



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO DE TENSOACTIVOS
n-ALQUIL POLIETOXILADOS EN COLUMNAS DE FASE REVERSA POR
HPLC-ELSD

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. JOSÉ DAVID CHÁVEZ ROMO



TUTOR: Dra. Luz Elena Vera Ávila AÑO: 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

Deseo agradecer atentamente a la Dra. Luz Elena Vera Ávila por su invaluable apoyo y conocimiento en la dirección de este trabajo y su gran influencia en mi desarrollo profesional. De igual forma agradezco a la M. en C. María del Rosario Covarrubias Herrera por su comprensión y cariño al enseñar.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 115 de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM.

Dedico este trabajo a mi familia.

Gracias Papá y Mamá.

NDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES	5
II.1 Polímeros.....	5
II.1.1 Clasificación.....	5
II.1.1.1 Clasificación por origen.....	6
Polímeros orgánicos sintéticos	6
Biopolímeros.....	6
Polímeros semi-sintéticos	7
II.1.1.2 Clasificación por estructura de cadena	7
II.1.1.3 Clasificación por comportamiento térmico.....	8
Polímeros termoplásticos.....	8
Polímeros termoestables	8
II.1.1.4 Clasificación por composición monomérica	8
II.1.1.5 Clasificación por mecanismo de polimerización.....	9
II.1.1.6 Clasificación por aplicación.....	9
II.1.2 Métodos de caracterización	10
II.1.2.1 Métodos Directos	13
Osmometría	13
II.1.2.2 Métodos indirectos	13
Cromatografía de exclusión.....	13
II.1.2.3 Métodos no convencionales.....	16
II.1.2.4 Análisis de polímeros por HPLC.....	20
II.2 Tensoactivos	21
II.2.1 Estructura y actividad de los tensoactivos.....	22
II.2.2 Usos y aplicaciones en la industria	23
II.2.3 Clasificación de tensoactivos	24
II.2.3.1 Iónicos	25
II.2.3.2 No iónicos y Anfotéricos	26
II.3 Alcoholes polietoxilados	26
II.3.1 Método de síntesis.....	27
II.3.1.1 Reacción de condensación.....	28
II.3.2 Propiedades fisicoquímicas y usos industriales	30
II.3.3 Análisis y métodos de caracterización	31
II.3.3.1 Comportamiento en HPLC	35
II.4 Diseño y análisis de experimentos.....	36
II.4.1 Diseño factorial 2^K.....	38
II.4.2 Aplicaciones del diseño experimental y pautas generales para diseño.....	38
Hipótesis.....	39
III. OBJETIVOS	39
III.1 Objetivo principal.....	39
III.2 Objetivos específicos	39

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	41
IV.1 Material y Equipo	41
IV.2 Reactivos y disolventes	42
IV.3 Metodología	43
IV.3.1 Optimización de condiciones generales	43
IV.3.2 Estudio de retención y separación en función de la composición de la fase móvil.	44
IV.3.3 Análisis multivariable.....	45
IV.3.4 Análisis de Masas por MALDI-TOF	46
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
V.1. Precisión de las mediciones.....	48
V.2. Comportamiento Cromatográfico en Fases Móviles MeOH-H₂O.....	50
IV.2.1 Optimización de condiciones experimentales.....	50
IV.2.2 Estudio de retención y separación	52
V.2.3. Estudio multivariable	59
V.3 Fases móviles ACN-H₂O.....	70
V.3.1 Optimización de las condiciones de detección	70
V.3.2 Comportamiento cromatográfico	72
V.3.4. Estudio de otras variables	91
VI. CONCLUSIONES.....	95
VII. ANEXOS.....	97
VIII. BIBLIOGRAFÍA	103

LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
II.1	Clasificación más común de polímeros.	6
II.2	Estructuras de a) Proteína BSA, b) ADN y c) celulosa.	6
II.3	Características generales de los polímeros y algunas técnicas analíticas para su determinación.	11
II.4	Clasificación de los métodos para determinar MMD y MM.	12
II.5	Diagrama de un equipo de cromatografía de exclusión (SEC) y mecanismo de separación.	14
II.6	Curva de calibrado de una columna de exclusión por tamaño.	15
II.7	Matrices más empleadas en MALDI para el análisis de polímeros sintéticos. DHB: Ácido 2,5-dihidroxibenzóico, HABA: Ácido 2-(4-hidroxifenilazo)-benzóico, α -CCA: Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, DCBT: Trans-2-[3-(4-ter-1-butilfenil)-2-metil-2-propeniliden] malonitrilo, IAA: Ácido trans-3-indoleacrilico.	17
II.8	Placa de acero inoxidable para la colocación de muestra. Aplicación de las muestras por el método de gota seca.	17
II.9	Proceso de desorción-ionización del sistema MALDI.	18
II.10	Diagrama de un espectrómetro lineal de tiempo de vuelo (TOF)	19
II.11	Diagrama de un espectrómetro de reflectrón de tiempo de vuelo (TOF).	19
II.12	Diagrama interno del detector ELSD.	21
II.13	Estructura general de un tensoactivo.	22
II.14	A) Distribución de la producción nacional de tensoactivos en el 2005. B) Valor de la producción de tensoactivos totales en el periodo 2003-2005.	22
II.15	Micelas.	23
II.16	Clasificación de tensoactivos según su carga en disolución.	25
II.17	Ejemplos de tensoactivos aniónicos y catiónicos.	26
II.18	Estructura general de un alquil alcohol polietoxilado. Ejemplo del alcohol $C_{12}n_{10}$.	27
II.19	Clasificación de las técnicas de análisis para alcoholes polietoxilados y algunos ejemplos.	31
IV.1	Diagrama del dispositivo para fraccionamiento de los oligómeros separados por HPLC.	47
V.1	Gráficos de V_R vs %H ₂ O con sus respectivos intervalos de confianza al 95%. Analitos: a) $C_{12}n_{10}$ y b) $C_{18}n_{10}$.	49
V.2	Influencia de la temperatura en el tiempo de retención del soluto $C_{18}n_{20}$. Fase móvil: MeOH a flujo de 1 mL/min.	50
V.3	Dependencia del volumen de retención (V_R) con el número de etoxilos presentes para las series a) $C_{12}n_x$, b) $C_{14}n_x$, c) $C_{16}n_x$ y d) $C_{18}n_x$.	52
V.4	Incremento de V_R por aumento en el contenido de agua de la fase móvil (0-15%, v/v) en función de la longitud de cadena alquílica.	53
V.5	Volumen de retención (V_R) en función de la cantidad de agua en la fase móvil para la serie C18.	54
V.6	Ilustración de la propuesta mecanística. Efecto de "brazo espaciador" de la cadena etoxilada favoreciendo la retención del tensoactivo con respecto al alcohol padre.	56
V.7	Separación de una mezcla de alcoholes polietoxilados ($C_{12}n_{10} + C_{14}n_8 + C_{16}n_{10} + C_{18}n_{10}$) con: A) MeOH (100%), B) MeOH-H ₂ O (95-5%), C) MeOH-H ₂ O (90-10%) y D) MeOH-H ₂ O (85-15%). Columna (150x 4.6 mm d.i.) de fase reversa Hypersil ODS, 5 μ m, a temperatura de 30°C. Flujo 1 mL/min.	58
V.8	Gráfico de valores observados contra valores predichos calculados por la Ec. V.1.	62
V.9	Diagrama de Pareto para la comparación de efectos de los parámetros analizados.	63
V.10	Gráfico de <i>Efectos principales</i> sobre el volumen de retención	64
V.11	Gráfico de <i>Interacciones</i> .	66
V.12	Superficie de respuesta estimada para V_R (temperatura en nivel 0). Efecto BC.	67

