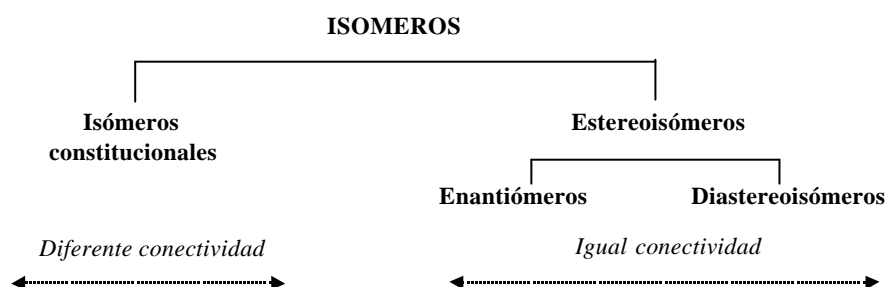


3 Separaciones quirales y enantiomerismo

3.1 Introducción

Las publicaciones del siglo XIX de Van't Hoff y Le Bed intentando explicar la asimetría molecular, deducida por Pasteur años antes, marcaron el principio de la estereoquímica. Este campo de estudio se define como la parte de la química que estudia las estructuras moleculares en tres dimensiones. Uno de los aspectos de la estereoquímica es el estereoisomerismo; los isómeros (compuestos de igual fórmula molecular) que difieren entre sí sólo en la forma en que los átomos están orientados en el espacio son llamados estereoisómeros. La quiralidad es un atributo geométrico, consecuencia de esa orientación de los átomos en una molécula. Una molécula presenta quiralidad cuando no puede superponerse a su imagen especular. Los estereoisómeros de un compuesto quiral se denominan enantiómeros y poseen la misma energía interna. Los estereoisómeros que no son enantiómeros son denominados diastereoisómeros. Los diastereoisómeros se pueden superponer con su imagen especular y no poseen la misma energía interna.

Tabla 3.1 Clasificación de las diferentes clases de isomería



La diferenciación entre un enantiómero y un diastereoisómero tiene implicaciones desde el punto de vista bioquímico, farmacéutico y analítico cruciales. Los enantiómeros poseen las mismas propiedades físico-químicas y sólo se comportan de forma diferente frente a un entorno quiral como por ejemplo: la luz polarizada, las enzimas del metabolismo, otro compuesto quiral etc. En este capítulo comentaremos el fenómeno del enantiomerismo y explicaremos las técnicas de análisis de moléculas quirales. Estos métodos de análisis se basan en el uso de técnicas quirópticas (aquellas que hacen uso de luz polarizada) o mediante la reacción reversible o irreversible de los analitos quirales con otro compuesto quiral.

3.2 Enantiomerismo y quiralidad

Como ya se ha comentado, se define como molécula quiral aquella que no puede superponerse a su reflexión especular, o lo que es lo mismo, una molécula es quiral cuando carece de simetría de reflexión. Esta propiedad es debida, en general, al diferente arreglo espacial de los grupos alrededor de un centro asimétrico o también llamado centro estereogénico. Este tipo de quiralidad es la más habitual y se denomina quiralidad central.

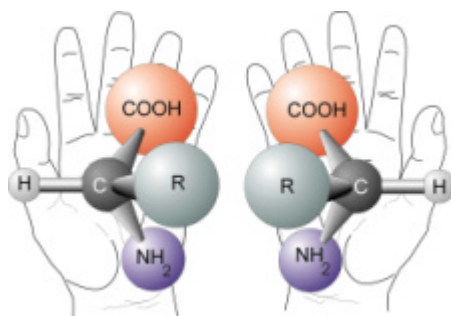


Figura 3.1. Enantiómeros de un compuesto con quiralidad central. Comparación con la quiralidad de las palmas de la mano.

Las dos posibles orientaciones espaciales alrededor del centro estereogénico da lugar a los dos enantiómeros que presentan un comportamiento diferente respecto a la luz polarizada plana; cuando un rayo de luz polarizada plana pasa a través de un compuesto quiral, el plano de polarización gira, siendo el grado de rotación el mismo para ambos enantiómeros, pero en direcciones opuestas.

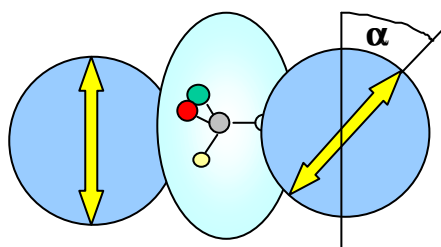


Figura 3.2. Cambio del plano de polarización de la luz cuando atraviesa una disolución de un compuesto quiral.

Hablamos entonces que los enantiómeros poseen actividad óptica que se mide a través del poder óptico rotatorio (α). Una disolución racémica (mezcla de enantiómeros a la misma concentración) no presenta actividad óptica porque los poderes ópticos rotatorios se compensan.

La quiralidad central también es posible con otros átomos tetravalentes diferentes del carbono. Algunos elementos del grupo V y VI de la tabla periódica, como el N, S o P pueden formar estructuras tetraédricas con cuatro ligandos o tres (más el par de electrones no enlazantes, como cuarto ligando). Algunos ejemplos de estos compuestos son derivados de los óxidos de fosfina, del cation sulfonio o del cation amonio. No obstante, no en todas estas estructuras se observa actividad óptica. Esto se debe a que algunos de estos centros estereogénicos permiten la conversión a estructuras planas con lo que la quiralidad se destruye o la barrera energética de conversión de un enantiómero en otro es suficientemente baja como para que a temperatura ambiente los dos enantiómeros no se puedan aislar. Este último fenómeno ocurre en los compuestos de nitrógeno tetrasustituídos.

A parte de la quiralidad central existen otro tipo de quiralidades como la axial, la helicoidal o la atropoisomería (figura 3.3). La quiralidad axial es aquella que se da en estructuras de dobles enlaces alternos (alenos) donde se ha producido la sustitución de un hidrógeno por un sustituyente R. Se genera entonces quiralidad por la ausencia de un eje de simetría. Otro tipo de quiralidad es aquella que presentan algunos hidrocarburos aromáticos condensados conocidos como helicenos. Estos compuestos pueden ordenarse para dar dos helices enrolladas en sentidos contrario y con una barrera de interconversión elevada (debido a impedimentos estéricos) lo que permite aislar las dos estructuras.

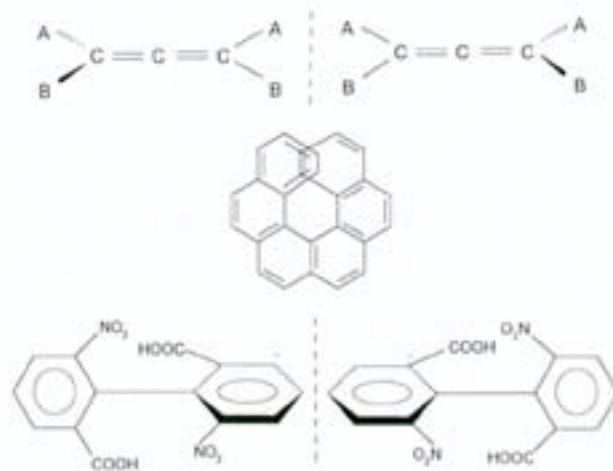


Figura 3.3. Ejemplos de algunas estructuras con quiralidad axial (aleno), helicoidal (heliceno) y atropoisomería (ácido o,o'-dinitrodifénico).

La atropoisomería o atropisomería, es aquella quiralidad relacionada con la restricción de rotación sobre un enlace central debido a los efectos estéricos de los sustituyentes adyacentes lo que genera un plano perpendicular asimétrico. Este tipo de quiralidad está presente en algunos bifenilos y espiranos.

existen más de dos estereoisómeros. Para n carbonos estereogénicos el número máximo de estereoisómeros es 2^n . Puesto que los enantiómeros existen en pares, algunos de los estereoisómeros no tienen una relación de imagen especular con otros, y entonces son diastereoisómeros. Por ejemplo, una molécula con dos carbonos asimétricos tendrá como máximo cuatro estereoisómeros, de los cuales habrá dos parejas de enantiómeros. Cada enantiómero de un grupo tendrá una relación diastereoisomérica con los del otro par de enantiómeros. Sin embargo, existen también otras posibilidades como se representa en la figura 3.4 y se ejemplifica con el ácido tartárico.

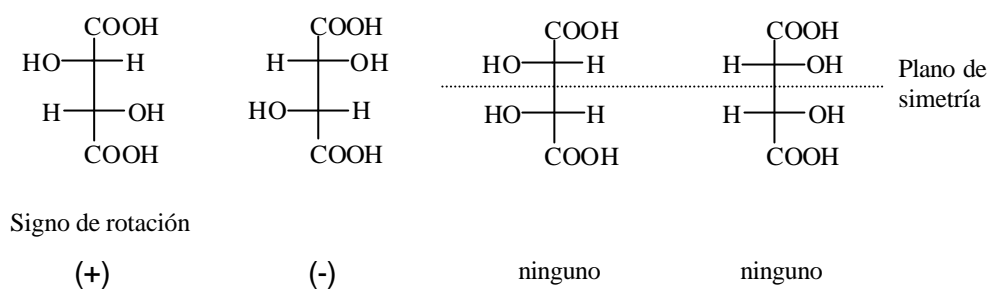


Figura 3.4. Signo de la rotación y estereoisómeros del ácido tartárico.

