con el fin de que no se produzcan condensaciones en posibles puntos fríos del sistema, se estimó conveniente instalar tanto las columnas y las válvulas multivía como el resto de válvulas en el interior de un horno. Específicamente, se ha utilizado un sistema de calefacción independiente del de las propias columnas, de forma que cuando los fluidos circulen por zonas del sistema que no sean las columnas, su temperatura no se vea alterada y el proceso se comporte, en una primera aproximación, como un proceso cíclico. Según esto, todas las válvulas deben soportar que su cuerpo

esté calefactado. No obstante, puesto que el objetivo es lograr la separación de enantiómeros y muchos de estos compuestos son termolábiles, no se requieren temperaturas de operación muy elevadas, pudiendo oscilar entre 40 y 70°C. Además, se diseñaron unos recolectores refrigerados para que, en la parte final del proceso, la recolección de productos se realizara en frío.

Una de las modificaciones de mayor trascendencia de las llevadas a cabo sobre el diseño inicial ha sido la implementación de un solo lazo de control capaz de actuar sobre las tres válvulas micrométricas, permitiendo la apertura simultánea de ellas, así como la posibilidad de mantener la presión en el sistema.

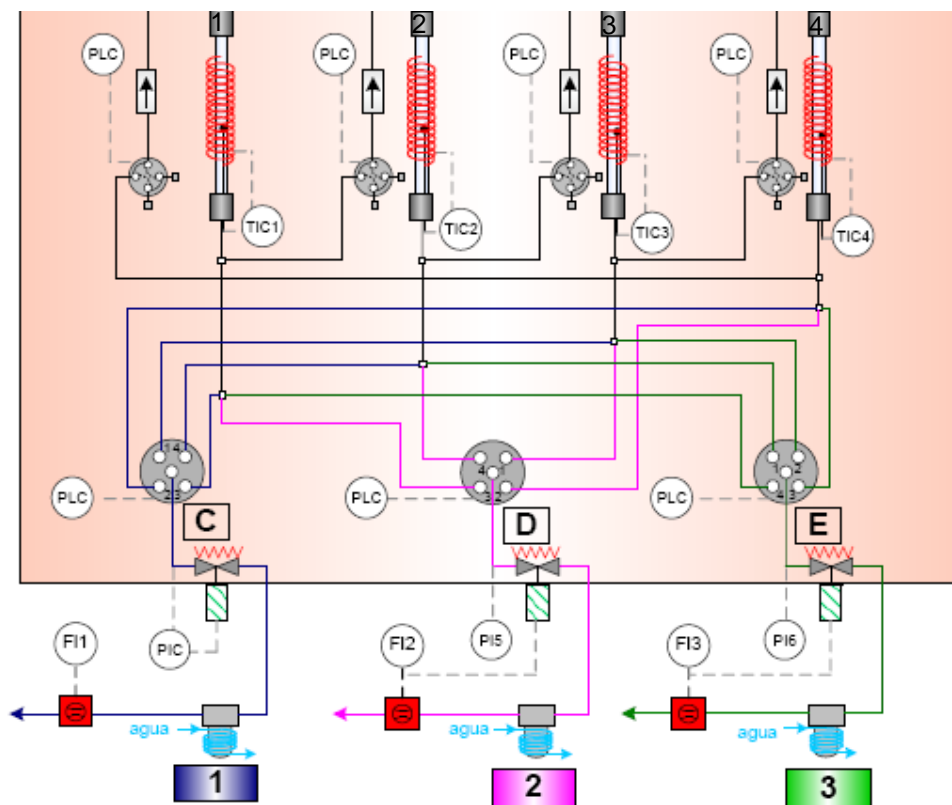


Figura 32: Diagrama de la planta de SF-SMB construida. Las válvulas multivía **A** y **B** controlan la alimentación de la muestra y del eluyente a una determinada columna. Las válvulas multivía **C** y **E** controlan las salidas de los compuestos a separar (**1** y **3**), mientras que la válvula **D** permite la salida de un tercer componente (**2**) o, en su lugar, de la fracción que incluya el resto de los componentes en aquellos casos en los que se parta de mezclas complejas.

3.3.3. Construcción de la planta de SF-SMB

Inicialmente, en la construcción de la planta de SF-SMB se diferenciaron los distintos módulos que integran el equipo. A este respecto, se decidió que cada uno de ellos debía ser lo más simple y modular posible, con objeto de que, en un momento determinado del proceso, fuera factible aislar cada parte del resto. Asimismo, se planteó la importancia de evitar elementos innecesarios que pudieran encarecer la planta o que aumentaran la complejidad de operación del sistema.

Así, la planta finalmente construida consta de varios módulos, válvulas y otros elementos que se enumeran a continuación:

- Módulo de alimentación de eluyente en el que se emplea una bomba de desplazamiento alternativo de pistón que permite introducir el eluyente a presiones elevadas (adecuadas para el empleo del CO₂ en condiciones supercríticas) o bien utilizar otros eluyentes en fase gas, para lo que es necesario disponer de controladores máxicos de flujo.

- Módulo de alimentación de muestras racémicas o complejas que también incluye una bomba de desplazamiento positivo alternativo.

- Módulo de separación o columnas cromatográficas cuyo conjunto constituye el sistema de SMB. El interior de cada una de las columnas dispone de unos tubos con placas porosas de acero sinterizado en cada uno de sus extremos, con el fin de evitar que la fase estacionaria depositada pueda desplazarse al exterior y, como consecuencia, obturar conducciones o válvulas.

- Conjunto de válvulas multivía que, como se ha dicho, permite variar el punto de entrada del eluyente y de la muestra, así como el de salida del extracto y del refinado, en función del requerimiento en cada etapa.

- Otras válvulas para el correcto funcionamiento del sistema SF-SMB.

- Diversos elementos de calefacción que permiten realizar el proceso a distintas temperaturas, horno y otros elementos calefactores. En este sentido, se optó por confinar el conjunto de columnas en una caja caliente para evitar pérdidas caloríficas en las conducciones que comunican la salida de una columna con la entrada de la siguiente.

A continuación, se detallan los dispositivos, instrumentos y elementos principales de cada módulo cuyas características han sido establecidas redefinidas a partir de los resultados obtenidos en el estudio realizado.

3.3.3.1. Módulo de alimentación de eluyente

El dióxido de carbono se alimenta en condiciones supercríticas mediante una bomba dosificadora de líquidos. El abastecimiento de CO₂ se realiza utilizando el gas licuado suministrado en depósitos cilíndricos mantenidos a su presión de vapor, aproximadamente 45 bar (a 10°C) y 70 bar (a 30°C). Un tubo, que desciende hasta la base del recipiente comprimido, permite que el CO₂ fluya al exterior cuando se abre la válvula de cierre situada a la salida del tubo. Además, el equipo está provisto de un sistema que posibilita la adición de un modificador a la corriente de CO₂. El módulo de alimentación consta de:

1. Bomba de alimentación de CO₂ (Dosapro - Milton Roy)

Se trata de una bomba de desplazamiento positivo alternativo de pistón que permite alimentar CO₂ en condiciones supercríticas al sistema. Su presión y caudal máximo de diseño son 390 bar y 3 ml/min, respectivamente. Con el fin de asegurar que el CO₂ se encuentra en estado líquido y evitar la cavitación de la bomba, tanto la conducción por la que circula el CO₂ antes de su paso por la bomba como el cabezal de la misma se refrigeran a -20°C, aproximadamente. Para producir este enfriamiento circula, en dirección opuesta a la entrada de CO₂, un líquido refrigerante, por lo que se logra el intercambio de calor entre este último y el CO₂. La presión en esta línea se controla mediante un manómetro cuyo intervalo de medida es de 0 a 600 bar. Durante la experimentación realizada se puso de manifiesto la conveniencia de sustituir dicha bomba por otra de dosificación de líquidos comprimidos (Gilson) ya que al tener un cabezal más pequeño ofrece mayor precisión en el control de los flujos necesarios para

la operación en SF-SMB. Su presión y caudal máximo de diseño son 600 bar y 5 ml/min, respectivamente.

2. Válvula antirretorno (Swagelok)

Se encuentra situada después de la bomba e impide que el fluido pueda circular en sentido inverso en la línea. La presión máxima de diseño de esta válvula es de 413 bar a una temperatura de 20°C. La línea de CO₂ se conduce hacia un precalentador, de manera que el CO₂ alcance rápidamente, y mantenga durante todo el proceso, las propiedades de fluido supercrítico.

3. Precalentador

Con el fin de precalentar la corriente de CO₂ antes de ser dirigida a las cuatro columnas de separación, en el interior de la caja caliente se situó un evaporador, que consiste en una conducción en espiral, de diámetro externo 1/8", enrollada sobre una resistencia eléctrica de 165 W de potencia. La temperatura máxima de la corriente a la salida del evaporador es de 80°C.

4. Válvula de 4 vías de accionamiento eléctrico (VICI)

El CO₂ pasa a través de una válvula de 4 vías que permite dirigirlo hacia cada una de las cuatro columnas cromatográficas que conforman el sistema. Esta válvula posee un sistema automático de selección de cada una de las vías que se acciona mediante un motor paso a paso. El tiempo de conmutación de las válvulas puede regularse mediante un autómatas programable. La presión máxima de diseño de esta válvula es de 345 bar a una temperatura de 75°C.

3.3.3.2. Módulo de alimentación de muestra

Para permitir la alimentación de una mezcla multicomponente, el sistema consta de los siguientes elementos:

1. Bomba de dosificación de líquidos para alta presión (Gilson)

Se usa una bomba de desplazamiento positivo alternativo que permite alimentar la muestra al sistema. Su presión y caudal máximo de diseño son 600 bar y 5 ml/min, respectivamente.

2. Válvula antirretorno (Swagelok)

Se encuentra situada después de la bomba dosificadora de líquidos e impide que el fluido pueda circular en sentido inverso a lo largo de la línea. La presión máxima de diseño de esta válvula es de 413 bar a una temperatura de 20°C.

3. Precalentador

De la misma forma que se ha señalado anteriormente en relación con la corriente de CO₂ y con el fin de precalentar la corriente de muestra antes de ser dirigida a las columnas de separación, en el interior de la caja caliente se ha situado un evaporador, que consiste en una conducción en espiral de diámetro externo 1/8", enrollada sobre una resistencia eléctrica de 165 W de potencia. La temperatura máxima de la corriente a la salida del evaporador es de 80°C.

4. Válvula de 4 vías de accionamiento eléctrico (VICI)

La muestra pasa a través de una válvula de 4 vías que permite dirigir la corriente hacia cada una de las cuatro columnas cromatográficas cuyas características se describen en el siguiente apartado.

3.3.3.3. Módulo de separación

El módulo de separación consta de:

1. Columnas cromatográficas

Es la zona del sistema en donde tiene lugar la separación. Se trata de cuatro columnas cilíndricas que tienen una longitud de 50 cm y un diámetro interno de 9,12 mm, lo que supone un volumen interno de 32,7 ml en cada una de ellas. La presión máxima de diseño de estas columnas es de 690 bar a una temperatura de 40°C. Como ya se ha indicado, en el interior de cada una de las columnas se colocan dos soportes cilíndricos, con placas porosas de acero sinterizado (con un tamaño de poro de 10 - 20 µm) en cada uno de los extremos, que permiten confinar la fase estacionaria.

El CO₂ en condiciones supercríticas y la muestra líquida se introducen, a través de las válvulas multivía, por la parte superior de cada una de las columnas, mientras que la salida de los productos tiene lugar por la parte inferior de la columna. En el cuerpo de cada columna se encuentra enrollada una resistencia eléctrica, de 1400 W de potencia y de 427 mm de longitud, que proporciona la energía calorífica suficiente para que se alcance la temperatura necesaria para la separación.

No obstante, el equipo permite adaptar columnas preparativas comerciales de diferentes dimensiones lo que hace que sea muy versátil. En concreto, se han instalado cuatro columnas comerciales (Nucleodex-β-CD-per-Me de dimensiones 250 mm x 10 mm) cuya temperatura está controlada mediante unas camisas calefactoras recubiertas de silicona.

A la entrada y salida de cada columna se dispone de cuatro transductores de presión para comprobar la pérdida de carga en el sistema.

2. Caja caliente

Es un horno de convección forzada que permite termostatar la operación. La temperatura que puede soportar la caja es elevada, pero está condicionada por la máxima temperatura que toleran las válvulas multivía que es 75°C. Las dimensiones de la caja son: 850 mm de altura, 650 mm de anchura y 250 mm de profundidad. Para mantener la temperatura constante en todos los puntos del horno hay un ventilador centrífugo que origina una convección forzada. El calefactor está constituido por una pieza de acero con múltiples huecos de 6,25 mm de diámetro, donde se introducen cuatro cartuchos calefactores de 125 W cada uno.

3. Válvula de 4 vías neumáticas (VICI)

Se dispone de cuatro válvulas neumáticas, posicionadas entre las columnas cromatográficas, que tienen como función regular la circulación de la muestra y la del eluyente. La presión máxima de diseño es de 345 bar a 75°C. A continuación de cada válvula neumática se sitúa una válvula antirretorno, con los parámetros de diseño descritos anteriormente. Las cuatro válvulas neumáticas son activadas mediante la apertura de una electroválvula de aire comprimido que, a su vez, está controlada por un autómatas programable (denominado PLC en la Figura 32).

4. Válvula de 4 vías de accionamiento eléctrico (VICI)

Estas válvulas, de características iguales a las ya descritas anteriormente, dirigen los analitos hacia los depósitos de separación, al ser conmutadas mediante un PLC.

5. Válvulas de regulación de caudal servomotorizadas (Hoke)

Estas válvulas controlan la presión a la entrada de los recolectores (depósitos en los que se recogen los productos separados en el proceso, según se detalla posteriormente). Constan de tres válvulas de aguja, con regulación de microcaudal de alta precisión, actuadas mediante un servomotor que controla su apertura. La presión de trabajo de la línea de salida situada inmediatamente después de dichas válvulas es la atmosférica. La presión y temperatura máxima que soportan las válvulas es de 345 bar y 232°C,

respectivamente. Además, estas válvulas están calefactadas a 80°C, con el fin de evitar la formación de nieve carbónica debido a la expansión adiabática que se produce al pasar la corriente a través de ellas.

6. Recolectores

La salida de la mezcla de reacción se recoge en tres depósitos de aluminio, denominados recolectores, con un volumen de 20 ml cada uno de ellos. Están dotados de una conducción de acero enrollada en espiral por la que puede circular agua o un líquido refrigerante para enfriar su interior y, de esta forma, facilitar la recogida a baja temperatura de los productos separados.

7. Medidores de flujo

A la salida de los recolectores se sitúan unos medidores que permiten no solo controlar el flujo de salida de las tres válvulas, sino también comprobar que su valor coincida en los tres casos. Ello es posible mediante un lazo de control dispuesto a tal efecto.