V.13	Superficie de respuesta estimada de contornos para V_R (temperatura en nivel 0). Efecto BC.	67
V.14	Superficie de respuesta estimada para V_R (flujo en nivel 0). Efecto AC.	67
V.15	Superficie de respuesta estimada de contornos para V_R (flujo en nivel 0). Efecto AC.	67
V.16	Cromatogramas obtenidos al variar la temperatura de evaporación del detector ELSD. Analito $C_{12}n_{10}$. Fase móvil AcCN-agua 90:10 (v/v) a 0.6 mL/min.	71
V.17	Respuesta obtenida al doblar consecutivamente la concentración del $C_{12}n_{10}$. Parámetros del detector: $T_{neb} = 40^\circ\text{C}$, $T_{ev} = 90^\circ\text{C}$, flujo = 0.6 mL/min	72
V.18	Cromatogramas obtenidos para el alcohol $C_{12}n_{10}$ (680 ppm) en las fases móviles AcCN- H_2O con un contenido de agua de: a) 0%, b) 5%, c) 10%, d) 15%, e) 20%, f) 25%, g) 35%, h) 40%, i) 45% y j) 50%. Columna (150× 4.6 mm d.i.) de fase reversa Hypersil ODS, 5 μm , a temperatura de 30°C . Flujo 1 mL/min.	73-74
V.19	Espectros de masas por MALDI-TOF para el alcohol polietoxilado $C_{12}n_{10}$ obtenidos utilizando diferentes matrices.	81
V.20	Espectros de masas por MALDI-TOF de los alcoholes polietoxilados: (a) $C_{12}n_{10}$, (b) $C_{14}n_4$, (c) $C_{16}n_{10}$ y (d) $C_{18}n_{10}$.	83-84
V.21	Cromatogramas de las muestras de alcoholes fraccionados. El número indica el pico individual colectado para el análisis de masas: a) $C_{12}n_{10}$, b) $C_{16}n_{10}$ y c) $C_{16}n_{10}$.	85
V.22	Espectros de masa de los picos fraccionados 4, 8 y 12 del alcohol polietoxilado $C_{16}n_{10}$. Los analitos corresponden a los oligómeros A) $C_{16}n_6$, B) $C_{16}n_{10}$ y C) $C_{16}n_{14}$.	86-87
V.23	Variación del Volumen de elución de los oligómeros en función del número de etoxilos determinado por espectrometría de masas. Fase móvil AcCN- H_2O 90:10 (v/v)	87
V.24	Variación del V_R con la proporción de agua en fase móvil para los oligómeros del compuesto $C_{12}n_{10}$.	89
V.25	Cromatogramas obtenidos a diferentes condiciones de análisis: a) $T=40^\circ\text{C}$, $F=1\text{ mL/min}$, $L=16$, b) $T=40^\circ\text{C}$, $F=0.5\text{ mL/min}$, $L=16$, c) $T=25^\circ\text{C}$, $F=1\text{ mL/min}$, $L=16$, d) $T=25^\circ\text{C}$, $F=0.5\text{ mL/min}$, $L=16$, e) $T=40^\circ\text{C}$, $F=1\text{ mL/min}$, $L=12$, f) $T=40^\circ\text{C}$, $F=0.5\text{ mL/min}$, $L=12$, g) $T=25^\circ\text{C}$, $F=1\text{ mL/min}$, $L=12$, h) $T=25^\circ\text{C}$, $F=0.5\text{ mL/min}$, $L=12$	93-94

LISTA DE ABREVIATURAS MÁS EMPLEADAS

AAP	Alquil alcoholes polietoxilados
AcCN	Acetonitrilo
CFG	Cromatografía de filtración en gel
CPG	Cromatografía de permeación en gel
DCBT	(trans-2-[3-(4-ter-1-butilfenil)-2-metil-2-propeniliden]malonitrilo)
ELSD	Detector de dispersión de luz tras evaporación
EM	Espectrometría de masas
EO	Unidades etoxilo
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
MeOH	Metanol
MM	Masa molar
MMD	Distribución de masa molar
RI	Índice de refracción
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
TOF	Detector de tiempo de vuelo
UV	Ultravioleta visible

RESUMEN

Se realizó un estudio cromatográfico que permitió describir el comportamiento de retención de compuestos del tipo *alquil alcoholes polietoxilados* en cromatografía de líquidos de alta resolución *en fase reversa*, con detector de dispersión de luz tras evaporación. Los compuestos analizados consistieron en cuatro series de *alcoholes polietoxilados* con cadenas hidrocarbonadas de 12, 14, 16 y 18 átomos de carbono en un intervalo de 0 a 23 unidades etoxilo.