En este caso sólo son posible tres estereoisómeros. Existe una pareja de enantiómeros con signo de rotación opuesto pero la otra pareja no presenta una relación de enantiomerismo porque se pueden superponer al disponer de un plano de simetría. Estas formas se conocen como *meso* y se definen como aquellas formas que aun conteniendo centros estereogénicos se pueden superponer con su imagen especular y por tanto no presentan actividad óptica.

3.3 Nomenclatura

La propiedad física que distingue específicamente a dos enantiómeros de un compuesto es la rotación de la luz polarizada plana; por este motivo, los enantiómeros han sido históricamente llamados isómeros ópticos. Para moléculas simétricas el efecto neto de la rotación de la luz polarizada plana es cero, puesto que la rotación efectuada por una molécula es compensada por una rotación opuesta debida al encuentro de la luz con una molécula que es la imagen especular de la primera. Para un enantiómero, no existe ese efecto de cancelación (no hay ninguna molécula que sea imagen especular de otra), por lo que sí se da una rotación del plano de la luz. Por tanto, es comprensible que el primer intento de sistematizar la nomenclatura de los enantiómeros se basara en el signo de rotación de la luz polarizada. El enantiómero que rota el plano de la luz polarizada plana en sentido horario fue llamado dextrorrotatorio y designado con los símbolos (+) o (d). El otro enantiómero produce el efecto contrario (levorrotatorio) y se designa con los símbolos (-) o (l).

No obstante, el signo de la rotación óptica no informa de la ordenación espacial de los sustituyentes alrededor del centro asimétrico y por tanto no se puede deducir la estructura espacial del enantiómero. Fisher propuso una nomenclatura para solucionar este problema. A partir de unas proyecciones en dos dimensiones y siguiendo unas reglas de ordenación denominaba los dos enantiómeros como D y L (no confundir con d y l) atendiendo a como quedaban ordenados los sustituyentes respecto a una sustancia que tomaba como referencia. Esta nomenclatura, es totalmente arbitraria (no tiene que ver nada con el signo de rotación) por lo que era común su uso conjunto con la anterior dando lugar a nomenclaturas del tipo D(-), L(-) etc. La dificultad en su aplicación limita el uso de esta nomenclatura aunque se ha conservado hasta nuestros días para indicar la estereoisomería de glúcidos y aminoácidos.

El sistema actual de ordenación aceptado por la IUPAC, es aquel conocido como de Cahn-Ingold-Prelog o también llamado sistema R-S (figura 3.5). Éste se basa en establecer un orden de prioridad de los sustituyentes mediante una serie de reglas, las más importantes de las cuales son:

1. Se asigna a cada grupo unido al carbono asimétrico un orden de prioridad decreciente. Esta prioridad se establece en función del número atómico de los átomos directamente unidos al carbono asimétrico, siendo el átomo prioritario el de mayor número atómico.
2. Para dos átomos de igual número atómico la prioridad se establece por los siguientes átomos de los grupos hasta que se observa una diferencia. Por ejemplo, $\text{CH}_2\text{Cl} > \text{CH}_2\text{OH} > \text{CH}_2\text{CH}_3$. Los enlaces dobles cuentan como dos enlaces simples.
3. Para asignar la configuración, el centro asimétrico debe observarse con el grupo de menor prioridad en la posición más alejada del observador. Si la secuencia de prioridad decreciente se da en sentido horario, la configuración es R; en caso que la secuencia sea en sentido antihorario, la configuración es S.

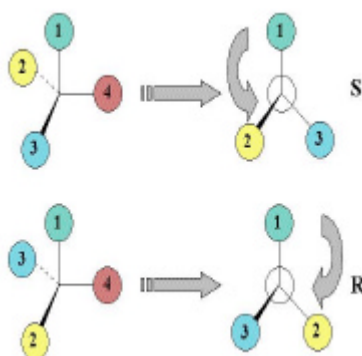


Figura 3.5. Sistema R,S para la nomenclatura de enantiómeros.

3.4 Enantiomerismo y actividad biológica

Los enantiómeros de un compuesto presentan las mismas propiedades físico-químicas en un entorno aquiral sin embargo los organismos vivos son inherentemente quirales. La naturaleza ha seleccionado los levoaminoácidos para formar las proteínas mientras que todos los glúcidos del DNA y RNA son dextrorrotatorios. En consecuencia, las enzimas, receptores celulares y todas las especies bioquímicas que intervienen en el metabolismo presentan una estereoquímica definida y por tanto los enantiómeros de una sustancia presentarán en el organismo humano un comportamiento distinto. Esto se debe a que las interacciones biológicas son estereoespecíficas y necesitan de una interacción triple (3D point interaction) para producirse. La figura 3.6 representa este tipo de interacciones y como puede observarse sólo uno de los enantiómeros posee la configuración espacial adecuada para enlazarse adecuadamente.

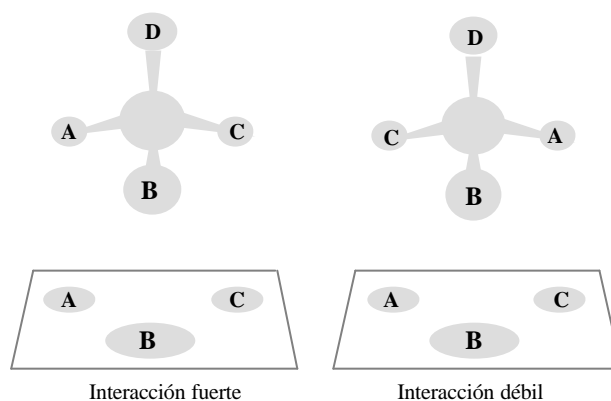


Figura 3.6. Esquema de la interacción trípode de dos enantiómeros con un receptor estereoespecífico.

Por tanto, los enantiómeros de un compuesto presentarán una reactividad distinta (velocidad de reacción, interacciones con receptores diferentes, efectos secundarios, etc). El fenómeno del enantiomerismo es muy importante en la industria farmacéutica. La pureza enantiomérica de los fármacos ha sido estudiada y legislada¹ desde el desastre de la talidomida a principios de los años setenta. Sólo uno de los enantiómeros de la talidomida posee efecto terapéutico mientras que el otro presenta un efecto teratógeno indeseado. Esto no es una situación aislada y son muchos los ejemplos que podemos encontrar donde existe un enantiómero con la actividad biológica buscada (eutómero) mientras que el otro enantiómero no la posee (distómero). Sin embargo, podemos distinguir varias situaciones:

- El distómero es tóxico, por ejemplo el caso de la talidomida.
- El distómero es inactivo o menos activo. Se define entonces una relación eutomérica que expresa cuanto más activo es el eutómero. Esto ocurre por ejemplo en la epinefrina cuya relación eutomérica es igual a 100 a favor del enantiómero levorrotatorio.

- Los dos enantiómeros poseen una actividad biológica distinta. El dextropropoxifeno es un analgésico mientras que el levopropoxifeno no tiene propiedades analgésicas pero sí antitusivas.
- La combinación de ambos enantiómeros es beneficiosa. Bien, porque poseen efectos terapéuticos complementarios o bien porque el distómero reduce los efectos secundarios del eutómero. Por ejemplo, los cuatro esteroisómeros del labetalol poseen diferentes capacidades α y β bloqueadoras. La combinación de los cuatro proporciona un excelente α,β -bloqueador. El diurético indacrinona es un ejemplo del segundo caso. El enantiómero R es el eutómero pero posee un efecto secundario indeseado de retención del ácido úrico que puede evitarse si se administra el enantiómero S que favorece su eliminación.

En el primer caso la comercialización del fármaco en forma racémica está totalmente prohibida y es imprescindible demostrar que bajo ninguna condición de almacenamiento y uso se puede producir una inversión de configuración. Esto ocurre, en la talidomida que aun administrada en forma enantioméricamente pura racemiza *in vivo* generando el enantiómero indeseado. El segundo caso, el distómero es inactivo, parece un caso más favorable y por tanto era habitual la comercialización de estos fármacos hasta la última década en forma racémica. Sin embargo, estos productos han evolucionado en la última década hacia su comercialización en su forma enantioméricamente pura, en una evolución conocida como *racemic switch*².

Este cambio no es obligado pero son varios los motivos relacionados entre sí que lo han promovido:

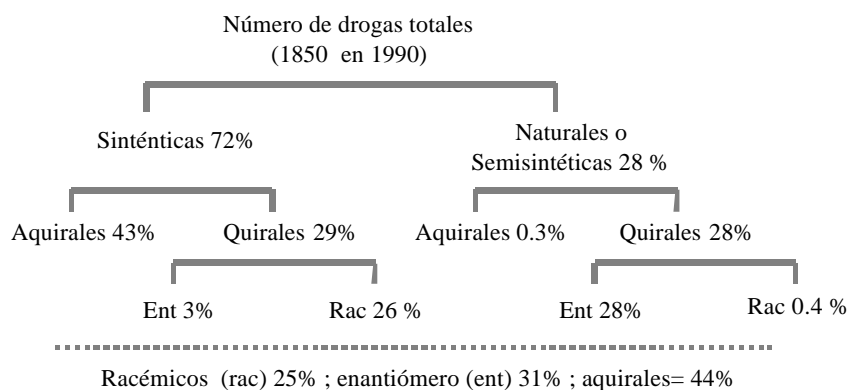
- La obtención de nuevos procesos de síntesis quiral, o de purificación de enantiómeros a partir del racémico, más económicos y sencillos.
- La obligación por parte de los organismos reguladores a realizar todos los estudios previos (farmacocinética, estabilidad, ensayos clínicos...) a la comercialización del fármaco para los dos enantiómeros aunque el fármaco vaya ser administrado en forma racémica.
- La necesidad de una dosis menor en el fármaco. Como consecuencia de la reducción de la dosis, se reducen los efectos secundarios del fármaco.