3.3.4. Control y automatismo de la planta de SF-SMB

Se ha desarrollado un sistema SCADA con lazos de control independientes para cada variable que incluyen controladores tipo PID. También es posible configurar valores de alarma y se dispone de comunicaciones digitales con el ordenador que forma parte del sistema SCADA. El equipo puede manejarse indistintamente desde el cuadro de control o desde el ordenador central. Es posible programar las etapas que forman los ciclos, de manera que el proceso se realice automáticamente con tiempos y eventos prefijados. Además, el sistema realiza la adquisición de datos de todas las variables del proceso.

En resumen, las variables de proceso se adquieren, supervisan y controlan mediante una serie de lazos de control y cada uno de ellos consta de distintos sensores, detectores y transductores adecuados para realizar la medida. Los lazos de control implementados son los siguientes:

1. Lazo de control de caudal de mezcla relativa (QIC en la Figura 32)

Es un lazo de control abierto en el que el punto de consigna se establece en la propia bomba Gilson ya que ésta es programable. La bomba proporciona un caudal (variable de proceso) en función de dicho punto de consigna.

2. Lazo de control de caudal de eluyente (VF1 en la Figura 32)

El caudal de CO₂ proporcionado por la bomba Gilson suministra un caudal en función del punto de consigna.

3. Lazo de control de temperatura (TIC_n en la Figura 32)

Su finalidad es regular la temperatura en las columnas y en las corrientes de alimentación (eluyente y muestra). Existen 7 controles de temperatura en el equipo. En todos ellos puede describirse el modo de operación del lazo de control de la siguiente forma: se mide la temperatura mediante un termopar tipo K cuya señal se transmite hasta un controlador PID. En función del punto de consigna, este controlador genera una señal de 4/20 mA que varía la potencia suministrada, bien a las resistencias, eléctricas o bien a los cartuchos calefactores.

Los lazos de control de temperatura instalados son:

- TIC₁, TIC₂, TIC₃, TIC₄ para regular la temperatura de las 4 columnas.
- TIC₅ para regular la temperatura de la caja caliente.
- TIC₆ para regular la temperatura de la muestra introducida en el sistema.
- TIC₇ para regular la temperatura del eluyente (CO₂ en condiciones supercríticas).

4. Lazo de control de presión (PIC en la Figura 32)

Existe un controlador de presión situado a la entrada de uno de los recolectores. El control de presión se realiza mediante una válvula de regulación de microcaudal que permite regular el flujo de fluido que pasa a su través. La mayor o menor apertura de

dicha válvula es establecida mediante un *driver* que controla la posición de un motor paso a paso (lazo PPIC). Esta apertura es enviada como consigna a las otras dos válvulas de regulación de microcaudal por lo que la apertura de las tres válvulas es la misma. El procedimiento para controlar la presión se resume de la siguiente forma:

- La señal procedente de un transductor de presión (4/20 mA) es leída por un controlador PID que compara la presión medida con el valor del punto de consigna, enviando una señal (función del error obtenido) al *driver*.
- El *driver* compara la señal recibida (4/20 mA) con la procedente de un transductor de posición acoplado al eje del motor que, a su vez, es regulado con el eje de la válvula.
- El *driver* posiciona, en función del error obtenido, el motor paso a paso con el fin de regular el eje de la válvula.
- La señal de flujo de salida es medida mediante un medidor de flujo másico y dicha señal es enviada, como punto de consigna, a las otras dos válvulas de regulación de microcaudal.

Este sistema de automatización y control reúne una serie de características y funcionalidades requeridas por la planta de SF-SMB que se describen a continuación:

- Definición de experimentos sucesivos mediante ejecución de etapas consecutivas.
- Ejecución automática de experimentos.
- Adquisición de variables y supervisión de su evolución.
- Gestión de interacción con el proceso físico que incluye la adquisición de datos y el envío de acciones de control, así como la gestión de alarmas.
- Configuración de los componentes de software y hardware. Permite establecer de forma sencilla todos los parámetros del sistema, prefijando los relativos a la comunicación digital, los puntos de consigna, parámetros de control de los lazos de control y límites de alarma.

3.3.5. Sistema de seguridad de la planta de SF-SMB

Al trabajar con altas presiones es de especial importancia la seguridad de la planta de SF-SMB. Por esta razón, el equipo incorpora un sistema de control de presión (lazo PIC en la Figura 32) en el que se ha establecido en 310 bar el valor de alarma. Este valor actúa interrumpiendo tanto la alimentación de CO₂ como la de muestra, en aquellas ocasiones en las que el valor de consigna pueda exceder al umbral fijado. Además, se ha instalado un disco de ruptura (372 - 427 bar) a la salida de la bomba de CO₂ que permite liberar la presión en el caso de que se produzca un fallo electrónico.

3.3.6. Puesta a punto de la planta de SF-SMB

3.3.6.1. Estanqueidad

Puesto que el sistema trabaja a altas presiones, se ha controlado de forma continuada la estanqueidad del mismo, tanto a lo largo del período de construcción de la planta como durante la puesta en marcha y uso del equipo ya construido. Con este objeto, se presuriza la planta a 170 bar y se comprueba durante 60 minutos si existe alguna fuga. Como se observa en la Figura 33, el resultado de la prueba es favorable cuando el sistema permanece a la presión establecida sin observarse en ningún momento su disminución.

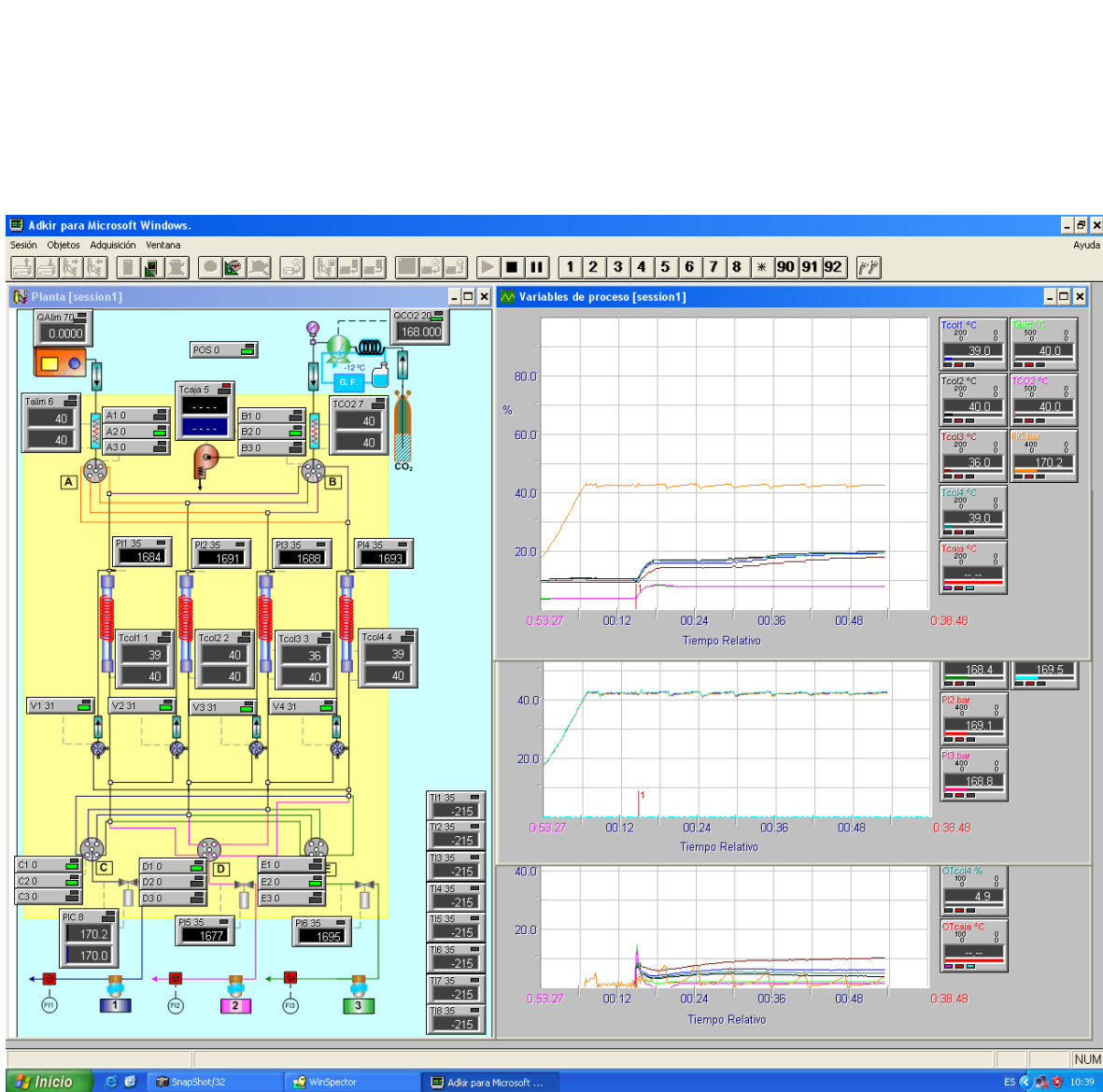


Figura 33: Resultado de una prueba de estanqueidad realizada a 170 bar durante 60 minutos con la planta de SF-SMB (Registro presión: línea de color naranja).

3.3.6.2. Simulación del movimiento del lecho

Se resume a continuación el procedimiento que corresponde a la resolución de una mezcla mediante un sistema de cuatro columnas en la configuración 1-1-1-1, es decir, con una columna en cada una de las cuatro zonas de que consta el sistema, como corresponde a la planta cuyo diseño y construcción ha sido uno de los objetivos del trabajo descrito en esta *Memoria*. En este caso concreto, cada uno de los ciclos a realizar incluye cuatro etapas, según se detalla en la Figura 34.

La continuidad del proceso exige que cada una de las cuatro columnas pueda permitir alternativamente la alimentación de la muestra, o la salida del refinado (es decir, del compuesto menos retenido en la fase estacionaria del sistema), o la alimentación del eluyente, o la salida del extracto (compuesto más retenido). Estas diferentes funciones se establecen a tiempos determinados, de modo que conmutando las correspondientes válvulas se logre completar tantos ciclos como sean requeridos para una separación concreta.

En el caso de que la alimentación de muestra se realice entre las columnas 2 y 3 (como se indica en la primera etapa representada tanto en la ya citada Figura 34 como en la Figura 35), es evidente que si una conmutación de las válvulas del sistema permite llevar a cabo esa misma función entre las columnas 3 y 4 (etapa 2, Figura 34) y, posteriormente, entre las columnas 4 y 1 (etapa 3, Figura 34) y, a continuación, entre las columnas 1 y 2 (etapa 4, Figura 34), se logra lo que podríamos denominar un efecto de retroceso de la fase estacionaria. En otras palabras, se simula el movimiento del lecho estacionario porque si consideramos una referencia concreta (como puede ser, precisamente, la entrada de muestra), se puede observar que la fase estacionaria se desplaza aparentemente en sentido contrario al de circulación del eluyente. El procedimiento descrito permite, por tanto, realizar un proceso en contracorriente y en continuo con el que, completando el número total de ciclos requeridos en cada caso, se llega a obtener, a escala preparativa y totalmente separados, los dos compuestos integrantes de la mezcla de partida.

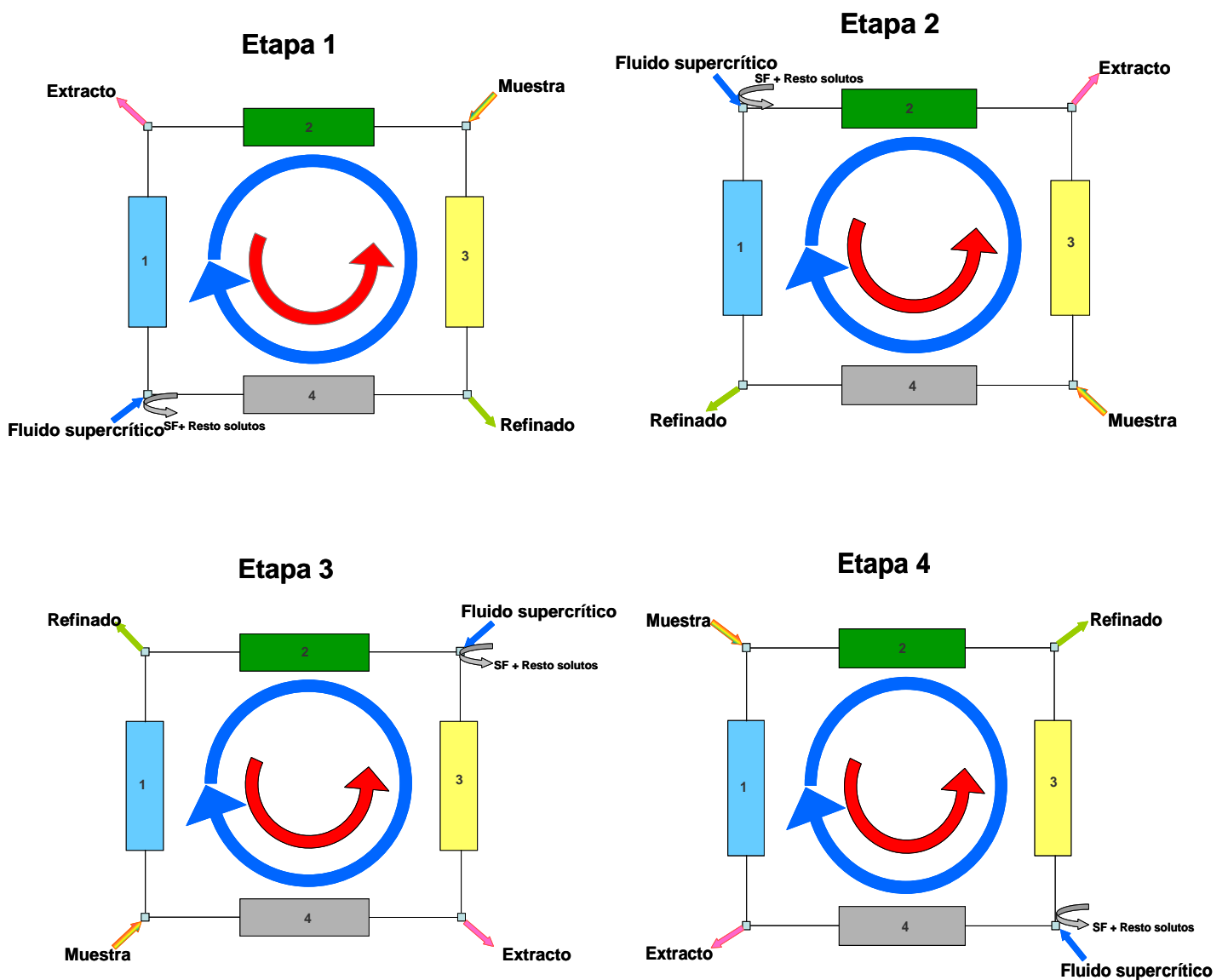


Figura 34: Separación de una mezcla mediante cromatografía en lecho móvil simulado (SMB) utilizando un sistema de cuatro columnas situadas en cuatro zonas diferenciadas (configuración 1-1-1-1). Se muestra la modificación secuencial de las posiciones de la muestra, extracto, refinado, fluido supercrítico y resto de solutos en las cuatro etapas que completan un ciclo. El fluido supercrítico es el eluyente, el extracto es el compuesto más retenido y el refinado es el compuesto menos retenido. Las flechas curvas indican los sentidos opuestos en los que circula el eluyente (azul) y se simula el movimiento del lecho (rojo).