En fases móviles metanol-agua la retención de estos alcoholes presentó un comportamiento típico de cromatografía en fase reversa, determinado por la longitud de su cadena alquílica. El número de etoxilos en su estructura tuvo una influencia mínima sobre la retención. La única excepción a esta tendencia correspondió al alcohol esteárico con cien unidades etoxilo debido a su exclusión parcial de los poros de la fase estacionaria.

Adicionalmente, se estudió la influencia de algunos parámetros experimentales sobre el volumen de retención de los analitos empleando un diseño factorial. Los resultados obtenidos mostraron que los parámetros de mayor importancia son la proporción de agua en la fase móvil con un efecto positivo sobre la retención, seguido de la temperatura con un efecto negativo. A pesar de que estas fases móviles no permiten separar los estándares comerciales de los alquil alcoholes polietoxilados en sus oligómeros constituyentes, sí permiten la separación de los compuestos entre sí, con base en su cadena hidrofóbica. Por ello, las fases móviles metanol-agua resultan sumamente útiles para el análisis cuantitativo global de mezclas de estos alcoholes.

En las fases móviles acetonitrilo-agua, la mayoría de los alcoholes presentó una adecuada resolución de oligómeros. El estudio de espectrometría de masas permitió corroborar que los oligómeros más abundantes en los compuestos estudiados fueron aquellos con número de etoxilación alrededor del valor nominal reportado en la etiqueta del producto comercial. Cabe destacar que en fases móviles con un contenido

RESUMEN

de acetonitrilo >80%, el orden de elución de los oligómeros es directamente proporcional al número de etoxilos de la cadena polar; en estas condiciones, un aumento de la temperatura tiene un fuerte efecto negativo sobre la retención del conjunto de oligómeros de cada compuesto, pero permite afinar los picos y modular la resolución y el tiempo de análisis. Con base en estos resultados, se concluye que las fases móviles acetonitrilo-agua ricas en disolvente orgánico son el medio más efectivo para obtener el perfil oligomérico de los alquil alcoholes polietoxilados por cromatografía en fase reversa.

I. INTRODUCCIÓN

Los *alquil alcoholes polietoxilados* (AAP) son polímeros basados en alcoholes alquílicos que poseen un número promedio de unidades etoxilo (EO) determinado por la relación del número de moles de los reactivos durante su fabricación. El proceso de síntesis se basa en reacciones químicas de *condensación* que dan origen a un extenso intervalo de compuestos homólogos, los cuales difieren únicamente en su grado de etoxilación.

Los *alquil alcoholes polietoxilados* se usan ampliamente en la industria química debido a la “actividad” que manifiestan gracias a la naturaleza dual, hidrofóbica-hidrofílica, de su estructura molecular. Estas propiedades fisicoquímicas son capaces de alterar fenómenos de superficie.

Entre sus principales usos se pueden citar algunos ejemplos como: emulsificadores, aditivos, lubricantes y dispersantes, en donde los AAP se encuentran generalmente como mezclas. Su uso industrial abarca una amplia gama de productos de uso cotidiano como lo son: pastas dentales, detergentes, productos de limpieza, cosméticos, productos alimenticios y farmacéuticos.

En México, los *alquil alcoholes polietoxilados* (o alcoholes grasos etoxilados) representan para la industria petroquímica un rubro comercial de crecimiento sostenido. Así, en el periodo 2003-2005 la producción de estos compuestos aumentó de 14,092 a 15,273 toneladas anuales, lo que representó ingresos por 189.26 millones de pesos según fue reportado por la Secretaría de Energía (SENER).

Dadas sus extensas y variadas aplicaciones, resulta de gran utilidad en el ámbito industrial el poder contar con métodos eficaces, simples y robustos para separar y cuantificar mezclas de AAP en diversas matrices o para analizar el perfil oligomérico de los alcoholes individuales. Por ejemplo, en la industria manufacturera es necesaria la determinación de la calidad de estos compuestos como *materia prima* para lograr un óptimo desempeño en el proceso de fabricación de los productos de interés (detergentes, limpiadores, etc). De igual forma, resulta muy importante, aunque con mayor grado de complejidad, la determinación de los *alquil alcoholes polietoxilados* en producto terminado, ya sea para avalar su calidad, para establecer parámetros de posibles ajustes, o bien, para el desarrollo de ingeniería inversa que permita elucidar la composición de productos comerciales existentes en el mercado y facilitar la creación de nuevas fórmulas.