Los dos primeros motivos son puramente económicos, lanzar al mercado un producto enantioméricamente puro permite reducir a la mitad los costes porque implica un menor número de estudios farmacológicos y es tecnológicamente factible. El fármaco racémico necesita doblar la dosis para conseguir el mismo efecto que el fármaco enantioméricamente puro. Pero lo que pasa con el isómero inactivo, es un problema que preocupa a la industria farmacéutica. No es descartable su acumulación innecesaria en el organismo humano provocando efectos secundarios a largo plazo. Las palabras de Simonyi³ son adecuadas en este contexto: “ Si una sustancia se acumula en el organismo y no es un

fármaco, entonces es un veneno”. Un ejemplo de lo explicado hasta ahora es la familia de los profenos que ha sido objeto de estudio en esta tesis doctoral. Estos compuestos son antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) aunque también presentan acción antipirética y analgésica. Esta familia de compuestos tiene como estructura común el grupo ácido 2-arilpropiónico y la diferencia en los sustituyentes de este grupo da lugar a una variedad de profenos, siendo el naproxeno, el ibuprofeno y el ketoprofeno los más significativos comercialmente. Todos los profenos contienen un centro asimétrico, que es el átomo de carbono unido al grupo carboxílico. En todos los casos el isómero S(+) es más activo farmacológicamente que el R(-), aunque este último no es tóxico. Estos fármacos han pasado a comercializarse en los últimos años en forma enantioméricamente pura porque se ha comprobado que el isómero S(-) sufre un proceso de acumulación indeseado en el tejido adiposo por reacción con los triacilglicerolos endógenos⁴.

El caso de enantiómeros con efecto terapéutico diferente o con efectos terapéuticos complementarios son casos más favorables. Los enantiómeros que poseen diferentes propiedades farmacológicas se administran en forma enantioméricamente pura y hemos de pensar en ellos como dos principios activos distintos. Por el contrario, cuando sus efectos son complementarios se administran en forma conjunta y sólo es deseable que la proporción de ambos sea tal que maximice el efecto terapéutico y minimice los efectos secundarios.

Tabla 3.2. Distribución de los fármacos según su estereoisomería.



La incidencia del enantiomerismo en la industria farmacéutica, tal y como se muestra en la tabla 3.2, es importante². Como puede observarse, un 31% de los fármacos totales se comercializan en su forma enantioméricamente pura, y este porcentaje ha ido en aumento debido al proceso de *racemic switch*. Este ha sido el caso del ibuprofeno o del atenolol dos de los principios activos de mayores ventas² (tabla 3.3).

Tabla 3.3. Lista de los fármacos más vendidos en 1990

Droga	Actividad terapéutica
Ranitidina (aq)	Antiulceroso
Amoxicilina (aq)	Antibiótico
Captopril (en)	Antihipertensivo
Enalapril (en)	Antihipertensivo
Ibuprofeno (rac)	NSAID
Nifedipina (aq)	Antagonista del calcio
Cimetidina (aq)	Antiulceroso
Atenolol (rac)	Beta-bloqueador
Diclofenaco (aq)	NSAID
Diltiazem (en)	Antagonista del calcio
Naproxeno (en)	NSAID
Cefalexin (en)	Antibiótico

(aq)=aquirales, (en)=enantioméricamente puros, (rac)=racémico

No obstante, el enantiomerismo no es sólo importante en la industria farmacéutica sino que tiene implicaciones en otros campos como la cosmética, los plaguicidas y pesticidas o la industria alimentaria (figura 3.7).

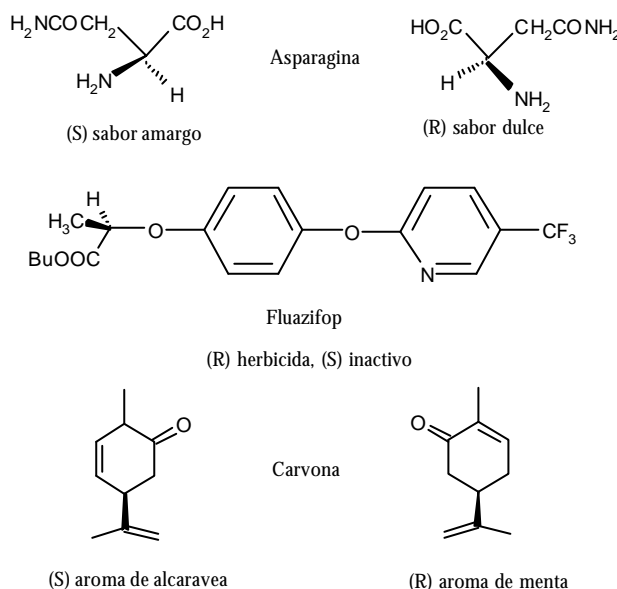


Figura 3.7. Ejemplos no farmacéuticos de diferencias de comportamiento entre enantiómeros.

Además el fenómeno del enantiomerismo está despertando un interés especial en los últimos tiempos y se investiga su papel en el origen de la vida⁵ o su utilidad como trazadores biológicos⁶. El movimiento en la

biosfera de pesticidas quirales y sus residuos puede ser trazado a través de determinaciones de excesos enantioméricos (ee). Los fenómenos de transporte habituales (volatilización, lixiviación, deposición atmosférica) y las reacciones abióticas (fotólisis, hidrólisis) no alteran el ee. Sin embargo, el metabolismo de los pesticidas por parte de microorganismos y enzimas en animales superiores sí lo altera. Por lo tanto, la determinación del ee indica la degradación biológica de estos productos y puede informar sobre el origen de los pesticidas en algunos puntos de la atmósfera.

En definitiva, este creciente interés provoca una demanda de métodos de análisis para determinar la pureza enantiomérica de productos basados en técnicas fiables, rápidas y selectivas. Esta necesidad, es especialmente importante en la industria farmacéutica ya que es necesario disponer de herramientas de análisis para controlar la pureza óptica de fármacos durante su producción, uso y almacenamiento.

3.5 Control y determinación de enantiómeros

3.5.1 Introducción

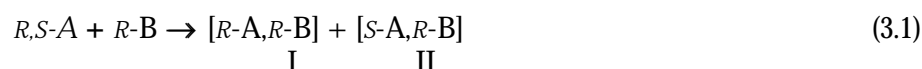
Los métodos de análisis de sustancias quirales los podemos dividir según se basen en técnicas espectroscópicas o en técnicas de separación. Dentro de las técnicas espectroscópicas destacan las técnicas quirópticas, es decir aquellas basadas en la interacción de los analitos con un haz de luz polarizada. El grupo de técnicas de separación está constituido por las técnicas habituales y destaca entre ellas la electroforesis capilar. La aplicación de esta técnica a las separaciones quirales y a la determinación de purezas enantioméricas ha sido objeto de estudio de esta memoria. En consecuencia, será tratada con detenimiento y de forma individual.

No obstante, también podemos establecer un segundo criterio basado en el fundamento de la determinación. Distinguimos, así los métodos que necesitan de un auxiliar quiral para proporcionar información analítica de los enantiómeros y los que no. Estos últimos, son métodos basados en técnicas inherentemente quirales como las quirópticas. El resto de técnicas analíticas necesitan de la interacción con un auxiliar quiral.

Esta interacción se puede establecer mediante el método directo y el indirecto. El método indirecto, consiste en la transformación de los enantiómeros en diastereoisómeros por reacción previa con el auxiliar quiral. Los diastereoisómeros formados poseen diferentes propiedades físico-químicas y pueden ser separados, por ejemplo, en una columna convencional de HPLC. El método directo consiste en la interacción diferencial del auxiliar quiral con los enantiómeros del analito formando complejos diastereoisoméricos transitorios fruto de un equilibrio dinámico. El auxiliar quiral puede ponerse en

contacto bien porque es añadido al medio o porque forma parte de la fase estacionaria en las técnicas separativas.

En el método indirecto, los enantiómeros de un compuesto A se hacen reaccionar con un enantiómero puro del auxiliar quiral B. Entonces, según la siguiente ecuación se forman dos especies químicas que guardan una relación de diastereoisomerismo.



Las especies I y II pueden ser diferenciadas mediante una técnica convencional de análisis y en el caso de las técnicas de separación generan dos picos resueltos en mayor o menor medida en función de las condiciones cromatográficas. Si se dispone del otro enantiómero del auxiliar quiral (en nuestro caso S-B) entonces el orden de elución de los enantiómeros puede ser invertido. Este método presenta los inconvenientes típicos de cualquier derivatización (aumento del coste y tiempo de análisis, derivatización incompleta..) y además es necesario, en el caso de determinaciones de pureza enantiomérica, de un auxiliar quiral de pureza óptica muy elevada. Para estudiar esto último, vamos a ver que ocurre si el racémico del analito A reacciona con el racémico del auxiliar B (figura 3.8).