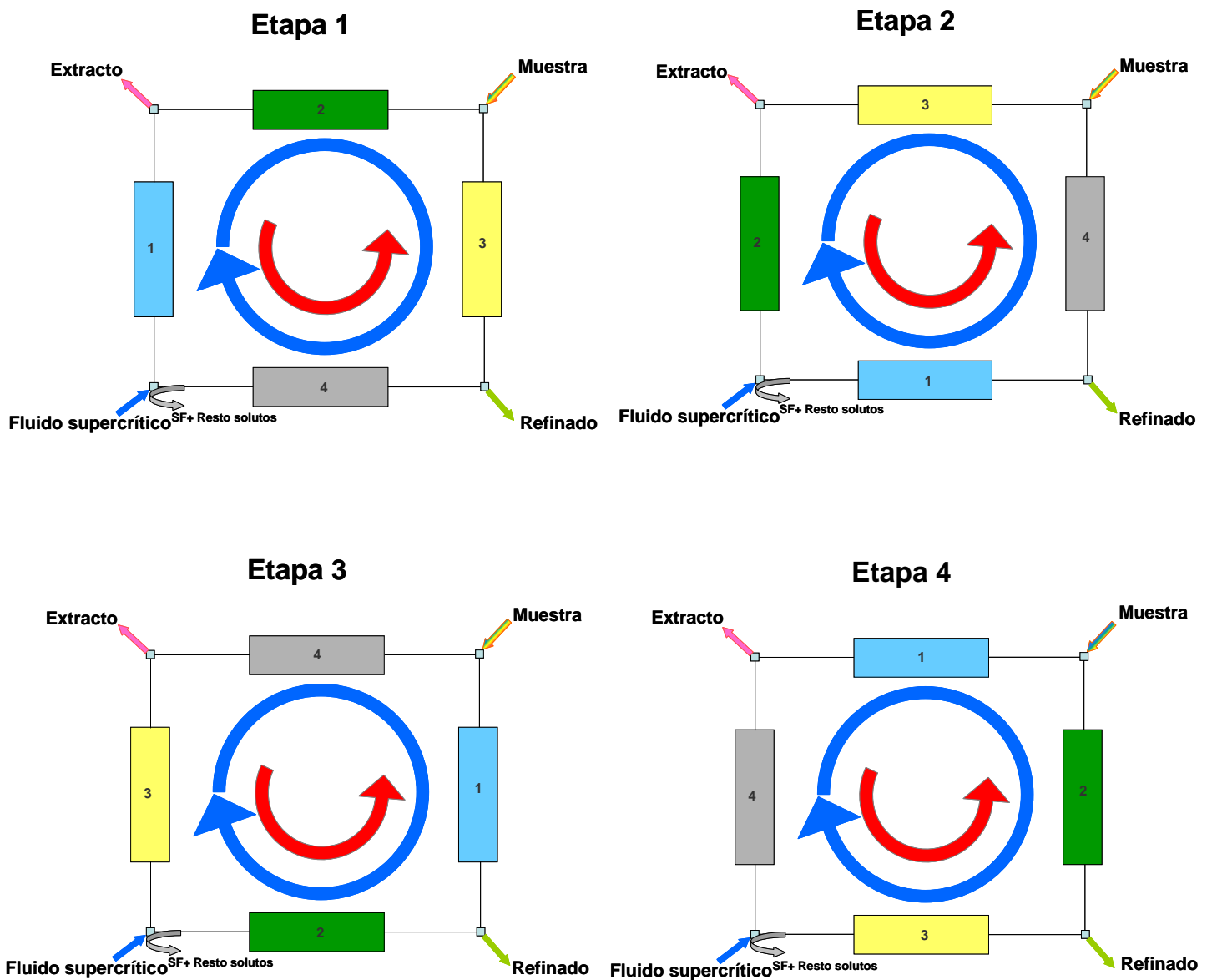


Figura 35: Separación de una mezcla mediante cromatografía en lecho móvil simulado (SMB) utilizando un sistema de cuatro columnas situadas en cuatro zonas diferenciadas (configuración 1-1-1-1). Se muestra la simulación del movimiento del lecho, en relación con una posición fija (por ejemplo, la entrada de muestra), en las cuatro etapas que completan un ciclo. El fluido supercrítico es el eluyente, el extracto es el compuesto más retenido y el refinado es el compuesto menos retenido. Las flechas curvas indican los sentidos opuestos en los que circula el eluyente (azul) y se simula el movimiento del lecho (rojo).

Con objeto de comprobar el correcto funcionamiento de los parámetros de control de presión, temperatura y movimiento de las válvulas, así como de las bombas de inyección de muestra y fase móvil (CO₂ en condiciones supercríticas), se planificaron una serie de pruebas para realizar el proceso detallado anteriormente y representado en las ya citadas Figuras 34 y 35. Concretamente, se programaron una serie de sesiones para simular las etapas de un ciclo, manteniendo las columnas cromatográficas (módulo de separación) sin relleno.

Así, el proceso consta de una primera fase de acondicionamiento del sistema y, posteriormente, de cuatro etapas que se repiten hasta completar dos ciclos. A continuación, se describe el procedimiento y se detallan los parámetros experimentales establecidos en cada caso.

Acondicionamiento del sistema

La planta piloto de SF-SMB se calienta a 30°C (columnas y caja) y, seguidamente, se aumenta la presión hasta alcanzar 170 bar en todo el sistema. Para ello, se introduce CO₂ en fase líquida, empleando la bomba Dosapro, con un caudal de 3 ml/min, manteniendo la cabeza refrigerada para garantizar que el eluyente esté en estado líquido. Las válvulas de aguja de microcaudal (C, D y E en la Figura 32) regulan la presión a 170 bar mediante un servomotor que controla su apertura y cierre.

Etapas 1: Inicio del proceso de SF-SMB

Una vez que el sistema alcanza las condiciones de presión y temperatura deseadas, se inicia el proceso en lecho móvil simulado. La muestra se introduce en el sistema, con un flujo de 3 ml/min, mediante la bomba Gilson. En la primera etapa del proceso cromatográfico, la muestra se introduce por la columna 3 y el fluido por la columna 1. Las válvulas neumáticas entre columnas se mantienen abiertas, excepto la que comunica la columna 4 con la columna 1. Las válvulas reguladoras de la presión del sistema (C, D y E en la Figura 32) están conectadas a las columnas 1, 3 y 4, respectivamente.

Etapa 2: Conmutación de válvulas multivía

En la segunda etapa del proceso cromatográfico, el CO₂ en condiciones supercríticas se introduce por la columna 2 y la muestra por la 4. Las válvulas neumáticas entre las columnas se mantienen abiertas, excepto la que conecta la columna 1 con la columna 2. Las válvulas reguladoras C, D y E están conectadas a las columnas 2, 4 y 1, respectivamente.

Etapa 3: Conmutación de válvulas multivía

En la tercera etapa del proceso cromatográfico, el CO₂ en condiciones supercríticas se introduce por la columna 3 y la muestra por la 1. Las válvulas neumáticas entre las columnas se mantienen abiertas, excepto la que conecta la columna 2 con la columna 3. Las válvulas reguladoras C, D y E están conectadas a las columnas 3, 1 y 2, respectivamente.

Etapa 4: Conmutación de válvulas multivía

En la cuarta etapa del proceso cromatográfico, el CO₂ en condiciones supercríticas se introduce por la columna 4 y la muestra por la 2. Las válvulas neumáticas entre las columnas se mantienen abiertas, excepto la que conecta la columna 3 con la columna 4. Las válvulas reguladoras C, D y E están conectadas a las columnas 4, 2 y 3, respectivamente. El final de la etapa 4 completa un ciclo y da paso al segundo, que comienza con la etapa 1, de manera que el proceso continúa hasta completar un número de ciclos determinado en cada separación concreta.

Como se muestra en la Figura 36, la planta de SF-SMB diseñada y construida permite que tanto las variables de proceso como las de su control se regulen correctamente. El proceso, además, se puede realizar de forma totalmente automatizada, operando con un número determinado de ciclos completos incluyendo cuatro etapas cada uno de ellos.

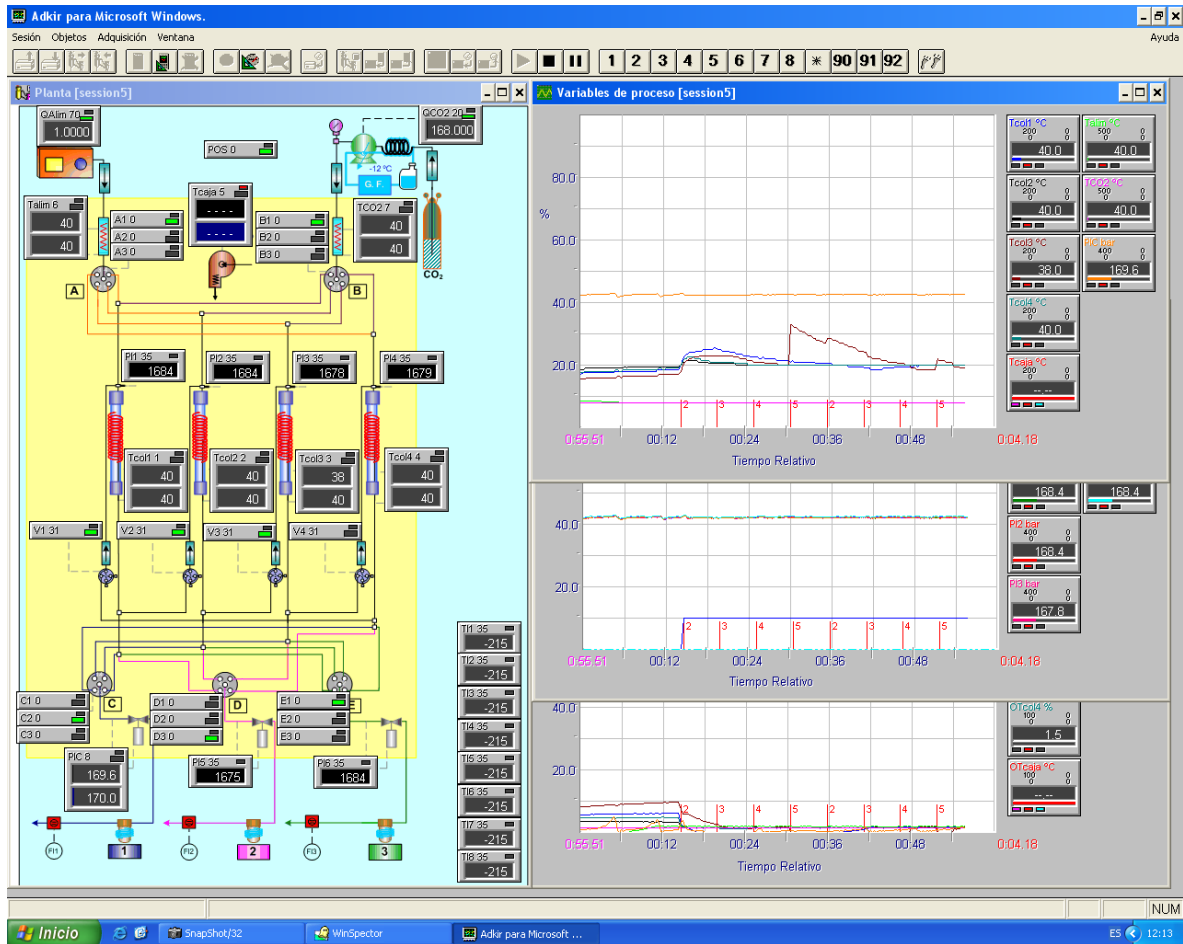


Figura 36: Prueba realizada programando las etapas de un ciclo de SF-SMB para el control del funcionamiento de los parámetros del proceso: presión, temperatura, funcionamiento de las válvulas, bombas de introducción de muestra y fase móvil.

3.3.7. Prototipo de SF-SMB

A continuación, se muestran unas fotografías realizadas durante el proceso de construcción del equipo de SF-SMB (Figura 37), así como la planta tras su construcción (Figura 38) y la planta tal y como se encuentra en la actualidad (Figura 39). Con esta última configuración es con la que se han llevado a cabo las aplicaciones descritas posteriormente.



Figura 37: Aspecto de la planta de SF-SMB en distintas etapas de su construcción. 1. caja caliente; 2. precalentador; 3. columna cromatográfica; 4. recolectores; 5. válvulas de regulación de caudal servomotorizadas; 6. válvulas de cuatro vías de accionamiento eléctrico; 7. válvulas neumáticas.



Figura 38: Planta piloto de SF-SMB cuyo diseño y construcción ha sido uno de los objetivos del trabajo descrito en la presente *Memoria*.



Figura 39: Aspecto de la planta de SF-SMB en la actualidad.

3.3.8. Protocolo

Para la puesta en funcionamiento del equipo se debe encender todas las partes eléctricas del mismo. Una vez el horno cromatográfico alcanza la temperatura deseada, se enciende la bomba Gilson que impulsa el CO₂ al caudal máximo de la bomba (5 ml/min) para que se mantenga a la presión deseada en el menor tiempo posible. Alcanzado el régimen, se baja el caudal de manera que éste sea el mínimo posible, pero que la presión no disminuya. No se ha de olvidar que, para las dimensiones de las columnas empleadas, el flujo debe ser aproximadamente de 20 ml/min. Estabilizado el sistema, se impulsa el modificador generalmente metanol con la bomba Gilson. El porcentaje de modificador debe ser siempre inferior al 5% para evitar un sistema bifásico, ya que ello complicaría significativamente el proceso cromatográfico. Posteriormente, se añade la muestra a la concentración deseada y se activa la programación del método establecido con el número de ciclos, así como el tiempo de conmutación de las válvulas necesarias para un correcto funcionamiento del sistema.

3.3.9. Parada

La parada del sistema se realiza mediante el apagado de las dos bombas empleadas. La despresurización debe realizarse lentamente para no afectar al lecho de las columnas empacadas. De la misma forma, la temperatura del sistema debe disminuir hasta alcanzar la atmosférica, hecho que se acelera con el proceso de despresurización. Una vez el equipo quede a presión y temperatura atmosféricas se apaga todo el sistema eléctrico de la planta.