En la mayor parte de las publicaciones reportadas sobre el estudio analítico de los AAP se hace uso de técnicas cromatográficas, específicamente de la cromatografía de líquidos de alta resolución (**HPLC**) debido a su versatilidad. Esta técnica permite enfocar el análisis de esta familia de compuestos por dos vías, con base en su cadena alquílica o con base en su cadena etoxilada. Sin embargo, es frecuente observar que

I. INTRODUCCIÓN

los desarrollos analíticos se realizan por ensayo y error, modificando los parámetros cromatográficos de forma empírica, tal vez porque el comportamiento de retención de estas moléculas anfífilas es poco convencional y difícil de predecir. Existen muy pocos reportes de trabajos donde se utilicen métodos de *diseño experimental* para determinar de forma más adecuada y confiable el comportamiento de estos compuestos y las condiciones óptimas para su separación.

Teniendo en cuenta lo comentado anteriormente, en el presente trabajo nos propusimos investigar el comportamiento cromatográfico de los *alquil alcoholes polietoxilados* (AAP) en columnas convencionales de fase reversa C18 con fases móviles metanol-agua y acetonitrilo-agua, que son las más utilizadas. Esto fue posible gracias al empleo de un detector de dispersión de luz tras evaporación (ELSD, por sus siglas en inglés: *evaporative light scattering detector*), que permite detectar compuestos “difíciles” que no poseen grupos cromóforos o grupos con propiedades redox, impidiendo el uso de los detectores comunes como UV, fluorescencia o electroquímico. El ELSD es actualmente uno de los detectores más populares para el estudio y análisis de compuestos poliméricos.

Esta propuesta incluye también un estudio *multivariable* que permite esclarecer y determinar la influencia de los principales parámetros experimentales sobre la retención de los analitos de interés, proporcionando información complementaria para la comprensión de los fenómenos entrópico-entálpicos involucrados en este proceso.

Es una nueva tendencia en las publicaciones recientes, el empleo de técnicas espectrométricas acopladas a sistemas cromatográficos. No obstante, en muy pocos artículos referidos al estudio de los AAP, se ha reportado el uso de MALDI-TOF (por sus siglas en inglés: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight) en la identificación de los analitos. Esta técnica permite elucidar de forma muy precisa la distribución de masa molar para polímeros y biopolímeros de hasta 10^6 Da. En este trabajo se hace uso de esta metodología para la identificación de los oligómeros constituyentes de los AAP estudiados.

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

II.1 Polímeros

Un polímero es definido por la IUPAC como una gran molécula con un intervalo de masa molar que va desde unos cuantos cientos hasta millones de gramos/mol, cuya estructura se compone esencialmente por una múltiple repetición de unidades derivadas (unidad base), real o conceptualmente, de moléculas de bajo peso[1,2].

Los polímeros naturales pueden incluir proteínas, almidón, celulosa, ADN y constituyen la mayor parte de las estructuras y tejidos de los seres vivos. Los polímeros sintéticos son, hoy en día, una de las más exitosas y útiles clases de materiales pues poseen interesantes propiedades físicas que pueden explotarse.

El primer material polimérico totalmente sintético fue la resina fenolformaldehído (Bakelita) desarrollado por Baakeland de 1905 a 1909. Posteriormente, siguieron la resina de urea-formaldehído en los años 20's y resinas de poliéster en los 30's. Los polímeros de vinilo se descubrieron muy rápido, el cloruro de polivinilo en 1872 y el polimetilacrilato en 1880, pero no fueron producidos comercialmente sino hasta mucho tiempo después [1].

Muchos de los polímeros lineales convencionales empleados en la actualidad, formados por polimerización de cadena, se desarrollaron entre las décadas 1930 y 1950 con una interrupción durante la segunda guerra mundial. Las investigaciones de Ziegler y Natta de 1953 a 1955 condujeron al desarrollo de la catálisis de coordinación para la polimerización del etileno y propileno, por lo cual estos autores recibieron el premio Nobel en 1963.