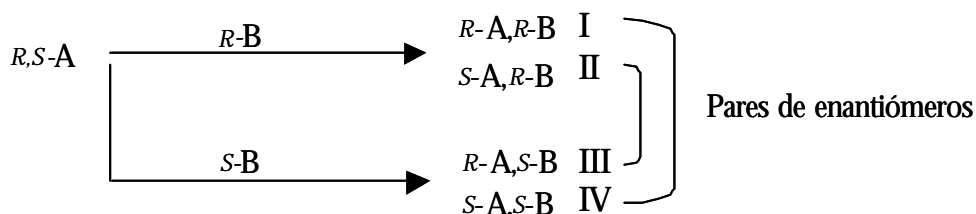


Figura 3.8. Especies que se forman en la reacción de A con el racémico del auxiliar quiral B.

En este caso se formarían cuatro especies, pero solo observaremos dos picos en el cromatograma aquellos correspondientes a los picos de I y II (diastereoisómeros) pero cada uno de ellos contendrá solapados sus respectivos enantiómeros IV y III. Una situación similar ocurre en las determinaciones de pureza enantiomérica.

Si suponemos que el enantiómero mayoritario de A es el R y que usamos también el enantiómero R del auxiliar quiral, intentaremos hallar la relación de áreas (y así de concentraciones) entre el pico minoritario S,A-R,B (II) y el pico mayoritario R,A-R,B (I). No obstante estas áreas se verán desvirtuadas por la

contribución de los picos III y IV provenientes de la reacción entre los enantiómeros de A con el enantiómero minoritario del auxiliar quiral B. En definitiva, cometeremos un error en la determinación si el auxiliar quiral no es de una pureza enantiomérica muy elevada. Esto aún limita más el número de auxiliares quirales disponibles y favorece que el método directo sea más utilizado.

El método directo consiste en añadir a la disolución (donde se hará la medida en una técnica espectroscópica o a la fase móvil en una técnica separativa), un auxiliar quiral que establecerá un equilibrio dinámico para formar con los enantiómeros del analito (en diferente extensión) unos complejos diastereoisoméricos. Estos complejos transitorios provocaran un diferente comportamiento espectroscópico o cromatográfico en base al cual se podrá hacer una determinación del contenido de ambos enantiómeros en la muestra original. Alternativamente, en las técnicas cromatográficas el auxiliar quiral puede ser la misma fase estacionaria (columnas quirales) y la diferente distribución de los enantiómeros en esta fase estacionaria ser la responsable de la separación.

El contenido enantiomérico de una mezcla de estereoisómeros se puede expresar de distintas maneras⁷. En polarimetría es habitual expresarlos como pureza óptica P (%), según la siguiente fórmula:

$$P(\%) = \frac{\alpha}{\alpha_{\max}} \times 100 \quad (3.2)$$

Donde α_{\max} es el poder óptico rotatorio específico del compuesto puro y α el poder óptico rotatorio específico de la mezcla. El exceso enantiomérico (ee, ecuación 3.3) y la pureza enantiomérica (pe, ecuación 3.4) son otras formas habituales.

$$ee = \frac{R - S}{R + S} \times 100 \quad (3.3)$$

$$pe = \frac{R}{R + S} \times 100 \quad (3.4)$$

Siendo S el enantiómero minoritario en ambos casos.

3.5.2 Técnicas de análisis espectroscópicas

Las técnicas quirópticas que incluyen la polarimetría, la dispersión óptica rotatoria (ORD) y el dicroísmo circular (DC) son las técnicas espectroscópicas de análisis más habituales aunque también otras técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) ha sido aplicada. La polarimetría es el método de análisis más común para la determinación de purezas ópticas. La única propiedad física que distingue entre sustancias quirales y aquirales es la capacidad de las primeras de rotar el plano de la luz polarizada plana (LPP). Un rayo de luz consta de dos planos oscilantes perpendiculares, correspondientes a los campos

eléctrico y magnético; estos planos, a su vez, son perpendiculares a la dirección de propagación del rayo de luz. En un rayo de luz ordinaria se observa como las oscilaciones de los campos eléctrico y magnético ocurren en todos los planos posibles, mientras que la LPP sólo oscila en un plano. La LPP es la suma de dos componentes polarizados circularmente, uno a la izquierda (LPCI) y otro a la derecha (LPCD), de la misma amplitud (figura 3.9). El fenómeno de la actividad óptica viene determinado por los índices de refracción para la luz polarizada circularmente a la derecha (LPCD) y la polarizada circularmente a la izquierda (LPCI) del medio considerado.

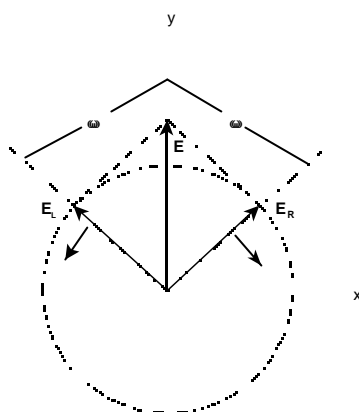


Figura 3.9. Representación del vector eléctrico E como resultante de dos vectores rotatorios E_L y E_R

En un medio ópticamente inactivo los índices de refracción para ambos componentes de la luz polarizada son iguales. Sin embargo, en un medio ópticamente activo, los índices de refracción son diferentes, por lo que los dos componentes de la LPP se desfazan uno con respecto al otro (viajan en el medio a diferente velocidad), dando lugar a un vector resultante igual al de incidencia pero con el plano de polarización rotado α grados (ecuación 3.5).

$$\alpha = \frac{1800 b(\eta_L - \eta_R)}{\lambda} \times 100 \quad (3.5)$$

Donde b es el camino óptico de la celda de medida, η_L y η_R los índices de refracción para la componente polarizada circularmente a la izquierda y a la derecha, respectivamente, y λ la longitud de onda de la radiación utilizada. La rotación específica, a una determinada longitud de onda y temperatura, viene dada por:

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \frac{100\alpha}{bC} \quad (3.6)$$

donde C representa la concentración y b el camino óptico. Este valor es el que se compara con la rotación específica del enantiómero puro (según ecuación 3.2) y se estima así la pureza óptica de la mezcla problema.

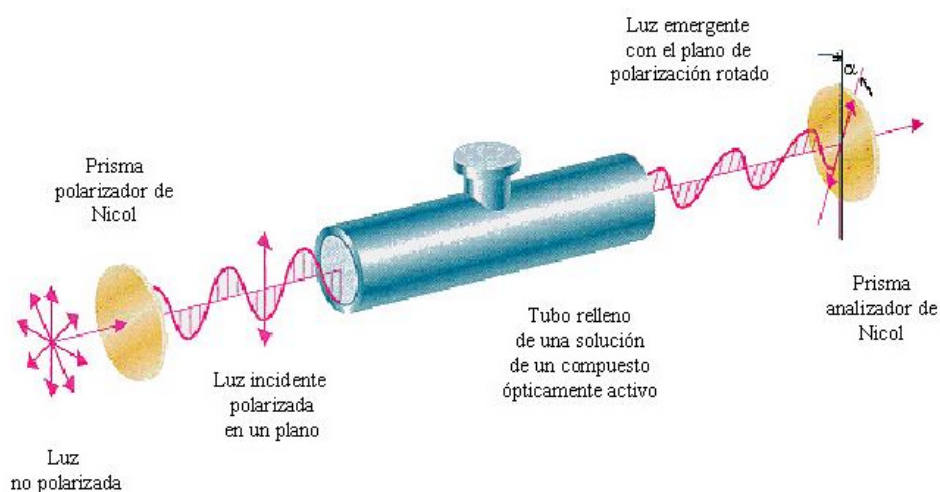


Figura 3.10 Esquema de un polarímetro

La polarimetría proporciona datos de pureza óptica rápidos y de forma sencilla, sin embargo su aplicación a la determinación exacta de excesos enantioméricos elevados es muy limitada por una serie de razones⁸:

- El conocimiento de la rotación óptica específica del enantiómero puro es imprescindible
- Este valor (como cualquier otra rotación óptica) depende de múltiples factores: pH, concentración del analito, temperatura, naturaleza o pureza del solvente.
- El analito debe poseer un poder óptico rotatorio medio o alto para poder determinar correctamente pequeñas diferencias de excesos enantioméricos
- Una cantidad relativamente elevada de muestra es necesaria
- La muestra no debe contener ningún otro analito quiral que contribuya al poder óptico rotatorio total.

La dispersión óptica rotatoria (ORD) es una extensión de la polarimetría a n longitudes de onda por lo que también es denominada espectropolarimetría. Comparte entonces sus ventajas y limitaciones. Las curvas de ORD muestran un aumento hiperbólico de intensidad al disminuir la λ sin observarse cambio en la dirección de rotación, siempre y cuando el medio quiral no absorba luz. En este caso se trata de una ORD normal. No obstante, cuando se mide a una longitud de onda en una banda de absorción del compuesto se puede observar una dispersión anómala, una curva sigmoideal que se superpone a la curva normal de ORD. Esta anomalía en la dispersión, que supone un cambio en la dirección de la rotación, es llamado efecto Cotton. En el caso más sencillo, cuando sólo existe un efecto Cotton, la distancia entre el máximo y el mínimo de la curva puede utilizarse para medidas cuantitativas.