3.3.10. Mantenimiento

Una correcta limpieza de la planta es esencial para la fiabilidad en los resultados obtenidos. Aunque la limpieza no es compleja, debido a que el CO₂ no recircula sino que se elimina (*open-loop*), debe realizarse manteniendo la planta en las condiciones de análisis durante, al menos, el tiempo de duración de una experiencia para asegurarse de que el equipo queda completamente vacío de analitos o trazas de compuestos de análisis anteriores.

3.3.11. Análisis realizados con la planta de SF-SMB

Se describe en este apartado la puesta a punto de la planta diseñada y construida de cromatografía en lecho móvil simulado empleando solo una columna, de manera que se puede considerar que trabaja como un cromatógrafo de fluidos supercríticos.

Por otra parte, los datos obtenidos con la columna Nucleodex- β -CD-per-Me de dimensiones 250 mm x 10 mm permitieron completar el estudio del reconocimiento quiral de la heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina en cromatografía de gases (apartado 3.1.2.), líquidos (apartado 3.1.3) y fluidos supercríticos (apartado 3.1.4) con determinados compuestos volátiles quirales.

Pese a que, evidentemente, el funcionamiento del sistema con una sola columna es menos complejo que con cuatro columnas como es el caso cuando funciona con simulación del movimiento del lecho, es igualmente fundamental, como paso previo, optimizar una serie de variables implicadas en el proceso. Una de ellas es el flujo de CO₂ a la salida de la columna, ya que al trabajar con alta presión debe controlarse cuidadosamente para que no supere los aproximadamente 20 ml/min con los que habitualmente se trabaja en SFC. Para ello, se implementaron una serie de modificaciones en el equipo que pretendían adaptar la planta diseñada a las nuevas necesidades. Se sustituyó la bomba Milton Roy por una bomba Gilson, como ya se ha mencionado anteriormente, con cabezal más pequeño, lo que ha permitido lograr una mejora sustancial en el control del flujo de CO₂ introducido en la columna. Además, se instalaron medidores de flujo másico de 100 ml/min adecuados para las nuevas condiciones de trabajo. Debido al hecho de que la regulación, tanto del flujo como de la presión, se realiza mediante una válvula de aguja, el cero de la misma debe ajustarse con suma precisión y de manera sistemática. Por otra parte, y puesto que en este caso concreto la inyección de muestra no es continua, fue preciso instalar en la planta una válvula provista de un *loop* de 20 μ l para facilitar la introducción de muestra en el sistema.

La presión a la que se llevaron a cabo los análisis fue 100 y 150 bar y el sistema se mantuvo a 40°C. Al no disponer de detector en la planta de SF-SMB, se decidió tomar muestras cada medio minuto para, posteriormente, inyectarlas en GC o HPLC

aplicando los métodos optimizados en los apartados 2.3 y 2.4 de *Resultados y discusión*. En la Figura 40 se muestran los cromatogramas obtenidos inyectando, mediante HPLC, las fracciones recogidas una vez transcurridos 42, 44 y 46 minutos (registros en color negro, azul y rojo, respectivamente) desde el inicio del análisis de α -pineno y manteniendo una presión de 100 bar y 40°C de temperatura, con un flujo de CO₂ de, aproximadamente, 20 ml/min y 5% de metanol que, a la vez de tener el racemato disuelto, actuaba como modificador. Se observa que los excesos enantioméricos van variando, según la fracción recolectada, a lo largo del tiempo. En último término, mediante la separación con SFC se obtuvieron fracciones enriquecidas en el enantiómero menos retenido en la columna.

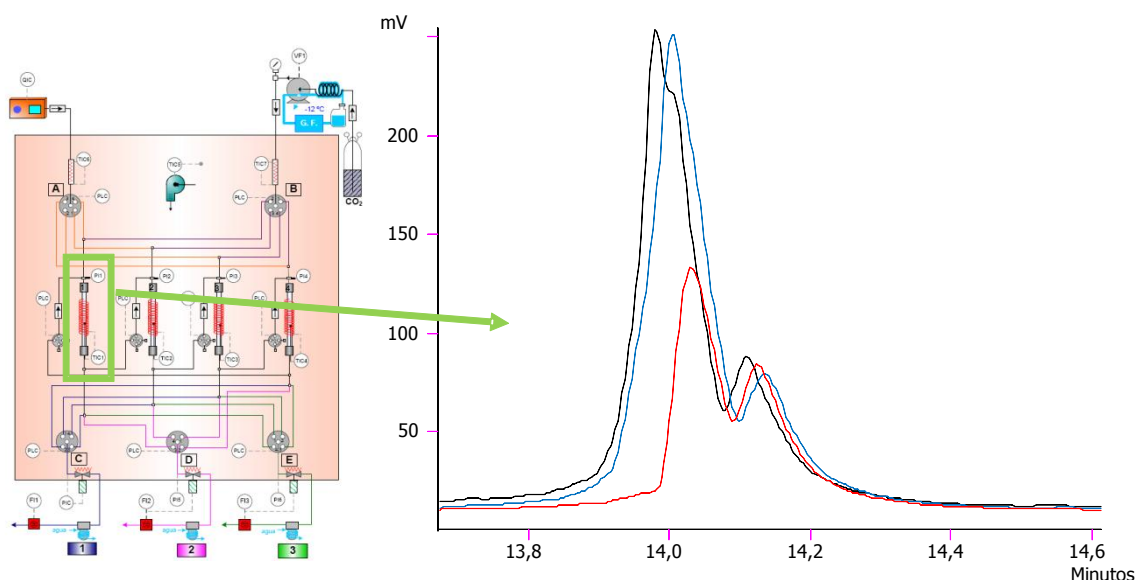


Figura 40: Resoluciones enantioméricas en el análisis de (*R,S*)- α -pineno en la planta de SF-SMB utilizando una columna. Fase estacionaria: heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina; Fase móvil: CO₂ en condiciones supercríticas.

Por lo tanto, se puede suponer que si con una única columna se consiguieron los resultados mencionados, el empleo de cuatro columnas rellenas con el mismo selector quirral, junto con la simulación del movimiento del lecho, debe necesariamente permitir separar enantiómeros de compuestos volátiles quirales a escala preparativa utilizando un fluido supercrítico como fase móvil.

En resumen, los resultados obtenidos han permitido demostrar no solo la viabilidad de la planta de SF-SMB específicamente diseñada y construida para lograr la consecución de los objetivos planteados, sino también su necesidad para mejorar las resoluciones enantioméricas alcanzadas para los compuestos volátiles quirales objeto de estudio. De hecho, estos resultados demuestran la obligatoriedad de recurrir a un proceso continuo y en contracorriente como medio más adecuado de conseguir la separación de enantiómeros puros a escala preparativa.

Considerando las características específicas del diseño inicial de la planta SF-SMB; las modificaciones que, según se ha detallado a lo largo de la *Memoria*, ha sido preciso incorporar; la adecuación del sistema de control y adquisición de datos para automatizar la ejecución del proceso; los numerosos ensayos realizados para optimizar los parámetros que afectan al funcionamiento de los controladores PID integrados en la planta; las observaciones relativas a la influencia de distintos parámetros cromatográficos en la enantioselectividad del sistema; y el efecto del poder de solvatación de la fase móvil empleada en la discriminación quirral apreciada en cada caso ha sido finalmente posible establecer la metodología a seguir para simular el movimiento del lecho mediante el cambio secuencial y continuo de la zona (o columna) por la que se debe introducir la muestra, así como para conmutar simultáneamente las válvulas que permiten la entrada del dióxido de carbono y la recuperación de los compuestos separados a través de las tres salidas habilitadas a este efecto.

En las Figuras 41 - 46 se muestran algunas de las sesiones programadas para ejecutar las cuatro etapas que incluye cada uno de los ciclos sucesivos cuya definición ha posibilitado el estudio realizado. En concreto, se ha establecido la repetición sucesiva de varios ciclos completos antes de lanzar la Sesión 99 (Figura 46) que se programa como sesión de seguridad para permitir la despresurización del sistema y la parada del proceso.

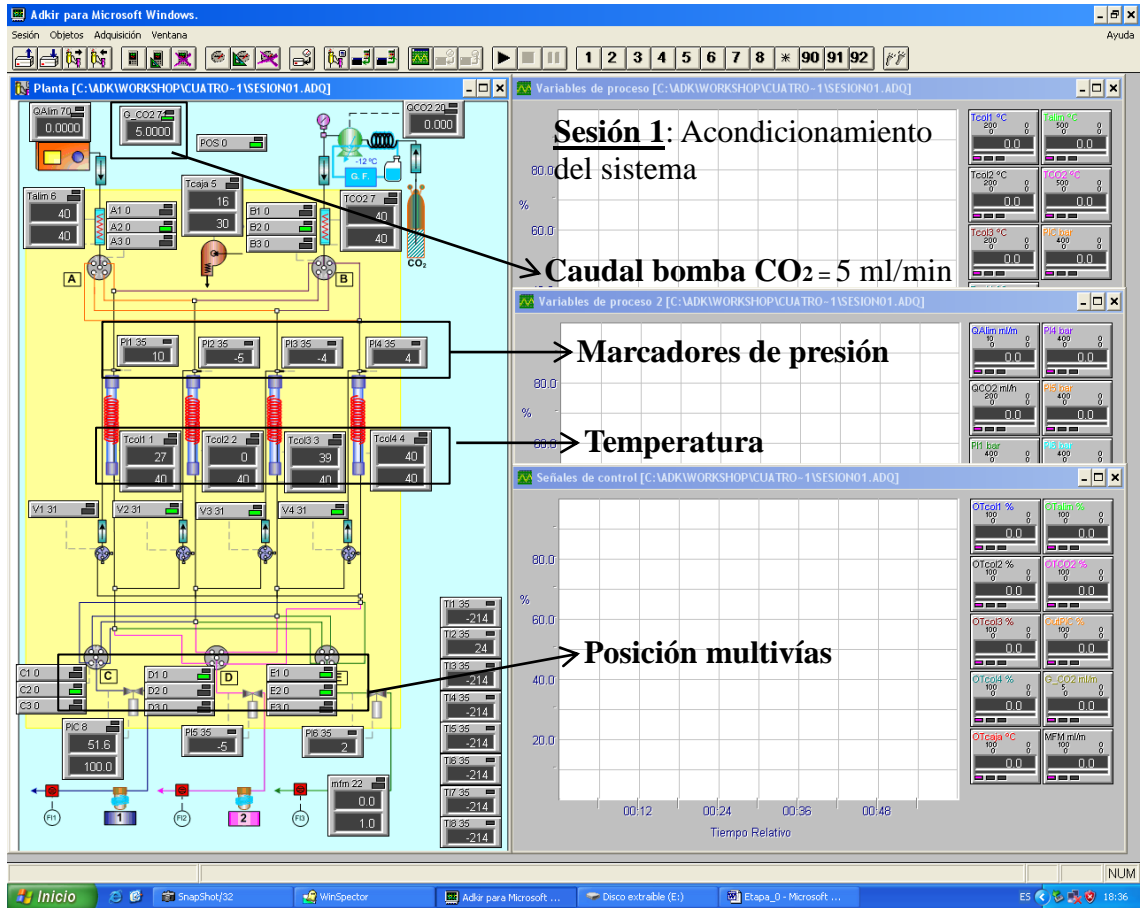


Figura 41: Modo de operación del proceso de SF-SMB. Acondicionamiento del sistema.

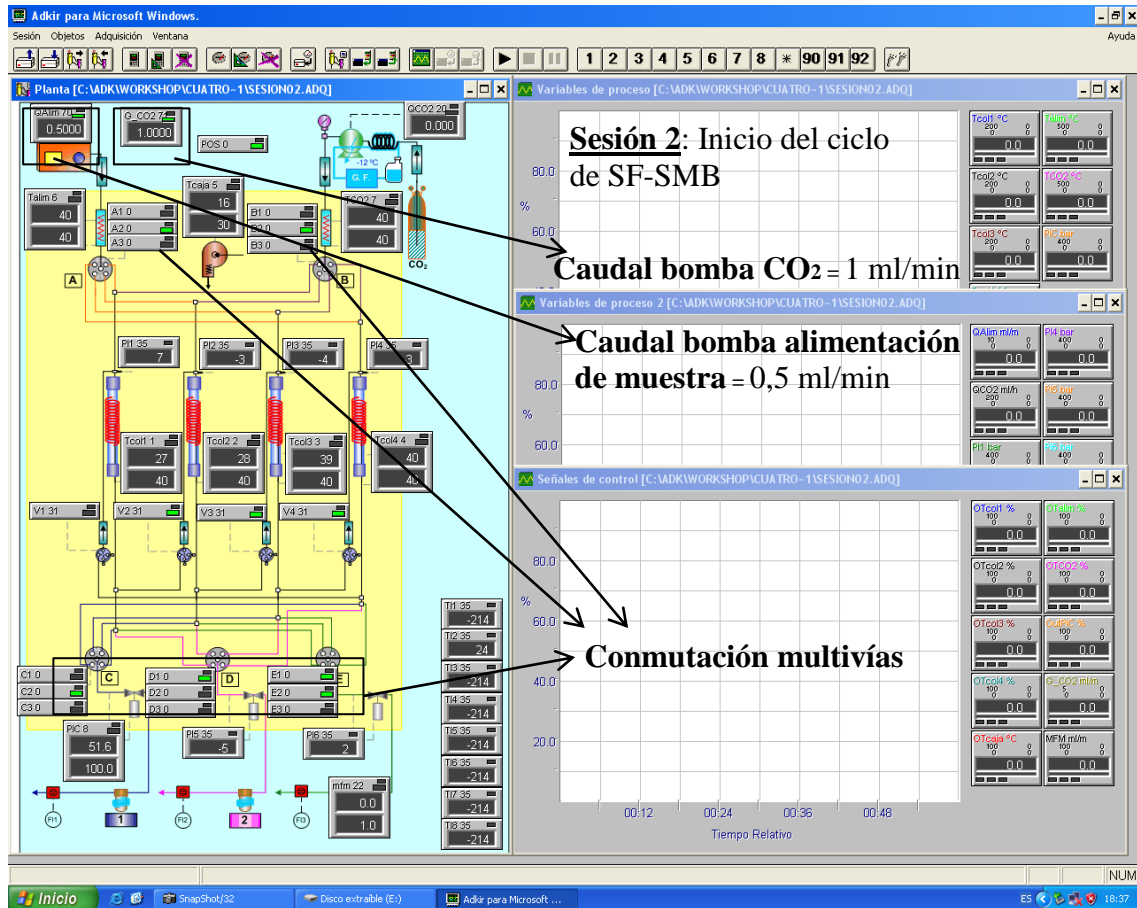


Figura 42: Modo de operación del proceso de SF-SMB. Etapa 1.