En la actualidad, los polímeros juegan un papel primordial en todo tipo de industria: pinturas, recubrimientos, limpieza, cómputo, mobiliario, etc. La gran versatilidad en las propiedades de los polímeros sintetizados es lo que permite su aplicación en casi todas las actividades del hombre [3].

II.1.1 Clasificación

Pueden encontrarse diversas formas de clasificación para los polímeros orgánicos, debido principalmente a la gran variedad en sus estructuras, propiedades y usos. Una forma muy general consiste en clasificarlos según su origen y posteriormente por su comportamiento térmico (Fig. II.1)[4].

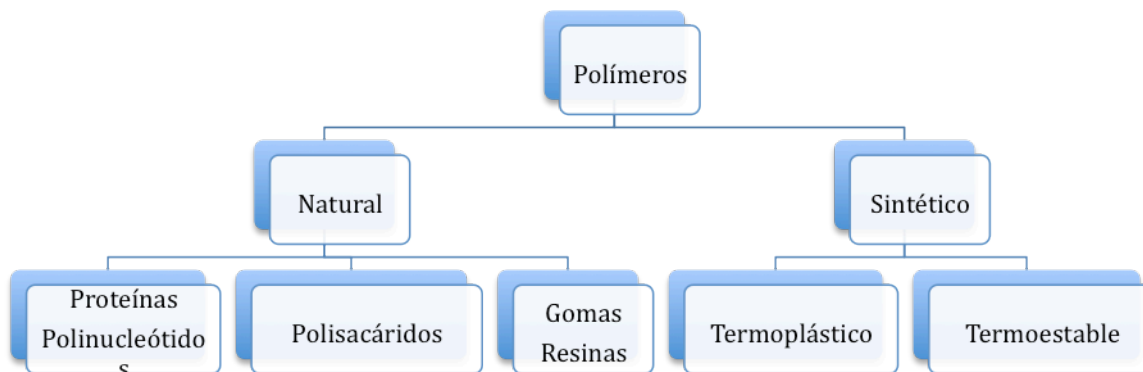


Figura II.1. Clasificación más común de polímeros.

Las formas más habituales de clasificación que se encuentran en la literatura se presentan a continuación.

II.1.1.1 Clasificación por origen

Consiste en clasificar a los polímeros según la naturaleza de su origen en polímeros orgánicos sintéticos, biopolímeros, polímeros semi-sintéticos y polímeros inorgánicos.

Polímeros orgánicos sintéticos

Son sintetizados por el hombre y frecuentemente son llamados polímeros. Consisten en moléculas con un número definido de residuos de monómeros orgánicos diferentes químicamente: homopolímeros (con un monómero), copolímeros (dos) y tripolímeros (tres). Estos residuos pueden no tener una secuencia a lo largo de la cadena polimérica y la longitud de la cadena principal suele no ser la misma, por lo cual se presenta la *polidispersidad*^A. Esta propiedad se refiere a que dichos polímeros no se encuentran puros sino como *mezclas de polímeros* con diferentes masas molares. Ejemplos de este tipo de polímeros son el nylon, teflón, bakelita, PVC, etc.

Biopolímeros

Esta clase de macromoléculas incluye a sustancias como las proteínas, polinucleótidos, polisacáridos, caucho natural y varias resinas. Se encuentran presentes en todos los organismos vivos y tienen diversas funciones imprescindibles para la vida (Figura II.2)[5].

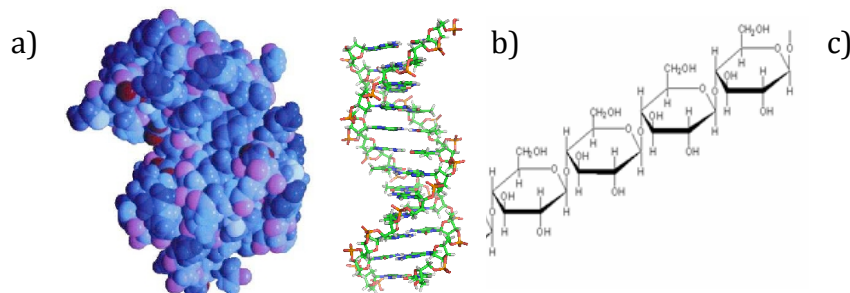


Figura II.2. Estructuras de a) Proteína BSA, b) ADN y c) celulosa.