La espectroscopia de dicroísmo circular (DC)⁹ es la más sofisticada de las técnicas quirópticas porque consiste en una medida simultánea de una rotación y una absorción de la radiación polarizada. Cuando un medio quiral absorbe luz no sólo tiene lugar la rotación del plano de la LPP, sino que además los dos componentes circulares del haz pueden ser absorbidos en diferente grado ($\epsilon_L - \epsilon_R$) de forma que el rayo incidente de luz polarizada plana emerge como un rayo polarizado elípticamente, cuyo eje mayor está rotado α grados (figura 3.11). El hecho que los dos componentes de la luz polarizada plana se absorban en diferente extensión provoca que su suma ya no genere una luz polarizada en un plano sino una elipse cuya relación entre ejes es denominada elipticidad (ψ). Por convención, la diferencia $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ es denominada dicroísmo y se mide mediante ψ o bien mediante la diferencia de absorbancia medida para ambos componentes.

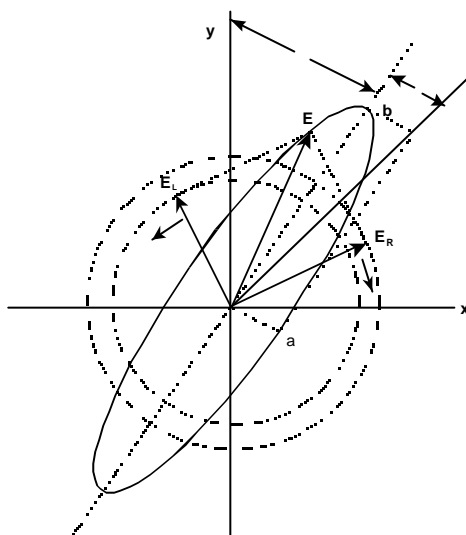


Figura 3.11. Representación de las componentes circularmente polarizadas a la derecha y a la izquierda de la LLP al atravesar una sustancia ópticamente activa cuando hay absorción de radiación.

La elipticidad (en radianes) puede calcularse a través de la siguiente expresión:

$$\psi = 2.303(\epsilon_L - \epsilon_R)bC \quad (3.7)$$

Siendo b el camino óptico y C la concentración del soluto quiral absorbente. Como puede observarse, la relación entre la elipticidad y la concentración es análoga a la ley de Lambert-Beer. Los dos enantiómeros de un compuesto presentan un espectro de DC idéntico pero de signo contrario de tal manera que una mezcla de ambos presenta una señal que es la diferencia de ambos espectros. Si se conoce la elipticidad de un enantiómero puro por comparación puede calcularse la pureza óptica de una mezcla. No obstante, este tipo de análisis tiene los mismos inconvenientes expuestos para la polarimetría.

La resonancia magnética nuclear (RMN) ha sido otras de las técnicas espectroscópicas usadas en el análisis de sustancias quirales. Esta técnica no diferencia entre enantiómeros al menos que éstos hayan sido convertidos en diastereoisómeros por reacción con un reactivo quiral. De esta forma, los picos idénticos que aparecen en el espectro de ambos enantiómeros, aparecen con un desplazamiento químico diferente al formarse los diastereoisómeros. La relación molar de éstos (y, por tanto, de los enantiómeros) puede ser determinada por las intensidades relativas de los picos.

La derivatización de enantiómeros con un auxiliar quiral formar diastereoisómeros (método directo) es la opción más usada para la determinación de purezas ópticas mediante RMN en contra de los reactivos quirales lantánidos o los agentes quirales solvatantes que forman complejos diastereoisoméricos transitorios (método indirecto). La tabla 3.4 resume los agentes derivatizantes quirales más usuales en RMN de hidrógeno y fluor-19.

Tabla 3.4 Algunos agentes derivatizantes quirales usados en RMN

Acido R-O-acetilmandélico
R,R-2,3-butandiol
Ácido camfánico
R-2-fluoro-2-feniletilamina
Ácido S-O-metilmandélico

Los reactivos lantánidos quirales son compuestos de coordinación seis que forman complejos de adición débiles con una gran cantidad de sustancias orgánicas. La tabla 3.5 indica alguno de estos agentes quirales:

Tabla 3.5 Ejemplos de reactivos lantánidos quirales

L en LnL ₃	Lantánido (L)	Abreviatura
Dicamfoil-d-metanato-heptafluorodihidroximetileno-d-camforato	Eu	Eu(dcm) ₃
Pivaloil-d-camforato-trifluorohidroximetileno-d-camforato	Eu	Eu(hfc) ₃
	Yb	Yb(hfc) ₃
	Pr	Pr(hfc) ₃

Estos agentes quirales provocan desplazamientos diferenciados para los enantiómeros de un analito en el espectro de RMN de ¹H y ¹³C.

Los agentes quirales solvatantes son la otra alternativa para diferenciar la señal de RMN de dos enantiómeros. Estos solventes forman complejos diastereoisoméricos de solvatación de diferente extensión con los dos enantiómeros del analito vía un rápido equilibrio reversible. Este método es simple y ha sido usado para la determinación de la pureza enantiomérica de lactonas o éteres. El agente solvatante más habitual es el 1-(9-antril)-2,2,2-trifluoroetanol (TFAE) que provoca desplazamientos químicos de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C .

3.5.3 Técnicas de análisis cromatográficas

Las técnicas cromatográficas son técnicas habituales usadas para la separación y posterior determinación de los enantiómeros de un compuesto. Entre ellas destacan por el número de aplicaciones la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (GC). Sin embargo, también existen aportaciones interesantes de la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) o la cromatografía de capa fina (CCF)¹⁰. A pesar del gran éxito de las técnicas cromatográficas en el análisis quiral existen también algunas fuentes potenciales de error en la determinación de excesos enantioméricos: (ee). Por ejemplo;

- enantiomerización de compuestos lábiles en la fase estacionaria quiral: algunos analitos pueden invertir su configuración cuando interactúan con la fase estacionaria quiral. En este caso el ee se desplazará hacia el primer enantiómero en eluir (el de menor retención).
- contaminación del pico del analito con impurezas: la matriz que acompaña al analito, puede contener alguna especie interferente. La adecuada selección de los parámetros cromatográficos que afectan a la separación evita este problema.
- respuesta no-lineal del detector: para poder determinar el ee, es necesario conocer la concentración del enantiómero mayoritario y minoritario. Puede ocurrir que algunas de las dos determinaciones se produzca fuera del intervalo de linealidad del método.

HPLC es una técnica exitosa en la separación de enantiómeros tanto por el método directo como por el indirecto. Las sustancias quirales habitualmente separadas en forma de diastereoisómeros son aminas, alcoholes y ácidos carboxílicos porque poseen grupos funcionales que facilitan su derivatización. Esta derivatización tiene como objetivo permitir la resolución quiral pero también puede aprovecharse para mejorar las propiedades de detección del analito (derivatización con un cromóforo o fluoróforo quiral). Algunos agentes derivatizantes quirales se muestran en la tabla 3.5.

Sin embargo, siempre que es posible, el método directo es la opción elegida. Podemos distinguir dos posibilidades: la adición de un reactivo quiral a la fase móvil o el uso de una fase estacionaria quiral. Estos aditivos quirales añadidos a la fase móvil se conocen como selectores quirales y hablamos entonces de interacciones selector-selectante (analito). Entre los selectores quirales más habituales en HPLC podemos incluir a los complejos metálicos, las ciclodextrinas y los contraiones quirales.

La separación quiral mediante complejos metálicos se fundamenta en el fenómeno del intercambio de ligandos entre un quelato consistente en un cation central (Cu(II), Zn(II o Ni(II)) más dos ligandos quirales bifuncionales (normalmente aminoácidos) y los enantiómeros del analito. El analito sustituye uno de los ligandos quirales para formar un complejo ternario mixto. La enantioseparación es posible debido a la diferente estabilidad de los complejos con los enantiómeros R y S. Este intercambio de ligandos se produce en la fase móvil y la separación se lleva a cabo en fases estacionarias tradicionales (C₈,C₁₈).

Tabla 3.6. Complejos metálicos usados en la resolución de compuestos quirales mediante cromatografía de intercambio de ligandos

Ligando	Catión Metálico	Fase Estacionaria	Analito
L-prolina	Cu ²⁺	Octilo-silica	Aminoácidos
L-fenilalanina	Cu ²⁺	Octadecilo-silica	Acido mandélico y derivados
L-histidina	Cu ²⁺	Octilo-silica	Aminoácidos
R,R-ácido tartárico	Cu ²⁺ ,Ni ²⁺	Octadecilo-silica	Aminoácidos

Las ciclodextrinas (α , β o δ) son oligosacáridos cíclicos consistente en seis, siete u ocho anillos de glucopiranososa respectivamente. Tienen una forma de cono truncado con una cavidad relativamente hidrofóbica que puede albergar a una gran variedad de compuestos (complejos host-guest). Las ciclodextrinas son quirales y en consecuencia cuando actúan como huésped incluyen en su interior en diferente extensión a los enantiómeros de un compuesto. Por tanto, añadidas como un aditivo a la fase móvil permiten la separación de enantiómeros en columnas aquirales.

Otra posibilidad, es la separación de enantiómeros haciendo uso de la formación de pares iónicos. Analitos que contienen un grupo amino pueden formar un par iónico con un contraión como el ácido (+)-10-camforsulfónico. Si el analito es quiral, sus enantiómeros formaran complejos de diferente estabilidad y su separación será posible.

No obstante, la opción más habitual para conseguir la separación es el uso de fases estacionarias quirales (CSP). Estas separaciones consisten en la diferente partición que presentan los analitos con estas fases estacionarias capaces de reconocer diferencias estereoquímicas. El número de CSPs disponibles comercialmente y las posibilidades de separación son múltiples por lo que existe en la bibliografía tratados específicos sobre el tema¹¹. En esta memoria, sólo se comenta brevemente la división y el fundamento de las CSP más comunes.