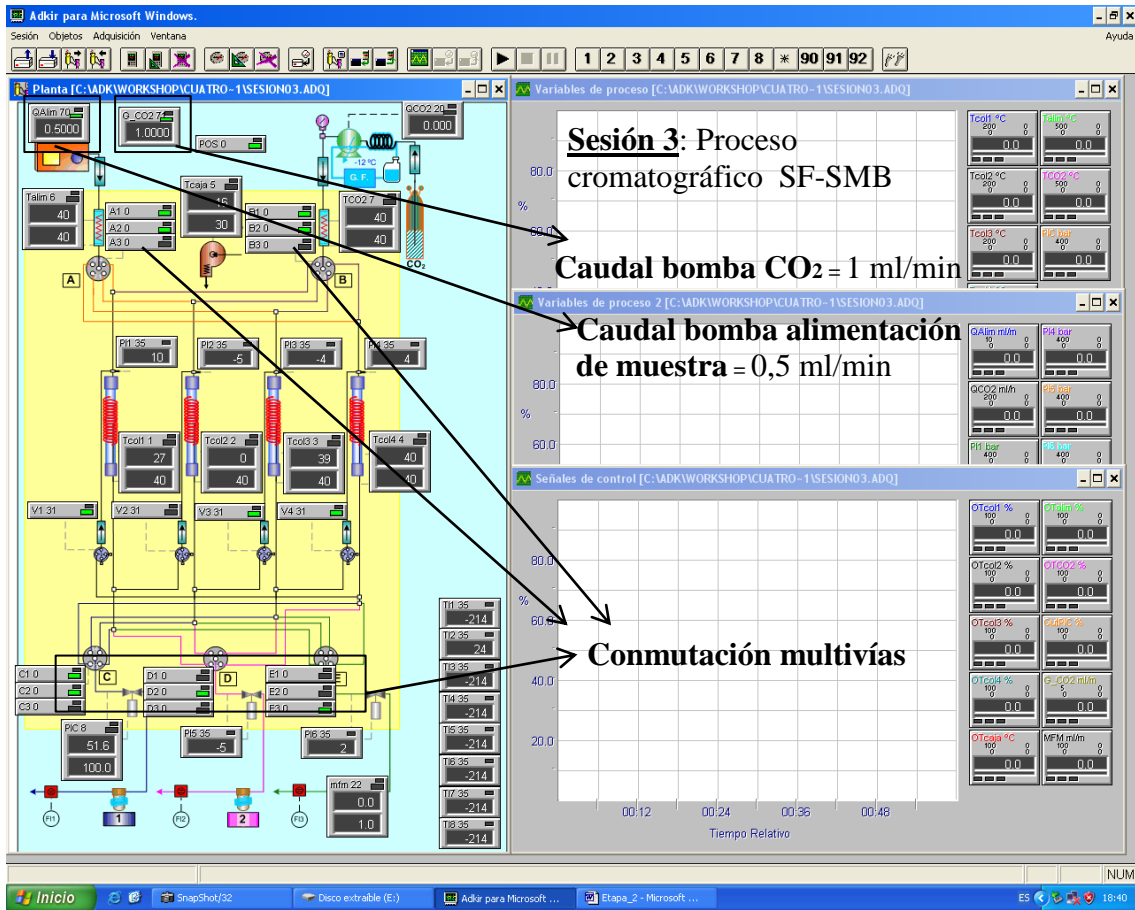


Figura 43: Modo de operación del proceso de SF-SMB. Etapa 2.

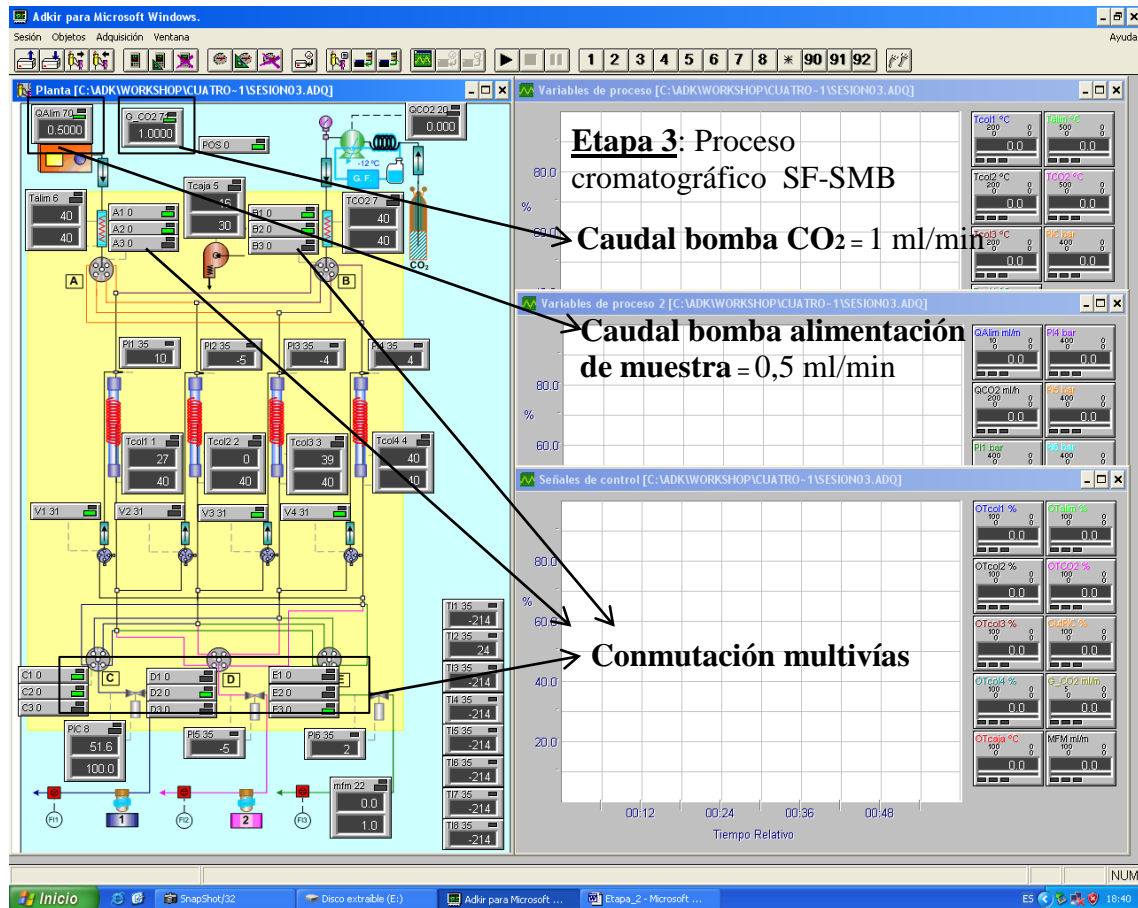


Figura 44: Modo de operación del proceso de SF-SMB. Etapa 3.

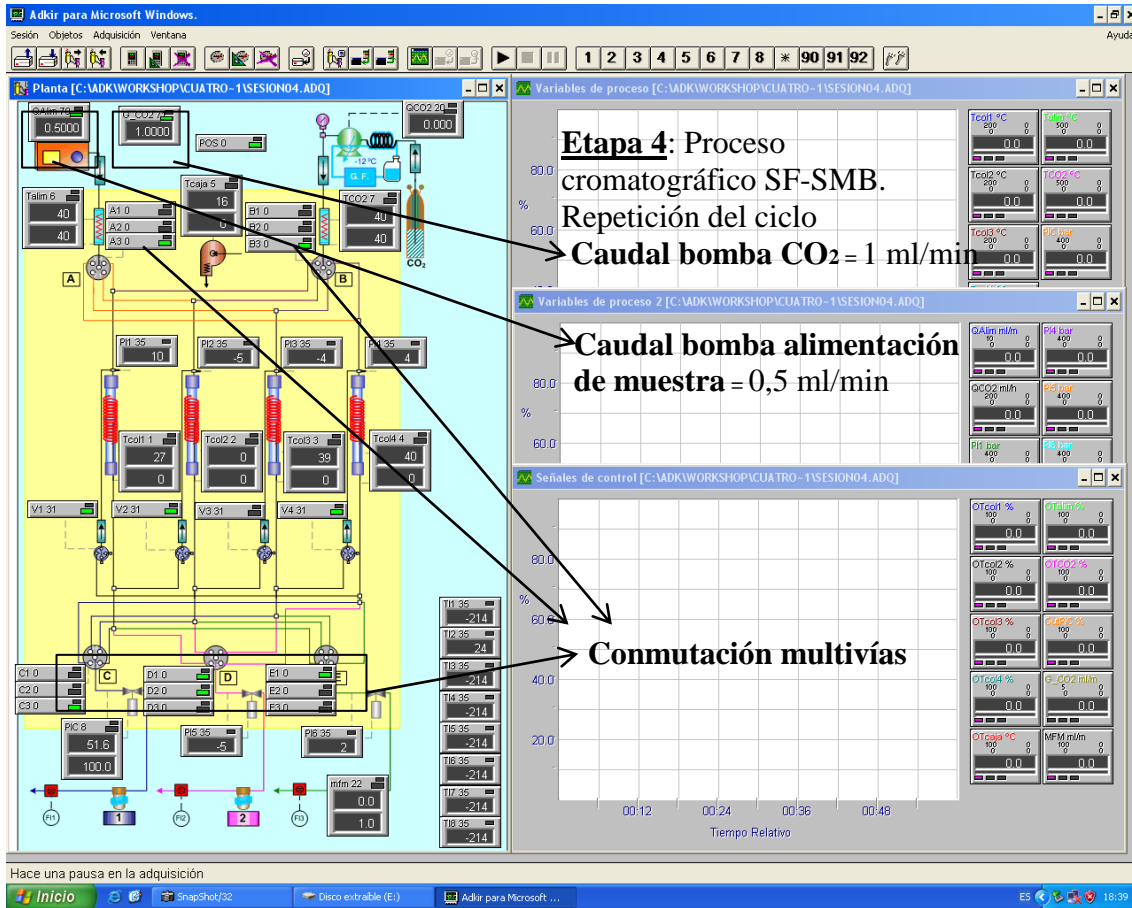


Figura 45: Modo de operación del proceso de SF-SMB. Etapa 4.

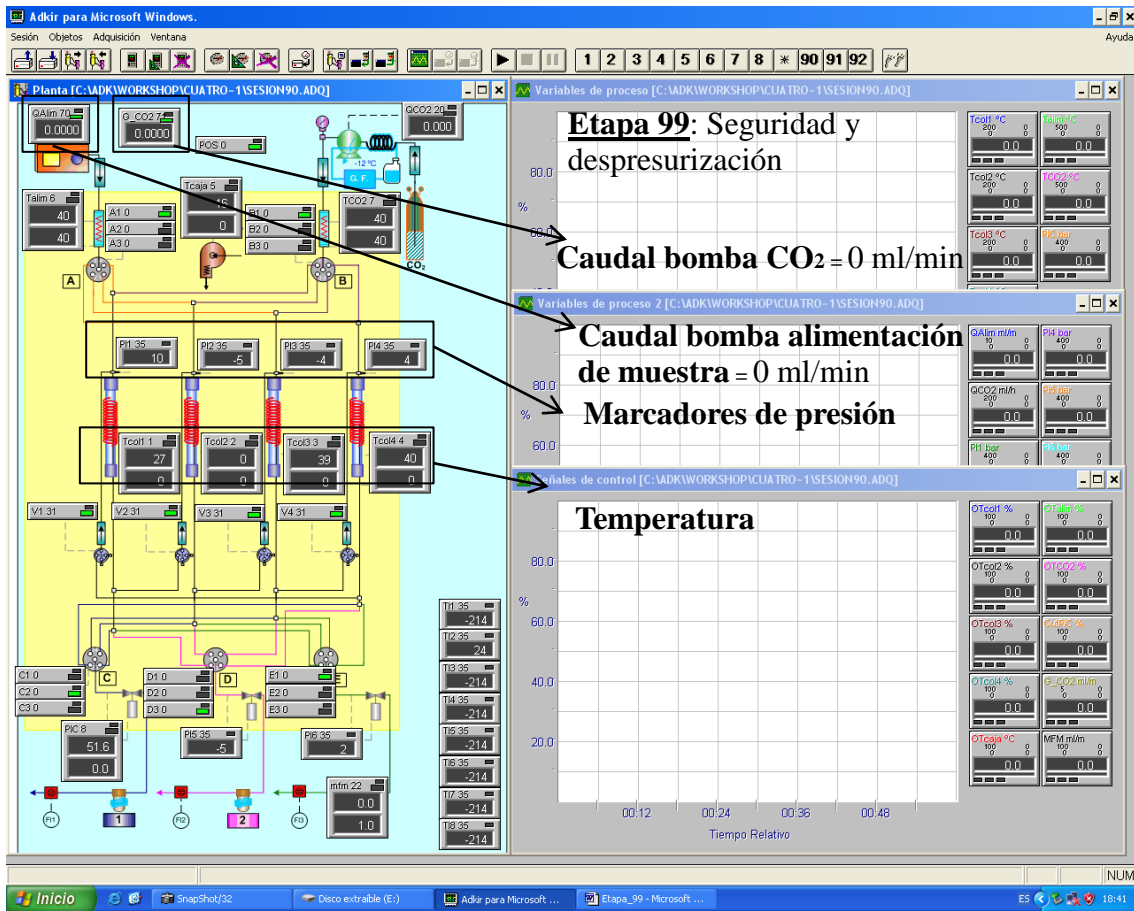


Figura 46: Modo de operación del proceso de SF-SMB. Etapa final y de seguridad.

Capítulo 4.

Conclusiones

1. El estudio de la influencia de distintos parámetros cromatográficos en la enantioselectividad de la separación de compuestos volátiles quirales empleando distintas fases móviles (gases, líquidos y fluidos supercríticos) ha puesto de manifiesto la notable incidencia del poder de solvatación del medio en la resolución enantiomérica finalmente alcanzada.
2. El uso de heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina como selector quiral es adecuado para lograr la resolución enantiomérica de compuestos volátiles quirales empleando dióxido de carbono en condiciones supercríticas como fase móvil.
3. La utilización de técnicas multidimensionales, como la cromatografía de líquidos en fase inversa acoplada a cromatografía de gases y a espectrometría de masas (RPLC-GC-MS); y la cromatografía de gases multidimensional acoplada a espectrometría de masas (MDGC-MS), proporciona la capacidad de picos suficiente para lograr resoluciones enantioméricas de compuestos volátiles quirales presentes en fuentes naturales. Además, el hecho de que el empleo de las citadas técnicas permita minimizar la etapa de preparación de muestra, disminuye el riesgo de racemización y, por tanto, aumenta la fiabilidad de la determinación de los excesos enantioméricos característicos de compuestos volátiles quirales.