^A La definición de *Polidispersidad* es presentada con mayor detalle en la sección II.1.2.

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

Las proteínas son consideradas como polímeros grandes formados por unidades simples llamadas aminoácidos. Los aminoácidos son compuestos orgánicos ácidos que contienen por lo menos un grupo amino. Las proteínas pueden llegar a tener masas molares de 6,000 (insulina, con algunos cientos de aminoácidos) hasta más de 20 millones (como la keratina) [3,13]. Las proteínas son los componentes principales de las estructuras musculares (soporte) en todos los animales. Se encuentran en la mayoría de los tejidos animales. Muchas de ellas son *reguladores metabólicos*, pues al formar parte (casi total) de las *enzimas*, tienen funciones específicas en puntos clave de todos los procesos bioquímicos.

Polímeros semi-sintéticos

Este tipo de polímeros son productos de reacción de procesos químicos aplicados a biopolímeros. Ejemplos de ellos son los ésteres o éteres de celulosa o amilasa y caucho natural vulcanizado, en los cuales se efectuaron procesos químicos que sólo afectaron a los grupos sustituyentes pero dejaron intacta la cadena principal.


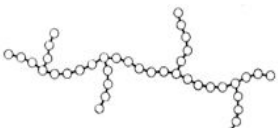
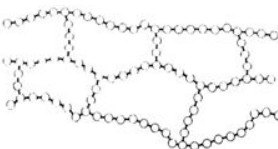
Polímeros inorgánicos

Se consideran principalmente como polímeros inorgánicos a algunos silicatos naturales y polisiloxanos sintéticos, así como compuestos con boro y fosforo como los boranos y fosfinas entre otros.

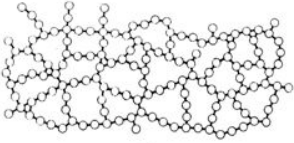
II.1.1.2 Clasificación por estructura de cadena

Se pueden clasificar en cuatro tipos dependiendo de la estructura que adopten sus cadenas principales (Tabla II.1) [5].

Tabla II.1. Clasificación de polímeros según su estructura [2,3].

Tipo de polímero	Características	Forma	Ejemplos
Polímeros lineales	Formados por cadenas largas de macromoléculas no modificadas	-A-A-A-A-A-A- 	Polietileno, seda
Polímeros de cadenas ramificadas	Se presentan ramificaciones a todo lo largo de la cadena principal	-A-A-A-A-A-A-A-A- A-A-A-A A-A-A 	Cloruro de polivinilo, poliestireno
Polímeros entrecruzados	Son cadenas lineales que presentan ramificaciones unidas transversalmente a otras cadenas	-A-A-A-A-A-A-A-A- -A-A-A-A-A-A-A-A- 	Caucho

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

Polímeros reticulares o en escalera	Son macromoléculas con cadenas y ramificaciones entrelazadas en las tres direcciones del espacio.		Baquelita, epóxidos
-------------------------------------	---	--	---------------------

II.1.1.3 Clasificación por comportamiento térmico

Existen dos tipos de comportamiento polimérico que pueden indicar un intervalo de temperaturas de aplicación: polímeros termoplásticos y polímeros termoestables [6].

Polímeros termoplásticos

Constituyen alrededor del 90% de los polímeros procesados. Su principal característica es que al calentarlos se vuelven suaves y fluidos permitiéndoles así tomar una forma diferente que conservan cuando se enfrían porque recuperan su estabilidad. Este proceso puede repetirse indefinidamente. Las moléculas de estos polímeros no presentan ramificaciones que mantengan entrecruzamientos químicos con otras cadenas adyacentes, permitiendo así su libre desplazamiento con la temperatura igual a un líquido.

Polímeros termoestables

El comportamiento de este grupo de polímeros es contrario a los termoplásticos; al calentarse estos compuestos no pueden fundirse ni ablandarse. Esto se debe a que en sus estructuras moleculares se presentan entrecruzamientos químicos entre cadenas principales, convirtiéndose así en una estructura fuertemente reticulada que impide el libre desplazamiento entre cadenas. Estos polímeros no se deforman con la temperatura.