Tabla 3.7 Fases estacionarias quirales disponibles comercialmente (DNB=dinitrobenzoilo)

Tipo	Nombre	Unidad Quiral	Fase móvil habitual	Distribuidor
Pirkle	BakerbondChiral	S-DNB-leucina	Hexano/isopropanol	Baker
	Spherisorb Chiral 2	R-Naftiletilurea	Hexano/isopropanol	PhaseSep
	Covalent L-leucina	S-DNB-leucina	Hexano/isopropanol	Regis/Alltech
Ligando	Chiralpak WM	Aminoacido-Cu(II)	Tampón acuoso	Daicel
Celulosa	Chiralcel CA-1	Triacetato de celulosa	Tampón acuoso	Daicel
	Chiralcel OD	Carbamato de trifenilcelulosa	Tampón acuoso	Daicel
Inclusión	ChiraDex	β -ciclodextrina	Tampón acuoso	Merck
	CrownPack CR	Éter quiral	HClO ₄ (aq)	Daicel
Proteína	Chiral-AGP	α -glicoproteína	Tampón fosfato-solvente orgánico	Baker

Las columnas quirales tipo Pirkle o *brush-type* CSP son las más extendidas porque son más baratas y resistentes que aquellas basadas en polímeros naturales (proteínas, celulosa, ciclodextrinas...). Además están disponibles en su forma R y S, lo que permite invertir el orden de elución de los enantiómeros si es necesario y permiten además usarlas en modo preparativo. No obstante presentan algunas desventajas que limitan su uso como la necesidad de analitos con algún grupo aromático y de polaridad baja o media. Esto se debe al mecanismo de enantiodiscriminación que se esquematiza en la figura 3.12.

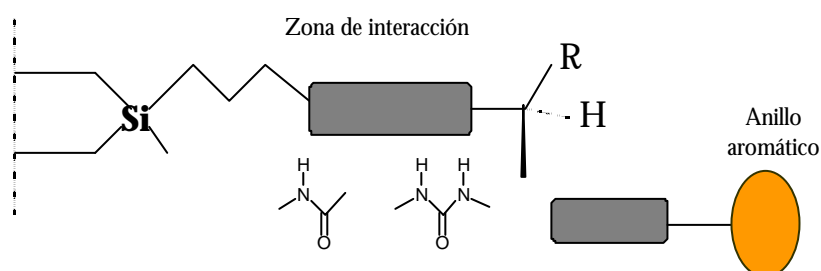


Figura 3.12. Representación esquemática de una columna tipo Pirkle.

La enantiodiscriminación se basa en una interacción triple de carácter secundario como fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno o interacciones ácido-base. No obstante, la interacción más importante en este tipo de columnas son las interacciones electrostáticas π - π entre el anillo aromático del analito y el grupo amida, carbomato o urea de la zona de interacción de la columna. Este enlace secundario no es estereoespecífico pero “ancla” el analito a la columna. La parte quiral del analito entonces interacciona de forma estereoespecífica con la cadena terminal de la columna.

Las fases estacionarias basadas en el fenómeno del intercambio de ligandos se fundamentan en el mismo fenómeno explicado para el selector libre adicionado a la fase móvil (pág 20). El inconveniente de estas columnas es su poca universalidad ya que sólo se pueden enantioseparar analitos capaces de intercambiarse con los ligandos del complejo de Cu (II) como los aminoácidos o aminoalcoholes. Otro tipo de columnas de elevado uso son las de celulosa o derivados como unidad quiral. La celulosa es un polímero compuesto por unidades de D-(+)-glucosa y por tanto puede discriminar entre los enantiómeros de un compuesto. Las propiedades de adsorción o de discriminación quiral pueden ser modificadas derivatizando los grupos OH de la celulosa con grupos como el acetato, el benzoato o el carbamato generándose así una gran variedad de fases estacionarias quirales.

El fenómeno de la inclusión también ha sido aprovechado para proponer fases estacionarias con ciclodextrinas o éteres coronas quirales. Las columnas de ciclodextrinas son relativamente estables y pueden ser diseñadas en unas dimensiones que permitan su uso en modo preparativo. Sin embargo, presentan una capacidad de enantiodiscriminación menor que añadidas como selector quiral a la fase móvil probablemente porque su unión a la fase estacionaria implica que queden ligadas en una conformación fija que dificulta más la inclusión que cuando están libres en disolución. Las columnas de éteres corona quirales se emplean para enantiodiscriminar analitos que contengan algún grupo amino primario y presentan el inconveniente de su elevado coste económico. Fases estacionarias con proteínas como elemento de reconocimiento quiral también han sido descritas siendo la de α -glicoproteína y la de albúmina sérica humana las más habituales.

Un gran número de monografías y revisiones bibliográficas sobre la aplicación de la CG a las separaciones quirales han sido publicadas^{12,13}. El desarrollo de la CG como técnica de análisis quiral viene ligada a separaciones enantioméricas de aromas y feromonas. En la actualidad, algunos pesticidas, insecticidas y auxiliares quirales en síntesis de naturaleza volátil han sido analizados por Chiral GC. Estas enantioseparaciones son dependientes de la temperatura e incluso puede haber un cambio del orden de elución de los enantiómeros a una temperatura dada (T_{iso} o temperatura isoenantioselectiva). Durante un largo periodo de tiempo, la conversión a diastereoisómeros fue el único método de análisis disponible para

separar enantiómeros. Estas aplicaciones hacen uso de auxiliares quirales como el (-)-mentol o el R,R-2,3-butandiol (tabla 3.8).

Tabla 3.8. Algunos auxiliares quirales usados en GC y HPLC para separaciones quirales indirectas.

Auxiliar quiral	Comentario
Acido 2-acetil- D-láctico	Para formar ésteres con alcoholes quirales
R-(-)-2-Butanol	Para formar ésteres con ácidos o glicósidos con monosacáridos
1R,3R,4S-(-)-Mentol	Idem con amionoácidos o hidroxíácidos
2R,3R-(-)-Butandiol	Para forma acetales cíclicos con cicloalcanonas o hidrocarburos con un grupo carbonilo.

Sin embargo, esta opción está actualmente en desuso y se prefiere la separación directa de los enantiómeros en columnas quirales. El método indirecto sólo se aplica cuando se consigue una mejora en la sensibilidad o en la volatilidad del analito como por ejemplo haciendo uso de auxiliares quirales con átomos de halógeno en su estructura que permiten mejorar los límites de detección en el detector de captura electrónica (ECD). Las columnas quirales en GC se fundamentan en los mismos principios de separación expuestos para las columnas de HPLC siendo las columnas de ciclodextrinas y las tipo Pirkle las más habituales.

La cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) y técnicas relacionadas¹⁴ se ha mostrado desde su introducción como técnica de análisis de moléculas quirales como una alternativa válida a las técnicas cromatográficas más establecidas (HPLC y GC). Los fluidos supercríticos tienen un poder de solvatación cercano al de los líquidos pero mantienen la baja viscosidad de los gases. Estas propiedades permiten el análisis de compuestos no volátiles o térmicamente inestables que no son adecuados para GC y mantener una buena eficiencia de la separación (superior a la que se obtiene en HPLC). En el campo de las separaciones quirales, SFC se lleva a cabo usualmente con dióxido de carbono supercrítico como eluyente (más algún modificador orgánico) y las mismas columnas quirales descritas para HPLC (tabla 3.7). En general, SFC permite obtener mejores resoluciones quirales (picos más estrechos) y menores tiempos de análisis. Esta reducción del tiempo de análisis está relacionada con la menor viscosidad del fluido supercrítico (comparado con el líquido) lo que permite el uso de caudales más elevados y de columnas más largas (o incluso varias columnas en serie) porque la caída de presión a lo largo del sistema es menor. Otra ventaja de la técnica es la posibilidad de usarla en modo preparativo y obtener así pequeñas cantidades de los enantiómeros puros. Sin embargo, también presenta inconvenientes básicamente relacionados con su alto coste porque a parte del uso de CSPs de precio elevado y estabilidad reducida hay que añadir los costes instrumentales derivados de utilizar un fluido supercrítico (dispensador de dióxido de carbono, reguladores de presión que eviten su expansión a gas, celdas especiales de medida etc).

3.5.4 Aplicación de la electroforesis capilar a las separaciones quirales

En el capítulo 2 se han expuesto las ventajas generales de la CE como técnica de separación y sus campos de aplicación. En el campo de las separaciones quirales, CE es una técnica muy exitosa, prueba de ello son las múltiples revisiones bibliográficas aparecidas^{15,16,17} o la publicación de tratados específicos del tema¹⁸. Entre estas revisiones destacan la de Verleysen¹⁹ et al. que incluye más de 350 referencias y la de Gübitz²⁰ et al. que reporta condiciones de separación de más de 250 analitos quirales. Estas separaciones se llevan a cabo básicamente en el modo CZE o MEKC añadiendo al BGE un selector quiral que discrimina entre los dos enantiómeros (método directo). Las ventajas que ofrece la CE en las separaciones quirales son varias:

- Su alta eficacia en la separación permite que una pequeña diferencia de estabilidad entre los enantiómeros del selectante y del selector provoque enantioseparación. Esta pequeña discriminación quiral probablemente no sería detectada mediante otra técnica cromatográfica
- La concentración y naturaleza del BGE puede ser rápidamente modificada lo que aumenta la capacidad de resolución de la técnica. Esta versatilidad no es posible con técnicas que usan selectores quirales inmovilizados
- El hecho que el selector quiral este libre en disolución favorece la interacción con el selectante porque no está en una conformación fija como cuando está inmovilizado
- Una combinación de selectores quirales puede ser usada para mejorar la resolución quiral
- El mínimo consumo de muestra y reactivos permite el uso de selectores quirales caros

No obstante, todas estas ventajas pueden ser resumidas en una sola, la probabilidad de éxito. Comparada con otras técnicas análogas, la probabilidad de conseguir la separación quiral de un analito mediante CE es superior. Esto es aún más evidente cuando se pretende separar y enantioseparar simultáneamente una mezcla de compuestos quirales (por ejemplo metabolitos de un fármaco). Este problema analítico es difícil de abordar con técnicas de menor poder de resolución o la solución puede necesitar de condiciones de separación diferentes para algunos analitos de la mezcla.