4. La complementariedad y adecuación de las técnicas multidimensionales utilizadas (RPLC-GC-MS y MDGC-MS) justifica la propuesta de su uso para la selección de aquellas fuentes naturales, alternativas y sostenibles que puedan ser especialmente apropiadas para la obtención, a escala preparativa, de compuestos enantiopuros.
5. La utilización de un sistema SCADA (*Supervisory Control and Data Acquisition*) permite la adquisición de las variables implicadas en un proceso cromatográfico en lecho móvil simulado con fluidos supercríticos (SF-SMB), así como su supervisión y su control.
6. El diseño propuesto ha permitido construir una planta de SF-SMB con la configuración 1-1-1-1, que incluye cuatro zonas y cuatro columnas, de manera que la ejecución secuencial de todas las etapas y ciclos necesarios para completar el proceso se realiza de forma completamente automatizada.
7. La implementación de un único lazo de control para las tres válvulas multivía que controlan las salidas de los compuestos a separar posibilita la apertura simultánea de las mismas, así como el mantenimiento de la presión en el sistema, por lo que es un aspecto esencial para el correcto funcionamiento de la planta de SF-SMB diseñada y construida.
8. Las resoluciones enantioméricas conseguidas empleando una única columna en la planta de SF-SMB han permitido demostrar la viabilidad de su empleo para separar enantiómeros de compuestos volátiles quirales a escala preparativa utilizando un fluido supercrítico como fase móvil.
9. Las resoluciones enantioméricas alcanzadas utilizando una única columna en la planta de SF-SMB diseñada y construida han permitido demostrar la conveniencia de recurrir a un sistema cromatográfico multidimensional, que posibilite un modo de operación en continuo y en contracorriente y a la utilización de dióxido de carbono en condiciones supercríticas como fase móvil, para obtener compuestos volátiles enantiopuros a escala preparativa.

10. Los resultados obtenidos en el estudio realizado han permitido establecer la metodología a seguir para simular el movimiento del lecho mediante el cambio secuencial y continuo de las zonas por las que, en cada etapa, se debe introducir la muestra y el dióxido de carbono en condiciones supercríticas. Igualmente, se ha establecido la secuencia de operación requerida para lograr la recuperación, a través de tres salidas, de los compuestos separados en el proceso.

11. Sobre la base de los resultados detallados en esta *Memoria* ha sido posible programar las sesiones necesarias para ejecutar las cuatro etapas que definen cada uno de los ciclos sucesivos que permiten simular el movimiento del lecho constituido por cuatro columnas, de 200 mm de longitud y 10 mm de diámetro interno, que contienen heptakis-(2,3,6-tri-*O*-metil)- β -ciclodextrina como selector quiral.

Capítulo 5.

BIBLIOGRAFÍA

Abel, K., Evaluation of vented programmed temperature precolumns in gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **1964**, *13*, 14-18.

Adahchour, M., Beens, J., Brinkman, U. A. Th., Recent developments in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1186*, 67-108.

Alario, J.; Pérez, M.; Vázquez, A.; Villén, J., Very-large-volume sampling of water in gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption (TOTAD) interface for pesticide-residue analysis. *Journal of Chromatographic Science* **2001**, *39*, 65-69.

Amanullah, M.; Grossmann, C.; Mazzotti, M.; Morari, M.; Morbidelli, M., Experimental implementation of automatic 'cycle to cycle' control of a chiral simulated moving bed separation. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1165*, 100-108.

Anastas, P. T.; Williamson, T. C., The green chemistry challenge. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **1996**, *212*, 43.

Anastas, P. T.; Warner, J. C., Green Chemistry: Theory and Practice. Oxford University Press, New York, USA **1998**.

Anastas, P. T., Green chemistry and the role of analytical methodology development. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **1999**, *29*, 167-175.

Anastas, P. T.; Eghbali, N., Green Chemistry: Principles and Practice. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 301-312.

Anonymous, *Chemical and Engineering News* **2003**, *81*, 18.

Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M., Green analytical chemistry. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27*, 497-511.

Armstrong, D. W.; Chang, C. D.; Li, W. Y., Relevance of enantiomeric separations in food and beverage analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1990**, *38*, 1674-1677.

Armstrong, D. W.; Zukowski, J., Direct enantiomeric resolution of monoterpene hydrocarbons via reversed-phase high-performance liquid-chromatography with an alpha-cyclodextrin bonded stationary-phase. *Journal of Chromatography A* **1994**, *666*, 445-448.

Ash, G.; Barth, K.; Hotier, G.; Mank, L.; Renard, P., Eluxyl - A new paraxylene separation process. *Revue de l'Institut Francais du Petrole* **1994**, *49*, 541-549.

Baiker, A., Supercritical fluids in heterogeneous catalysis. *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 453-473.

Barba, C.; Calvo, M. M.; Herraiz, M.; Santa-María, G., Detection of radiolytic hydrocarbons by supercritical fluid extraction and gas chromatographic-mass spectrometric analysis of irradiated cheese. *Food Chemistry* **2009**, *114*, 1517-1522.

Barba, C.; Flores, G.; Herraiz, M., Stereodifferentiation of some chiral aroma compounds in wine using solid phase microextraction and multidimensional gas chromatography. *Food Chemistry* **2010a**, *123*, 846-851.

Barba, C.; Santa-María, G.; Flores, G.; Herraiz, M.; Calvo, M. M., Enantiomeric analysis of chiral compounds in irradiated foods using multidimensional gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010b**, *58*, 752-756.

Barcarolo, R., Coupled LC-GC - A new method for the on-line analysis of organochlorine pesticide-residues in fat. *HRC-Journal of High Resolution Chromatography* **1990**, *13*, 465-469.

Bargmann-Leyder, N.; Sella, C.; Bauer, D.; Tambute, A.; Caude, M., Supercritical fluid chromatographic separation of beta-blockers on chryrosine-A: Investigation of the chiral recognition mechanism using molecular modeling. *Analytical Chemistry* **1995**, *67*, 952-958.

Berthod, A.; Li, W.; Armstrong, D. W., Multiple enantioselective retention mechanisms on derivatized cyclodextrin gas chromatographic chiral stationary phases. *Analytical Chemistry* **1992**, *64*, 873-879.

Bicchi, C., Cagliero, C., Rubiolo, P., New trends in the analysis of the volatile fraction of matrices of vegetable origin: A short overview - A review. *Flavour and Fragrance Journal* **2011**, (en prensa).

Biressi, G.; Quattrini, F.; Juza, M.; Mazzotti, M.; Schurig, V.; Morbidelli, M., Gas chromatographic simulated moving bed separation of the enantiomers of the inhalation anesthetic enflurane. *Chemical Engineering Science* **2000**, *55*, 4537-4547.

Blanch, G. P.; Ibáñez, E.; Herraiz, M.; Reglero, G., Use of a programmed-temperature vaporizer for off-line SFE/GC analysis in food composition studies. *Analytical Chemistry* **1994**, *66*, 888-892.

Blanch, G. P.; Reglero, G.; Herraiz, M., Analysis of wine aroma by off-line and on-line supercritical fluid extraction gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, *43*, 1251-1257.

Blanch, G. P.; Ruiz del Castillo, M. L.; Herraiz, M., Enantiomer analysis of chiral lactones in foods by on-line coupled reversed-phase liquid chromatography gas chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **1998a**, *36*, 589-594.

Blanch, G. P.; Ruiz del Castillo, M. L.; Herraiz, M., Evaluation of a transfer technique for direct coupling of reversed-phase liquid chromatography with gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1998b**, *818*, 77-83.

Blanch, G. P.; Caja, M. M.; Ruiz del Castillo, M. L.; Santa-María, G.; Herraiz, M., Fractionation of plant extracts by supercritical fluid extraction and direct introduction in capillary gas chromatography using a programmable temperature vaporizer. *Journal of Chromatographic Science* **1999**, *37*, 407-410.

Blaser, H. U.; Pugin, B.; Spindler, F., Progress in enantioselective catalysis assessed from an industrial point of view. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* **2005**, *231*, 1-20.

Bouwmeester, H. J.; Davies, J. A. R.; Toxopeus, H., Enantiomeric composition of carvone, limonene, and carveols in seeds of dill and annual and biennial caraway varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, *43*, 3057-3064.

Broughton, D. B.; Gerhold, G. G., *Continuous Sorption Process Employing Fixed Bed of Sorbent and Moving Inlets and Outlets*. Patent US 2985589 **1961**.

Caja, M. M.; Herraiz, M., Rapid screening of volatile compounds in edible plants by direct chromatographic analysis. *Food Chemistry* **2009**, *117*, 456-460.

Casu, B.; Reggiani, M.; Sanderson, G. R., Methylated cycloamyloses (cyclodextrins) and their inclusion properties. *Carbohydrate Research* **1979**, *76*, 59-66.

Chester, T. L.; Pinkston, J. D., Supercritical fluid and unified chromatography. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 129-135.

Chin, C. Y.; Wang, N. H. L., Simulated moving bed equipment designs. *Separation and Purification Reviews* **2004**, *33*, 77-155.

Ching, C. B.; Chu, K. H.; Hidajat, K.; Ruthven, D. M., Experimental study of a simulated counter-current adsorption system. VII. Effects of non-linear and interacting isotherms. *Chemical Engineering Science* **1993**, *48*, 1343-1351.

Ching, C. B.; Fu, P.; Ng, S. C.; Xu, Y. K., Effect of mobile phase composition on the separation of propranolol enantiomers using a perphenylcarbamate beta-cyclodextrin bonded chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A* **2000**, *898*, 53-61.

Cortes, H. J.; Pfeiffer, C. D.; Richter, B. E., On-line multidimensional chromatography using packed capillary liquid chromatography and capillary gas chromatography. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* **1985a**, *8*, 469-474.

Cortes, H. J.; Richter, B. E.; Pfeiffer, C. D.; Jensen, D. E., Determination of trace chlorinated benzenes in fuel-oil by on-line multidimensional chromatography using packed capillary liquid chromatography and capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography* **1985b**, *349*, 55-61.

Cortes, H. J.; Winniford, B.; Luong, J.; Pursch, M., Comprehensive two dimensional gas chromatography - A review. *Journal of Separation Science* **2009**, *32*, 883-904.

Cortés, J. M.; Sánchez, R.; Díaz-Plaza, E. M.; Villén, J.; Vázquez, A., Large volume GC injection for the analysis of organophosphorus pesticides in vegetables using the through oven transfer adsorption desorption (TOTAD) interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006a**, *54*, 1997-2002.

Cortés, J. M.; Sánchez, R.; Villén, J.; Vázquez, A., Analysis of unsaponifiable compounds of edible oils by automated on-line coupling reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006b**, *54*, 6963-6968.

Cortés, J. M.; Toledano, R. M.; Villén, J.; Vázquez, A., Analysis of pesticides in nuts by on-line reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 5544-5549.

Cortés, J. M.; Vázquez, A.; Santa-María, G.; Blanch, G. P.; Villén, J., Pesticide residue analysis by RPLC-GC in lycopene and other carotenoids obtained from tomatoes by supercritical fluid extraction. *Food Chemistry* **2009a**, *113*, 280-284.

Cortés, J. M.; Toledano, R. M.; Andini, J. C.; Villén, J.; Vázquez, A., Automated on-line coupling liquid chromatography-gas chromatography and large volume injection using the TOTAD interface. In *Chromatography Types, Techniques and Methods*. Nova Science Publishers, New York, USA **2009b**.

Curylo, J.; Wardencki, W.; Namiesnik, J., Green aspects of sample preparation - A need for solvent reduction. *Polish Journal of Environmental Studies* **2007**, *16*, 5-16.

Dabrio, M. V.; Blanch, G. P.; Cifuentes, A.; Díez-Masa, J. C.; de Frutos, M.; Herraiz, M.; Martínez Castro, I.; Sanz Perucha, J., *Cromatografía y Electroforesis en Columna*. Springer Ibérica, Madrid, Spain **2000**.

Dalko, P. I.; Moisan, L., Enantioselective organocatalysis. *Angewandte Chemie-International Edition* **2001**, *40*, 3726-3748.

de Alencastro, L. F.; Grandjean, D.; Tarradellas, J., Application of multidimensional (heart-cut) gas chromatography to the analysis of complex mixtures of organic pollutants in environmental samples. *Chimia* **2003**, *57*, 499-504.

de Carvalho, C.; da Fonseca, M. M. R., Carvone: Why and how should one bother to produce this terpene. *Food Chemistry* **2006**, *95*, 413-422.

de Geus, H. J., de Boer, J., Brinkmann, U. A. Th., Multidimensionality in gas chromatography. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* **1996**, *15*, 168-178.

de Simone, J. M., Practical approaches to green solvents. *Science* **2002**, *297*, 799-803.

de Sousa, D. P.; Nobrega, F. F. D.; de Almeida, R. N., Influence of the chirality of (*R*)-(-)- and (*S*)-(+)-carvone in the central nervous system: A comparative study. *Chirality* **2007**, *19*, 264-268.

Deans, D. R., A new technique for heart cutting in gas chromatography. *Chromatographia* **1968**, *1*, 18-22.

Deans, D. R., Use of heart cutting in gas-chromatography - A review. *Journal of Chromatography* **1981**, *203*, 19-28.

Denet, F.; Hauck, W.; Nicoud, R. M.; Di Giovanni, O.; Mazzotti, M.; Jaubert, J. N.; Morbidelli, M., Enantioseparation through supercritical fluid simulated moving bed (SF-SMB) chromatography. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2001**, *40*, 4603-4609.

Depta, A.; Giese, T.; Johannsen, M.; Brunner, C., Separation of stereoisomers in a simulated moving bed-supercritical fluid chromatography plant. *Journal of Chromatography A* **1999**, *865*, 175-186.

Díaz-Plaza, E. M.; Cortés, J. M.; Vázquez, A.; Villén, J., Automated determination of pesticide residues in olive oil by on-line reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface with electron-capture and nitrogen-phosphorus detectors operating simultaneously. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1174*, 145-150.

Duquet, D.; Dewaele, C.; Verzele, M.; McKinley, S., Coupling miniaturized liquid chromatography to capillary gas chromatography (micro-LC-CGC) - Possibilities of reversed phase LC. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* **1988**, *11*, 824-829.

Erdem, G.; Morari, M.; Amanullah, M.; Mazzotti, M.; Morbidelli, M., Optimizing control of an experimental simulated moving bed unit. *American Institute of Chemical Engineers Journal* **2006**, *52*, 1481-1494.

Farina, V.; Reeves, J. T.; Senanayake, C. H.; Song, J. H. J., Asymmetric synthesis of active pharmaceutical ingredients. *Chemical Reviews* **2006**, *106*, 2734-2793.

Flores, G.; Ruiz del Castillo, M. L.; Blanch, G. P.; Herraiz, M., Detection of the adulteration of olive oils by solid phase microextraction and multidimensional gas chromatography. *Food Chemistry* **2006**, *97*, 336-342.

Flores, G.; Ruiz del Castillo, M. L.; Herraiz, M., Absorbents as packing materials in on-line coupling of reversed phase liquid chromatography and gas chromatography via a programmed temperature vaporizer. *Journal of Chromatography A* **2007a**, *1153*, 29-35.