Sin embargo, las separaciones quirales mediante CE también presentan inconvenientes:

- La separación quiral depende de múltiples factores; pH del BGE, concentración y naturaleza del BGE, fuerza iónica del BGE o temperatura del capilar. La optimización de estos parámetros es básicamente empírica lo que dificulta el desarrollo del método.

- La presencia del selector quiral en el BGE complica el acoplamiento de la técnica con detectores como el polarimétrico, el dicroísmo circular o el espectrómetro de masas (MS). Esto último es una limitación importante para la aplicación de la Chiral CE a muestras con matrices complejas donde el uso de un detector tan selectivo como el MS es necesario.
- No es posible su uso en modo preparativo para obtener fracciones de los enantiómeros puros.

Los principios de la separación quiral mediante CE son varios de los cuales los más importantes son:

1. *Complejación por intercambio de ligandos*. Como ya se ha comentado, los enantiómeros de un compuesto pueden formar complejos de diferente estabilidad con un complejo constituido por un ión metálico (Cu^{2+} , Ni^{2+}) y un aminoácido ópticamente puro. La adición del analito provoca la sustitución de uno de estos aminoácidos por el analito para formar un complejo ternario.

2. *Complejación host-guest o de inclusión*: los complejos en los que el analito (molécula *guest*) es espacialmente incluido en el interior de un ligando (molécula *host*) son llamados complejos *host-guest* o de inclusión. De esta forma, ciertos compuestos quirales que tienen la capacidad de actuar como *host* son utilizados para formar complejos con un elevado número de compuestos de interés, con el fin de conseguir su resolución enantiomérica. Estos compuestos son los siguientes:

- *Éteres corona*²¹. Los éteres corona son poliéteres macrocíclicos consistentes en un cierto número de átomos de oxígeno, que forman un plano, unidos por cadenas de dos carbonos, algunos de los cuales contienen grupos -COOH. El anillo crea una cavidad capaz de formar complejos con cationes alcalinos y alcalinotérreos, así como aminas primarias protonadas. La amina primaria puede penetrar en la cavidad formando enlaces de hidrógeno con los átomos de O; no obstante, la enantioseparación proviene, en general, de la interacción entre los sustituyentes del centro asimétrico y los grupos -COOH del anillo mediante interacciones de enlace de hidrógeno y/o electrostáticas.

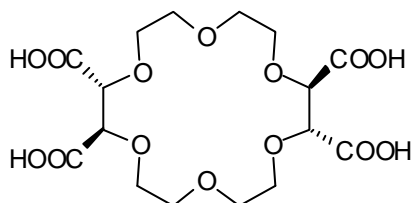


Figura 3.13. Estructura del (+)-(18-Crown-6)-2,3,11,12-tetra-carboxylic acid

- *Antibióticos macrocíclicos*²² :como el Rifamycin B, Vancomycin o Teicoplanin. Estos compuestos pueden exhibir una enantioselectividad superior a las de las ciclodextrinas. Las interacciones principales entre estos selectores quirales y los analitos son interacciones electrostáticas, mientras que las secundarias son interacciones de puente de hidrógeno, hidrofóbicas, dipolo-dipolo o G-G. A pesar de su alta enantioselectividad y poder de resolución, también presentan ciertos problemas como una alta absorción en el UV, adsorción en la pared del capilar e inestabilidad a ciertos pHs y temperaturas.

- *Ciclodextrinas (CDs)*¹². Las ciclodextrinas naturales α , β y γ -CD o sus análogas modificadas químicamente han sido ampliamente utilizadas. Su forma es la de un cono truncado de extremos abiertos, con un diámetro de la cavidad determinado por el número de unidades de glucosa (tabla 3.8). Las ciclodextrinas son muy estables, resistentes a la luz y no absorben apreciablemente en el UV-visible.

Tabla 3.8 Propiedades físico-químicas de las ciclodextrinas naturales

Parámetro	α-CD	β-CD	γ-CD
Unidades de glucosa	6	7	8
Masa molecular	972	1135	1297
Diámetro interno de la cavidad (Å)	5,7	7,8	9,5
Diámetro externo de la cavidad (Å)	13,7	15,3	16,9
Solubilidad en agua (25°C) (% w/v)	14,5	1,8	23,2

La cavidad de las CDs es relativamente hidrofóbica, mientras que la superficie es hidrofílica. Los sustituyentes hidroxilo en las posiciones 2 y 3 (hidroxilos secundarios), y 6 (hidroxilos primarios) de cada unidad de glucosa son los responsables de las interacciones quirales, puesto que están unidos a carbonos asimétricos. La separación enantiomérica se basa en la inclusión de una función aromática o alquílica en la cavidad, más enlaces de hidrógeno adicionales entre los grupos hidroxilo secundarios de la ciclodextrina y sustituyentes de la molécula *guest*. Los cinco átomos de carbono asimétricos de cada unidad de glucosa confieren a las ciclodextrinas sus propiedades quirales. Las ciclodextrinas naturales, especialmente la β -CD, pueden ser derivatizadas para dar nuevos selectores quirales, tanto neutros como cargados, con una capacidad enantioselectiva diferente a la de la ciclodextrina natural.

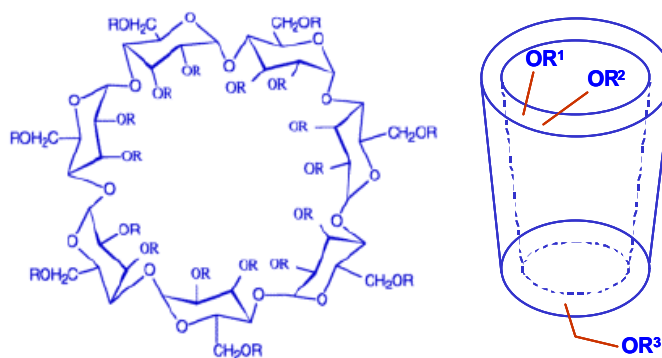


Figura 3.14 Estructura general de una ciclodextrina y esquema de su cavidad

- *Calixarenos quirales*²³. Los calixarenos forman también complejos de inclusión, pero hasta ahora su utilización ha sido mínima.

3. Interacciones de afinidad con *polisacáridos lineales*²⁴. Estos selectores son de origen biológico y consisten en varias unidades de monosacáridos quirales. A este grupo pertenecen las maltodextrinas, los maltooligosacáridos como el dextrín y el dextrán. La estructura helicoidal de las dextrinas podría ser la responsable del reconocimiento quiral, siendo las interacciones principales los enlaces de hidrógeno y las interacciones dipolo-dipolo.

4. Interacciones de afinidad con *proteínas*²⁵. Estos selectores quirales son compuestos naturales formados por aminoácidos en su estructura polimérica, que pueden estar cargados positiva o negativamente, o neutros, dependiendo del pH del BGE. En función del pH los puntos de interacción entre analito y proteína cambian, modificándose así la estereoselectividad. Entre las proteínas utilizadas para la separación enantiomérica destacan la albumina sérica humana o el avidin.

5. Utilización de *micelas*²⁶. En el caso de la MEKC la separación de enantiómeros puede realizarse por medio del uso de micelas quirales (sales biliares como colato o taurocolato sódico, o derivados de aminoácidos, como el N-dodecanoil-L-valinato o N-dodecanoil-L-alinato sódico), o mediante la combinación de micelas y ciclodextrinas (CD-MEKC). En esta última modalidad, el analito se distribuye entre la fase micelar y la ciclodextrina, y prácticamente no existe en la fase acuosa.

6. Interacción con un *selector quiral enlazado a la pared del capilar* o con un *capilar relleno de una fase estacionaria quiral* en CEC²⁷.

Desde su aparición como técnica de análisis quiral, la elección de un principio de separación o otro de los anteriormente expuestos ha sido básicamente empírica. Sin embargo, después de más de una década de investigación en este campo se observan en la literatura algunas tendencias que ayudan a elegir el tipo de selector quiral más adecuado para un analito dado. Este es el objetivo del anexo VI de esta memoria, donde se proponen pautas para la correcta elección del selector quiral en función de la estructura del selectante y se discuten las posibilidades de los selectores quirales expuestos anteriormente.

Para las CDs, que constituyen los selectores quirales de mayor uso, se ha desarrollado un modelo teórico para explicar la enantioseparación²⁸. No obstante, es un modelo genérico que puede ser aplicado a cualquier otro selector neutro que forma complejos 1:1 con el analito.