Flores, G.; Ruiz del Castillo, M. L.; Herraiz, M., Enantiomeric analysis of beta-pinene and limonene by direct coupling of reversed phase liquid chromatography and gas chromatography using absorbents as packing materials. *Journal of Separation Science* **2007b**, *30*, 2780-2785.

Flores, G.; Díaz-Plaza, E. M.; Cortés, J. M.; Villén, J.; Herraiz, M., Use of absorbent materials in on-line coupled reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography via the through oven transfer adsorption desorption interface. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1211*, 99-103.

Fogassy, E.; Acs, M.; Szili, T.; Simandi, B.; Sawinsky, J., Molecular chiral recognition in supercritical solvents. *Tetrahedron Letters* **1994**, *35*, 257-260.

Food & Drug Administration, Development of new stereoisomeric drugs, **1992**.

Francotte, E. R.; Richert, P., Applications of simulated moving-bed chromatography to the separation of the enantiomers of chiral drugs. *Journal of Chromatography A* **1997**, *769*, 101-107.

Francotte, E. R., Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers. *Journal of Chromatography A* **2001**, *906*, 379-397.

Full, G.; Winterhalter, P.; Schmidt, G.; Herion, P.; Schreier, P., MDGC-MS - A powerful tool for enantioselective flavor analysis. *HRC-Journal of High Resolution Chromatography* **1993**, *16*, 642-644.

Fung, K. Y.; Ng, K. M.; Wibowo, C., Experimental study of the effect of buffer on chromatography and crystallization hybrid process. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2006**, *45*, 8393-8399.

Grob, K., Peak broadening or splitting caused by solvent flooding after splitless or cold on-column injection in capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography* **1981**, *213*, 3-14.

Grob, K.; Grob, G.; Grob, K., Capillary columns with immobilized stationary phases. I. A new simple preparation procedure. *Journal of Chromatography* **1981a**, *211*, 243-246.

Grob, K.; Grob, G., Capillary columns with immobilized stationary phases. II. Practical advantages and details of procedure. *Journal of Chromatography* **1981b**, *213*, 211-221.

Grob, K., Partial solvent trapping in capillary gas chromatography - Description of a solvent effect. *Journal of Chromatography* **1982**, *251*, 235-248.

Grob, K.; Schilling, B., Observation of a peak under the action of phase soaking, a gas chromatographic solvent effect, during passage through a capillary column. *Journal of Chromatography* **1983a**, *259*, 37-48.

Grob, K.; Schilling, B., Retardation by phase soaking in capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography* **1983b**, *260*, 265-275.

Grob, K.; Karrer, G.; Riekkola, M. L., On-column injection of large sample volumes using the retention gap technique in capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography* **1985**, *334*, 129-155.

Grob, K., *On-Column Injection in Capillary Gas Chromatography*. Hüthig, Heidelberg, Germany **1987**.

Grob, K.; Lanfranchi, M.; Mariani, C., Determination of free and esterified sterols and of wax esters in oils and fats by coupled liquid chromatography gas chromatography. *Journal of Chromatography* **1989**, *471*, 397-405.

Grob, K., LC for sample preparation in LC-GC - A review. *Chimia* **1991**, *45*, 109-113.

Grob, K., Development of the transfer techniques for online high-performance liquid-chromatography capillary gas-chromatography. *Journal of Chromatography A* **1995**, *703*, 265-276.

Grob, K., Efficiency through combining high-performance liquid chromatography and high resolution gas chromatography: Progress 1995-1999. *Journal of Chromatography A* **2000**, *892*, 407-420.

Grossmann, C.; Amanullah, M.; Morari, M.; Mazzotti, M.; Morbidelli, M., Optimizing control of simulated moving bed separations of mixtures subject to the generalized Langmuir isotherm. *Adsorption* **2008a**, *14*, 423-432.

Grossmann, C.; Erdem, G.; Morari, M.; Amanullah, M.; Mazzotti, M.; Morbidelli, M., 'Cycle to cycle' optimizing control of simulated moving beds. *American Institute of Chemical Engineers Journal* **2008b**, *54*, 194-208.

Gübitz, G.; Schmid, M. G., Chiral separation principles in chromatographic and electromigration techniques. *Molecular Biotechnology* **2006**, *32*, 159-179.

Guest, D. W., Evaluation of simulated moving bed chromatography for pharmaceutical process development. *Journal of Chromatography A* **1997**, *760*, 159-162.

Henke, S.; Kubat, M.; Bubnik, Z., The new simulated moving bed pilot plant-modelling, simulation and application. *Journal of Food Engineering* **2008**, *87*, 26-33.

Herraiz, M., Fases inmovilizadas en CGL *Boletín del Grupo de Cromatografía y Técnicas Afines* **1983**, *4*.

Herraiz, M.; Reglero, G.; Loyola, E.; Herraiz, T., Sampling of volatile components using a PTV in the solvent split mode. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* **1987**, *10*, 598-602.

Hierro, M. T. G.; Santa-María, G., Supercritical fluid extraction of vegetable and animal fats with CO₂ - A mini review. *Food Chemistry* **1992**, *45*, 189-192.

Hoh, E.; Mastovska, K., Large volume injection techniques in capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1186*, 2-15.

Hyötyläinen, T.; Riekkola, M. L., On-line coupled liquid chromatography-gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1000*, 357-384.

Hyötyläinen, T.; Riekkola, M. L., Solid-phase extraction or liquid chromatography coupled on-line with gas chromatography in the analysis of biological samples. *Journal of Chromatography B* **2005**, *817*, 13-21.

Ibáñez, E.; Martín-Álvarez, P. J.; Reglero, G.; Herraiz, M., Large particle micropacked columns in supercritical fluid chromatography. *Journal of Microcolumn Separations* **1993**, *5*, 371-381.

Ibáñez, E.; Tabera, J.; Herraiz, M.; Reglero, G., Effect of temperature and density on the performance of micropacked columns in supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1994**, *667*, 249-255.

Ibáñez, E.; Herraiz, M.; Reglero, G., On-line SFE-SFC coupling using micropacked columns. *HRC-Journal of High Resolution Chromatography* **1995**, *18*, 507-509.

Jarzebski, A. B.; Malinowski, J. J., Potentials and prospects for application of supercritical fluid technology in bioprocessing. *Process Biochemistry* **1995**, *30*, 343-352.

Jessop, P. G.; Ikariya, T.; Noyori, R., Homogeneous catalysis in supercritical fluids. *Chemical Reviews* **1999**, *99*, 475-493.

Johannsen, M.; Peper, S.; Depta, A., Simulated moving bed chromatography with supercritical fluids for the resolution of bi-naphthol enantiomers and phytol isomers. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2002**, *54*, 85-102.

Jung, J.; Perrut, M., Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. *Journal of Supercritical Fluids* **2001**, *20*, 179-219.

Jusforgues, P.; Shaimi, M., Preparative supercritical fluid chromatography. *Analysis* **1998**, *26*, 55-60.

Juza, M.; Di Giovanni, O.; Biressi, G.; Schurig, V.; Mazzotti, M.; Morbidelli, M., Continuous enantiomer separation of the volatile inhalation anesthetic enflurane with a gas chromatographic simulated moving bed unit. *Journal of Chromatography A* **1998**, *813*, 333-347.

Juza, M.; Mazzotti, M.; Morbidelli, M., Simulated moving-bed chromatography and its application to chirotechnology. *Trends in Biotechnology* **2000**, *18*, 108-118.

Kang, J. W.; Wistuba, D.; Schurig, V., Recent progress in enantiomeric separation by capillary electrochromatography. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 4005-4021.

King, J. W., Fundamental and applications of supercritical fluid extraction in chromatographic science. *Journal of Chromatographic Science* **1989**, *27*, 355-364.

King, M. B.; Bott, T. R., *Extraction of natural products using near-critical solvents*. Chapman & Hall, Glasgow, Scotland **1993**.

König, W. A., *The Practice of Enantiomer Separation by Capillary Gas Chromatography*. Hüthig, Heidelberg, Germany **1988**.

König, W. A., *Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins*. Hüthig, Heidelberg, Germany **1992**.

König, W. A.; Kruger, A.; Icheln, D.; Runge, T., Enantiomeric composition of the chiral constituents in essential oils. Monoterpene hydrocarbons. *HRC-Journal of High Resolution Chromatography* **1992**, *15*, 184-189.

Lai, X. H.; Ng, S. C., Enantioseparation on mono(6^A-N-allylamino-6^A-deoxy)permethylated beta-cyclodextrin covalently bonded silica gel. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1059*, 53-59.

Langelaan, H. C.; Bartels, P. V.; Hulleman, S. H. D., *Method and Apparatus for Counter-current Extraction and Supercritical Extraction at High and Low Pressures*. Patent WO 98-NL662 **1999**.

Lankey, R. L.; Anastas, P. T., Life-cycle approaches for assessing green chemistry technologies. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2002**, *41*, 4498-4502.

Lee, M. L.; Markides, K. E., *Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction*. Chromatography Conferences, Provo UT, USA **1990**.

Lorenzo, D.; Paz, D.; Davies, P.; Villamil, J.; Vila, R.; Canigüeral, S.; Dellacassa, E., Application of multidimensional gas chromatography to the enantioselective characterisation of the essential oil of *Eupatorium buniifolium* Hooker et Arnott. *Phytochemical Analysis* **2005**, *16*, 39-44.

Luque de Castro, M. D.; Valcárcel, M.; Tena, M. T., *Analytical Supercritical Fluid Extraction*. Springer, Heidelberg, Germany **1994**.

Macaudière, P.; Caude, M.; Rosset, R.; Tambuté, A., Chiral resolutions in SFC: Mechanisms and applications with various chiral stationary phases. *Journal of Chromatographic Science* **1989**, *27*, 583-591.

Maier, N. M.; Franco, P.; Lindner, W., Separation of enantiomers: Needs, challenges, perspectives. *Journal of Chromatography A* **2001**, *906*, 3-33.

Majors, R. E., Multidimensional high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **1980**, *18*, 571-579.

Manninen, P.; Pakarinen, J.; Kallio, H., Large-scale supercritical carbon dioxide extraction and supercritical carbon dioxide counter-current extraction of cloudberry seed oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 2533-2538.

Marriott, P. J.; Shellie, R.; Cornwell, C., Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A* **2001**, *936*, 1-22.

Martínez Castro, I.; Gangoiti, J. A.; Jiménez, M. I.; Sanz, J., Las ciclodextrinas en cromatografía de gases. *Ciencia y Tecnología de los Alimentos* **1993**, *10-14*.

Martínez, R. M.; Barba, C.; Calvo, M. M.; Santa-María, G.; Herraiz, M., Rapid recognition of irradiated dry-cured ham by on-line coupling of reversed phase liquid chromatography with gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Food Protection* **2011**, *74*, (en prensa).

Masatake, T; Tamura, M., *Liquid Separation into Three Components Using a Simulated Moving Bed*. Patent US 5556546 **1996**.

Mazzotti, M.; Storti, G.; Morbidelli, M., Supercritical fluid simulated moving bed chromatography. *Journal of Chromatography A* **1997**, 786, 309-320.

Mazzotti, M., Equilibrium theory based design of simulated moving bed processes for a generalized Langmuir isotherm. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1126, 311-322.

McCoy, M, Chiral business. *Chemical and Engineering News* **2000**, 78, 17-25.

Meissner, J. P.; Carta, G., Continuous regioselective enzymatic esterification in a simulated moving bed reactor. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2002**, 41, 4722-4732.

Mermelstein, N. H., Supercritical fluid extraction gets renewed attention. *Food Technology* **1999**, 53, 78-79.

Mesiano, A. J.; Beckman, E. J.; Russell, A. J., Supercritical biocatalysis. *Chemical Reviews* **1999**, 99, 623-633.

Molnár, Z.; Nagy, M.; Aranyi, A.; Hanak, L.; Argyelan, J.; Pencz, I.; Szanya, T., Separation of amino acids with simulated moving bed chromatography. *Journal of Chromatography A* **2005**, 1075, 77-86.

Mondello, L.; Bartle, K. D.; Dugo, G.; Dugo, P., Automated HPLC-HRGC: A powerful method for essential oil analysis. III. Aliphatic and terpene aldehydes of orange oil. *HRC-Journal of High Resolution Chromatography* **1994**, 17, 312-314.

Mondello, L.; Catalfamo, M.; Dugo, P.; Dugo, G., Multidimensional capillary GC-GC for the analysis of real complex samples. II. Enantiomeric distribution of monoterpene hydrocarbons and monoterpene alcohols of cold-pressed and distilled lime oils. *Journal of Microcolumn Separations* **1998**, 10, 203-212.

Mondello, L.; Dugo, P.; Dugo, G.; Lewis, A. C.; Bartle, K. D., High-performance liquid chromatography coupled on-line with high resolution gas chromatography - State of the art. *Journal of Chromatography A* **1999**, 842, 373-390.

Mookdasanit, J.; Tamura, H., Comparative enantioseparation of monoterpenes by HPLC on three kinds of chiral stationary phases with an on-line optical rotatory dispersion under reverse phase mode. *Food Science and Technology Research* **2002**, 8, 367-372.

Mun, S.; Xie, Y.; Wang, N. H. L., Robust pinched-wave design of a size-exclusion simulated moving-bed process for insulin purification. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2003**, 42, 3129-3143.

Negawa, M.; Shoji, F., Optical resolution by simulated moving bed adsorption technology. *Journal of Chromatography* **1992**, *590*, 113-117.

Nicoud, R. M.; Fuchs, G.; Adam, P.; Bailly, M.; Küsters, E.; Antia, F. D.; Reuille, R.; Schmid, E., Preparative scale enantioseparation of a chiral epoxide: Comparison of liquid-chromatography and simulated moving bed adsorption technology. *Chirality* **1993**, *5*, 267-271.

Noyori, R., Asymmetric catalysis: Science and opportunities (Nobel lecture 2001). *Advanced Synthesis & Catalysis* **2003**, *345*, 15-32.

Paredes, G.; Mazzotti, M., Optimization of simulated moving bed and column chromatography for a plasmid DNA purification step and for a chiral separation. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1142*, 56-68.

Peper, S.; Johannsen, M.; Brunner, G., Preparative chromatography with supercritical fluids Comparison of simulated moving bed and batch processes. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1176*, 246-253.

Pérez, M.; Alario, J.; Vázquez, A.; Villén, J., On-line reversed phase LC-GC by using the new TOTAD (through oven transfer adsorption desorption) interface: Application to parathion residue analysis. *Journal of Microcolumn Separations* **1999**, *11*, 582-589.

Pérez, M.; Alario, J.; Vázquez, A.; Villén, J., Pesticide residue analysis by off-line SPE and on-line reversed-phase LC-GC using the through oven transfer adsorption desorption interface. *Analytical Chemistry* **2000**, *72*, 846-852.

Perrut, M., Advances in supercritical-fluid chromatographic processes. *Journal of Chromatography A* **1994**, *658*, 293-313.

Perrut, M.; Clavier, J. Y., Supercritical fluid formulation: Process choice and scale-up. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **2003**, *42*, 6375-6383.

Phelps, C. L.; Smart, N. G.; Wai, C. M., Past, present, and possible future applications of supercritical fluid extraction technology. *Journal of Chemical Education* **1996**, *73*, 1163-1168.

Pirkle, W. H.; Koscho, M. E., Structural optimization of a chiral selector for use in preparative enantioselective chromatography. *Journal of Chromatography A* **1999**, *840*, 151-158.

Poole, C. F., *The Essence of Chromatography*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands **2003**.

Poy, F.; Visani, S.; Terrosi, F., Automatic injection in high resolution gas chromatography - A programmed temperature vaporizer as a general purpose injection system. *Journal of Chromatography* **1981**, *217*, 81-90.

Rajendran, A., Equilibrium theory-based design of simulated moving bed processes under reduced purity requirements linear isotherms. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1185*, 216-222.

Rajendran, A.; Paredes, G.; Mazzotti, M., Simulated moving bed chromatography for the separation of enantiomers. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 709-738.

Reglero, G.; Herraiz, M.; Herraiz, T.; Sanz, J., Capillary gas chromatographic determination of volatiles in solid samples by direct introduction using a programmable temperature vaporizer. *Journal of Chromatography* **1989**, *483*, 43-50.

Rekoske, J. E., Chiral separations. *American Institute of Chemical Engineers Journal* **2001**, *47*, 2-5.

Rizvi, S. S. H., *Supercritical Fluid Processing of Food and Biomaterials*. Blackie Academic & Professional, London, England **1994**.

Ruiz del Castillo, M. L.; Herraiz, M.; Blanch, G. P., Determination of the enantiomeric composition of gamma-lactones in edible oils by on-line coupled high performance liquid chromatography and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 1186-1190.

Ruiz del Castillo, M. L.; Gómez Caballero, E.; Herraiz, M., Stereodifferentiation of chiral compounds using reversed-phase liquid chromatography coupled with capillary gas chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **2003**, *41*, 26-30.

Ruiz del Castillo, M. L.; Flores, G.; Herraiz, M., On-line RPLC-GC analysis of terpenes using polydimethylsiloxane as a packing material. *Food Chemistry* **2008**, *107*, 545-550.

Sánchez, R.; Cortés, J. M.; Villén, J.; Vázquez, A., Determination of organophosphorus and triazine pesticides in olive oil by on-line coupling reversed-phase liquid chromatography gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and an automated through-oven transfer adsorption-desorption interface. *Journal of AOAC International* **2005**, *88*, 1255-1260.

Sánchez, R.; Cortés, J. M.; Vázquez, A.; Villén-Altamirano, J.; Villén, J., Analysis of pesticide residues by online reversed-phase liquid chromatography gas chromatography in the oil from olives grown in an experimental plot. II. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2006a**, *86*, 1926-1931.

Sánchez, R.; Vázquez, A.; Villén-Altamirano, J.; Villén, J., Analysis of pesticide residues by on-line reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography in the oil from olives grown in an experimental plot. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2006b**, *86*, 129-134.

Saravalle, C. A.; Munari, F.; Trestianu, S., Influence of sample solvent and stationary phase polarity on peak broadening, distortion and splitting due to the flooding effect. *Journal of Chromatography* **1983**, *279*, 241-250.

Sato, M.; Goto, M.; Kodama, A.; Hirose, T., Supercritical fluid extraction with reflux for citrus oil processing. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **1996**, *211*, 165-171.

Sato, M.; Kondo, M.; Goto, M.; Kodama, A.; Hirose, T., Fractionation of citrus oil by supercritical counter-current extractor with side-stream withdrawal. *Journal of Supercritical Fluids* **1998**, *13*, 311-317.

Schneiderman, E.; Stalcup, A. M., Cyclodextrins: A versatile tool in separation science. *Journal of Chromatography B* **2000**, *745*, 83-102.

Schomburg, G.; Husmann, H.; Rittmann, R., Direct (on-column) sampling into glass-capillary columns - Comparative investigations on split, splitless and on-column sampling. *Journal of Chromatography* **1981**, *204*, 85-96.

Schomburg, G.; Husmann, H.; Ruthe, S.; Herraiz, M., Crosslinking of alkylpolysiloxane films on various types of glass surfaces including fused silica using γ -radiation of a ^{60}Co source. Comparison to crosslinking by thermal peroxid treatment. *Chromatographia* **1982**, *15*, 599-610.

Schomburg, G.; Bastian, E.; Behlau, H.; Husmann, H.; Weeke, F.; Oreans, M.; Müller, F., Selective and non-selective sampling from precolumn separations - With emphasis on the sampling of aqueous solutions. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* **1984**, *7*, 4-12.

Schomburg, G.; Husmann, H.; Hubinger, E., Multidimensional separation of isomeric species of chlorinated hydrocarbons such as PCB, PCDD, and PCDF. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* **1985**, *8*, 395-400.

Schomburg, G., Two-dimensional gas chromatography: Principles, instrumentation, methods. *Journal of Chromatography A* **1995**, *703*, 309-325.

Schurig, V., Enantiomer separation by gas chromatography on chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A* **1994**, *666*, 111-129.

Schurig, V., Separation of enantiomers by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **2001**, *906*, 275-299.

Schurig, V., Chiral separations using gas chromatography. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* **2002**, *21*, 647-661.

Sciarrone, D.; Costa, R.; Ragonese, C.; Tranchida, P. Q.; Tedone, L.; Santi, L.; Dugo, P.; Dugo, G.; Joulain, D.; Mondello, L., Application of a multidimensional gas chromatography system with simultaneous mass spectrometric and flame ionization detection to the analysis of sandalwood oil. *Journal of Chromatography A* **2011**, *1218*, 137-142.

Señoráns, F. J.; Herraiz, M.; Tabera, J., On-line reversed-phase liquid chromatography - capillary gas chromatography using a programmed temperature vaporizer as interface. *HRC-Journal of High Resolution Chromatography* **1995a**, *18*, 433-438.

Señoráns, F. J.; Reglero, G.; Herraiz, M., Use of a programmed temperature injector for on-line reversed-phase liquid chromatography-capillary gas chromatography. *Journal of Chromatographic Science* **1995b**, *33*, 446-450.

Señoráns, F. J.; Villén, J.; Tabera, J.; Herraiz, M., Simplex optimization of the direct analysis of free sterols in sunflower oil by on-line coupled reversed phase liquid chromatography - gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 1022-1026.

Sheldon, R. A., Consider the environmental quotient. *International Journal of Chemical Technology Research* **1994**, *24*, 38-47.

Sheldon, R. A., The E factor: Fifteen years on. *Green Chemistry* **2007**, *9*, 1273-1283.

Sihvonen, M.; Jarvenpaa, E.; Hietaniemi, V.; Huopalahti, R., Advances in supercritical carbon dioxide technologies. *Trends in Food Science & Technology* **1999**, *10*, 217-222.

Smith, R. M., *Supercritical Fluid Chromatography*. Royal Society of Chemistry, London, England **1998**.

Staniewski, J.; Rijks, J. A., Solvent elimination rate in temperature programmed injections of large sample volumes in capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography* **1992**, *623*, 105-113.

Storti, G.; Mazzotti, M.; Furlan, L. T.; Morbidelli, M.; Carra S., Performance of a six-port simulated moving bed pilot plant for vapor-phase adsorption separations. *Separation Science and Technology* **1992**, *27*, 1889-1916.

Subramani, H. J.; Zhang, Z. Y.; Hidajat, K.; Ray, A. K., Multi-objective optimization of simulated moving bed reactor and its modification - Varicol process. *Canadian Journal of Chemical Engineering* **2004**, *82*, 590-598.

Subramanian, G., *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany **2001**.

Taylor, L. T., Supercritical fluid chromatography for the 21st century. *Journal of Supercritical Fluids* **2009**, *47*, 566-573.

Termonia, M.; Lacomblez, B.; Munari, F., Optimization of the cold split-splitless injector in the solvent split mode. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* **1988**, *11*, 890-895.

Toledano, R. M.; Cortés, J. M.; Andini, J. C.; Villén, J.; Vázquez, A., Large volume injection of water in gas chromatography-mass spectrometry using the through oven transfer adsorption desorption interface: Application to multiresidue analysis of pesticides. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 4738-4742.

Valcárcel, M.; Tena, M. T., Applications of supercritical fluid extraction in food analysis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1997**, *358*, 561-573.

Vogt, W.; Jacob, K.; Ohnesorge, A. B.; Obwexer, H. W., Capillary gas chromatography injection system for large sample volumes. *Journal of Chromatography* **1979**, *186*, 197-205.

White, C. M., *Modern Supercritical Fluid Chromatography*. Hüthig, Heidelberg, Germany **1988**.

Yeo, S. D.; Kiran, E., Formation of polymer particles with supercritical fluids - A review. *Journal of Supercritical Fluids* **2005**, *34*, 287-308.

Zhao, Y. Q.; Pritts, W. A.; Zhang, S. H., Chiral separation of selected proline derivatives using a polysaccharide-type stationary phase by supercritical fluid chromatography and comparison with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1189*, 245-253.

CURRICULUM VITAE

Breve Curriculum Vitae Carmen Barba

Datos personales

- Nombre y apellidos: Carmen Barba González-Albo
- Lugar de nacimiento: Zaragoza
- Fecha de nacimiento: 8 de abril de 1981

Formación académica

- Licenciada en Química por la Universidad de Zaragoza (1999-2005)
- Postgrado de Iniciación a la Investigación titulado *Intermedios catalíticos en reacciones de Diels-Alder* desarrollado en el Instituto Universitario de Catálisis Homogénea (IUCH) de la Universidad de Zaragoza (2005-2006)
- Doctorado en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICTAN-CSIC) por la Universidad Complutense de Madrid (2007-2011)

Becas y contratos disfrutados

- Beca del Instituto Universitario de Catálisis Homogénea de la Universidad de Zaragoza (2005-2006) para realizar el posgrado de Iniciación a la Investigación
- Contrato JAE-tec (Junta de Ampliación de Estudios - técnicos) (2006-2007) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) para incorporarse en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición de Madrid
- Beca para la Formación del Personal Investigador (FPI) (2007-2011) del Ministerio de Ciencia e Innovación para realizar la tesis doctoral
- Beca para investigadores en la Residencia de Estudiantes (2007-2009) concedida por el Ayuntamiento de Madrid
- Beca para investigadores en la Residencia de Estudiantes (2009-2010) concedida por el Gobierno de Aragón
- Beca para investigadores en la Residencia de Estudiantes (2010-2011) concedida por el Ayuntamiento de Madrid

Participación en proyectos de investigación

- Proyecto S-0505/AGR/0314
TÍTULO: Tecnologías emergentes y procesado mínimo: aplicación a la seguridad química y microbiológica de alimentos listos para el consumo (RTE)
ENTIDAD FINANCIADORA: Comunidad de Madrid
DURACION: Enero 2006-Diciembre 2009
INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Juan A. Ordóñez Pereda
INVESTIGADOR RESPONSABLE GRUPO CSIC: Dra. Marta Herraiz Carasa

- Proyecto CTQ2006-01687-PPQ

TITULO: Obtención de enantiómeros puros a escala preparativa a partir de mezclas multicomponente utilizando cromatografía en lecho móvil simulado con fluidos supercríticos

ENTIDAD FINANCIADORA: MEC

DURACION: Octubre 2006-Octubre 2009

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Marta Herraiz Carasa

- Proyecto de CTQ2009-09208-PPQ

TITULO: Enantioseparación preparativa de compuestos quirales en aromas naturales mediante cromatografía en lecho móvil simulado con fluidos supercríticos

ENTIDAD FINANCIADORA: Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN)

DURACION DESDE: Enero 2010-Diciembre 2012

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dra. Marta Herraiz Carasa

Publicaciones

- Barba, C.; Carmona, D.; Garcia, J. I.; Lamata, M. P.; Mayoral, J. A.; Salvatella, L.; Viguri, F., Conformational preferences of methacrolein in Diels-Alder and 1,3-dipolar cycloaddition reactions. *Journal of Organic Chemistry* **2006**, *71*, 9831-9840.

- Carmona, D.; Lamata, M. P.; Viguri, F.; Rodriguez, R.; Barba, C.; Lahoz, F. J.; Martin, M. L.; Oro, L. A.; Salvatella, L., Complete characterization of a chiral Lewis acid-product complex for the enantioselective diels-alder reaction between methacrolein and cyclopentadiene: Mechanistic considerations. *Organometallics* **2007**, *26*, 6493-6496.

- Barba, C.; Calvo, M. M.; Herraiz, M.; Santa-Maria, G., Detection of radiolytic hydrocarbons by supercritical fluid extraction and gas chromatographic-mass spectrometric analysis of irradiated cheese. *Food Chemistry* **2009**, *114*, 1517-1522.

- Barba, C.; Flores, G.; Herraiz, M., Stereodifferentiation of some chiral aroma compounds in wine using solid phase microextraction and multidimensional gas chromatography. *Food Chemistry* **2010**, *123*, 846-851.

- Barba, C.; Santa-Maria, G.; Flores, G.; Herraiz, M.; Calvo, M. M., Enantiomeric Analysis of Chiral Compounds in Irradiated Foods Using Multidimensional Gas Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 752-756.

- Martínez, R. M.; Barba, C.; Calvo, M. M.; Santa-María, G.; Herraiz, M., Rapid recognition of irradiated dry-cured ham by on-line coupling of reversed phase liquid chromatography with gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Food Protection* **2011**, *74*, (en prensa)

- Barba, C.; Santa-María, G.; Herraiz, M.; Calvo, M. M., Rapid detection of radiation-induced hydrocarbons in cooked ham, (enviado)

- Toledano, R. M.; Martínez, R. M.; Barba, C.; Cortés J. M.; Calvo M. M.; Santa-María G.; Herraiz, M., A quick method for identifying irradiation markers in low fat-containing food, (enviado)

- Barba, C.; Martínez, R. M.; Calvo, M. M.; Santa-María, G.; Herraiz, M., On-line reversed-phase liquid chromatography-gas chromatographic analysis of essential oils, (enviado)
- Barba, C.; Santa-María, G.; Calvo, M. M.; Herraiz, M.; Martínez, R. M., Complete analysis of two *Mentha* Species by on-line reversed-phase liquid chromatography-gas chromatography coupled to mass spectrometry, (enviado)
- Barba, C.; Calvo, M. M.; Santa-María, G.; Herraiz, M.; Martínez, R. M., Enantiomeric analysis of chiral terpenes by direct introduction of aromatic plants into a multidimensional gas chromatographic system, (próximo envío)
- Barba, C.; Martínez, R.M.; Toledano, R. M.; Calvo, M. M.; Santa-María, G.; Herraiz, M., Selection of natural sources of chiral compounds by using multidimensional chromatographic techniques, (próximo envío)