Para dos enantiómeros A y B, que interaccionan con un selector quiral C, para dar los complejos AC y BC pueden escribirse las siguientes ecuaciones químicas:



La movilidad electroforética de cada enantiómero será función lineal de su movilidad en forma libre y de la movilidad del complejo según:

$$\mu_A = \alpha_A \mu_1 + \alpha_{AC} \mu_2 \qquad (3.10)$$

$$\mu_B = \alpha_B \mu_1 + \alpha_{BC} \mu_3 \qquad (3.11)$$

Donde $\alpha_A, \alpha_{AC}, \alpha_B, \alpha_{BC}$ son las fracciones molares de las especies A, AC, B y BC respectivamente: μ_1 , la movilidad del soluto libre, y μ_2 la movilidad del complejo AC. Obsérvese en la ecuación 3.11, que el término μ_3 , la movilidad del complejo BC es igual al término μ_2 ya que ambos complejos tienen la misma relación carga-radio por lo que denominaremos a partir de ahora μ_2 a la movilidad de cualquiera de los dos complejos. Los términos de las fracciones molares pueden expresarse como:

$$\alpha_A = \frac{[A]}{[A] + [AC]} \qquad (3.12)$$

$$\alpha_B = \frac{[B]}{[B] + [BC]} \qquad (3.13)$$

Expresiones análogas pueden encontrarse para los términos α_{AC} y α_{BC} . Si sustituimos estos términos en la ecuación 3.10 obtenemos :

$$\mu_A = \frac{\mu_1 + \mu_2 K_1 [C]}{1 + K_1 [C]} \quad (3.14)$$

donde K_1 es la constante de equilibrio del complejo AC (también llamada constante de inclusión) y $[C]$ la concentración de selector quiral. Se puede hallar una expresión similar para el enantiómero B si sustituimos K_1 por K_2 . La resolución será proporcional a la diferencia de movilidades entre los dos enantiómeros ($\Delta\mu = \mu_A - \mu_B$). Si reemplazamos en esta expresión las movilidades descritas por la ecuación 3.14 llegamos a:

$$\Delta\mu = \frac{[C](\mu_2 - \mu_1)(K_1 - K_2)}{1 + (K_1 + K_2)[C] + K_1 K_2 [C]^2} \quad (3.15)$$

Se deduce que en medio aquiral donde no existe selector quiral ($[C]=0$) la separación quiral no es posible porque ambos enantiómeros presentarán igual movilidad electroforética. Esta separación será mayor cuanto mayor sea la diferencia en las constantes de inclusión de ambos analitos ($K_1 - K_2$) y cuanto mayor sea la diferencia de movilidad entre las formas complejadas y los enantiómeros libres.

Como la diferencia de movilidad entre los enantiómeros es función de la concentración de selector quiral si derivamos la expresión 3.15 respecto a esta concentración e igualamos a cero podemos hallar para que concentración de selector quiral la diferencia de movilidad electroforética es máxima. Esta operación conduce a la siguiente expresión:

$$C_{\text{óptima}} = \frac{1}{\sqrt{K_1 K_2}} \quad (3.16)$$

El modelo predice entonces que los enantiómeros con una alta afinidad por el selector quiral necesitarán una concentración de éste más baja para optimizar la resolución quiral.

La aplicación de la CE en las separaciones quirales fue calificada por Vespalec¹⁵ en 1999 como una técnica madura con un número de publicaciones que crece exponencialmente cada año y con un fundamento teórico y una descripción matemática disponible. En definitiva, consideraban que el período de investigación inicial de la CE en este campo había llegado a su fin. Recientemente, Chankvetadze¹⁷ se expresa en términos parecidos y reflexiona sobre la necesidad de aplicar la Chiral CE a problemáticas como la determinación de purezas enantioméricas en muestras reales que ayuden a la aceptación de la Chiral CE no sólo a nivel académico sino también industrial.

La aplicación de la CE a la determinación de purezas enantioméricas ha sido reducida⁵ y algunos ejemplos se muestran en la tabla 3.9. La gran resolución necesaria y otros problemas relacionadas con la sensibilidad han sido en parte las causa de este desinterés. Aquellas aplicaciones que reportan resoluciones a línea base no podrían aplicarse a la determinación de excesos enantioméricos. En el caso de muestras reales (no mezclas sintéticas como la mayoría de los ejemplos de la tabla 3.9) pueden aparecer otros problemas relacionados con la matriz puede contener analitos interferentes.

Tabla 3.9. Algunas determinaciones de purezas enantioméricas mediante CE

Enantiómero detectado	Impureza Enantiomérica (%)	Selector quiral usado	Detección
D-Loxiglumida ²⁹	0.2	1mM Vancomycin	UV 255 nm
(-)-Isoproterenol ³⁰	0.1	25 mM Ryfamycin	Indirecta UV 350 nm
(+)-Fluparoxan ³¹	1.0	150mM β -CD	UV 214 nm
D-Triptofano ³²	0.05	75mM α -CD	UV 214 nm
(R)-Ropivacaina ³³	0.25	100mg/ml Met β -CD ^a	CE-MS
(R)-Ketoprofeno ³⁴	0.20	50mM TM- β -CD ^a	UV 254 nm

^aDerivados metilados de la β -CD; mometilada (Met- β -CD) y trimetilada (TM- β -CD)

Referencias

- ¹ U.S. Food and Drug administration. *Chirality* 1992, 4, 338-340
- ² Blumenstein J.J. *Chiral Drugs: regulatory aspects*. In: *Chirality in Industry II*. 1997. John Wiley & Sons, Chichester .
- ³ Simonyi, M. *Problems and Wonders of Chiral Molecules*. 1990, Akademiai, Budapest.
- ⁴ Sheldon, R.A. *Chirotechnology: industrial synthesis of optically active compounds*. 1993, Marcel Dekker, NY.
- ⁵ Sarfati, J. Origin of life :the chirality problem <http://www.answersingenesis.org/docs/3991.asp>. 1998.
- ⁶ Bidleman, F.T., Falconer, R.L. *Environmental Science & Technology*. 1999, 33, 206A-209 A.
- ⁷ Wan, H., Blomberg, L.G. *Electrophoresis*. 2000, 21,1940-1952.
- ⁸ Schreier, P. *Analysis of Chiral Organic Molecules:methodologies and applications*. 1995, Walter de Gruyter, NY.
- ⁹ Purdie, N., Brittain, H.G. *Analytical Applications of Circular Dichroism*. 1994, Elsevier, Amsterdam.
- ¹⁰ Ward, T.J. *Anal Chem*. 2000, 72, 4521-4528.
- ¹¹ Lough, W.J. *Chiral Liquid Chromatography*. 1989, Chapman & Hall, Glasgow.
- ¹² König, W.A. *The Practice of Enantiomer Separation by Capillary Gas Chromatography*. 1987, Hüthig, Heidelberg.
- ¹³ Allenmark, S. *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications*. 1991, 2Ed, Horwood, Chichester
- ¹⁴ Phinney, K.W. *Anal. Chem* . 2000, March 1, 205A-211A.
- ¹⁵ Vespaec, R., Boèek, P.*Electrophoresis*. 1999, 20, 2579-2591.
- ¹⁶ Fanali, S. *J.Chromatogr A*. 2000, 875, 89-122.
- ¹⁷ Blaschke, G., Chankvetdaze, B. *J.Chromatogr A*. 2000, 875, 3-25.
- ¹⁸ Chankvetdaze, B. *Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis*. 1997, Wiley, New York.
- ¹⁹ Verleysen, K., Sandra, P. *Electrophoresis*. 1998, 19, 2798-2833.
- ²⁰ Gübitz, G., Schmid, M.G. *J.Chromatogr A*. 1997, 792, 179-225.
- ²¹ Kuhn, R. Wagner, J. Walbroehl, Y. Bereuter, T. *Electrophoresis*. 1994,15, 828-834.
- ²² Gasper, M.P, Berthod, A., Nair, B.U., Armstrong, D.W. *Anal. Chem*. 1996, 68, 2501-2514.
- ²³ Pena, M.S., Zhang, Y., Thibodeaux, S., McLaughlin, M.L., De la Pena, A.M., Warner, I.M. *Tetrahedron Lett*. 1996, 36, 58-41.
- ²⁴ Sutton, R.M.C., Sutton, K.L., Stalcup, A.M. *Electrophoresis*. 1997, 18, 2297-2304.
- ²⁵ Haginaka, J. *J.Chromatogr A*. 2000, 875, 235-254.
- ²⁶ Nishi, H. *J.Chromatogr A*. 1996, 735, 57-76.
- ²⁷ Wistuba, D., Schurig, V. *J.Chromatogr A*. 2000, 875, 255-276.
- ²⁸ Wren, S:A.C., Rowe, R.C. *J.Chromatogr*. 1992, 609, 363-367.
- ²⁹ Hempel, G., Blaschke, G. *J.Chromatogr B*. 1996, 675, 139-146.
- ³⁰ Liu, L. Nussbaum, M.A. *J. Pharm. Biomed. Anal*. 1995, 14, 65-72.
- ³¹ Richard, E.C., Bopp, R.J. *J.Chromatogr.A* 1994, 680, 609-621.
- ³² Assi, k.H., Abushoffa, A.M., Altria, K.D., Clark, B.J. *J.Chromatogr. A* 1998, 817, 83-90.
- ³³ Jäverfalk, E.M., Amini, A., Westerlund, D, Andrén, P.E. *J. Mass. Spectrom.*. 1998, 33, 183-186.
- ³⁴ Blanco, M., Coello, J., Iturriaga, H., Maspoch, S., Pérez-Maseda, C. *J.Chromatogr A*. 1998, 799, 301-307.