II.1.1.4 Clasificación por composición monomérica

Esta clasificación toma en cuenta la composición química de las cadenas poliméricas en términos de los residuos de monómeros (Tabla II.2).

Tabla II.2. Clasificación por composición monomérica [2,3].

Polímero	Características	Estructura	Estructura condensada
Homopolímero	Es un polímero derivado de una sola especie de monómero.	-AAAAAAAAAA-	$[-A-]_n$

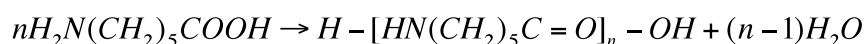
II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

Copolímeros aleatorios	La distribución de dos monómeros sigue un proceso aleatorio.	-ABBABABABBA-	-
Copolímeros alternados	Contienen una distribución alternada de dos monómeros.	-ABABABABAB-	-[A-B] _n
Copolímeros en bloques	Constituidos por secuencias largas de cada monómero.	-AAAAA-BBBBB-	-[A] _n -[B] _m
Copolímeros injertados	Mantienen la cadena principal de un monómero en la cual están injertadas cadenas laterales de otro monómero.	-AAAAAAAAA- BBBBBBBBB-	-
Terpolímeros	Conformados por una combinación aleatoria de tres monómeros.	-ABCBBCCACCAA-	-

II.1.1.5 Clasificación por mecanismo de polimerización

Involucra dos clases, según el mecanismo de polimerización empleado en su síntesis: condensación y adición [4].

La polimerización por condensación se lleva a cabo cuando se hacen reaccionar monómeros polifuncionales con una posterior eliminación de una molécula pequeña como H₂O o HCl. Un claro ejemplo es la reacción de condensación del nylon 6 a partir del ácido ε-aminocaprílico:



La polimerización por adición se caracteriza por formar la macromolécula sin dar lugar a la pérdida de ninguna molécula, ejemplo de esto es la formación de PVC a partir del cloruro de vinilo:



Los polímeros formados a partir de este mecanismo mantienen la misma composición que el monómero, generándose cadenas lineales por la adición secuencial de moléculas de la entidad base.

II.1.1.6 Clasificación por aplicación

En esta clasificación se consideran de forma arbitraria los principales usos y campos de aplicación de los polímeros más conocidos:

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

- a) Plásticos (que incluyen también películas y hojas) como el polietileno, polipropileno isotáctico, cloruro de polivinilo (PVC) etc.
- b) Fibras (semi) sintéticas como el nylon 6, las fibras de poliestireno y el acrílico.
- c) Elastómeros o gomas
- d) Recubrimientos y adhesivos como son el polimetilmetacrilato (PMMA) y el polivinil acetato (PVAC).

II.1.2 Métodos de caracterización

Existen diversas formas para caracterizar a un polímero, dependiendo de las propiedades físicas y químicas que poseen estas macromoléculas (Figura II.3). Cabe mencionar que todas estas propiedades se derivan, principalmente, del tamaño del polímero (*masa molar*), funcionalización, así como de la estructura de su cadena principal [6,7].

La masa molar de un polímero depende de varios factores como la naturaleza del monómero y el proceso de polimerización que le dio origen. Sin embargo, todo polímero sintetizado por el hombre no tiene una composición única, sino que está constituido por una mezcla de polímeros de masas molares cercanas que difieren en el número de unidades de monómero que componen la cadena principal, esto es, difieren en el largo de su cadena. Lo anterior es consecuencia de la poca especificidad que tienen los métodos de síntesis, pues se forman productos secundarios que no alcanzan a convertirse en el producto deseado. Esto es intrínseco al proceso de polimerización.

El primer paso para la caracterización de un polímero es la determinación del número y el peso de las cadenas de los polímeros (oligómeros) presentes. Esto tiene como finalidad conocer la distribución de la masa molar (MMD, por sus siglas en inglés: *molar-mass distribution*), que es de suma importancia ya que determina las propiedades y posibles aplicaciones del material. El estricto control de la MMD, así como de las masas molares (MM), permite mantener la calidad en la producción de un polímero debido a que se asegura la reproducibilidad de sus características [7,8].

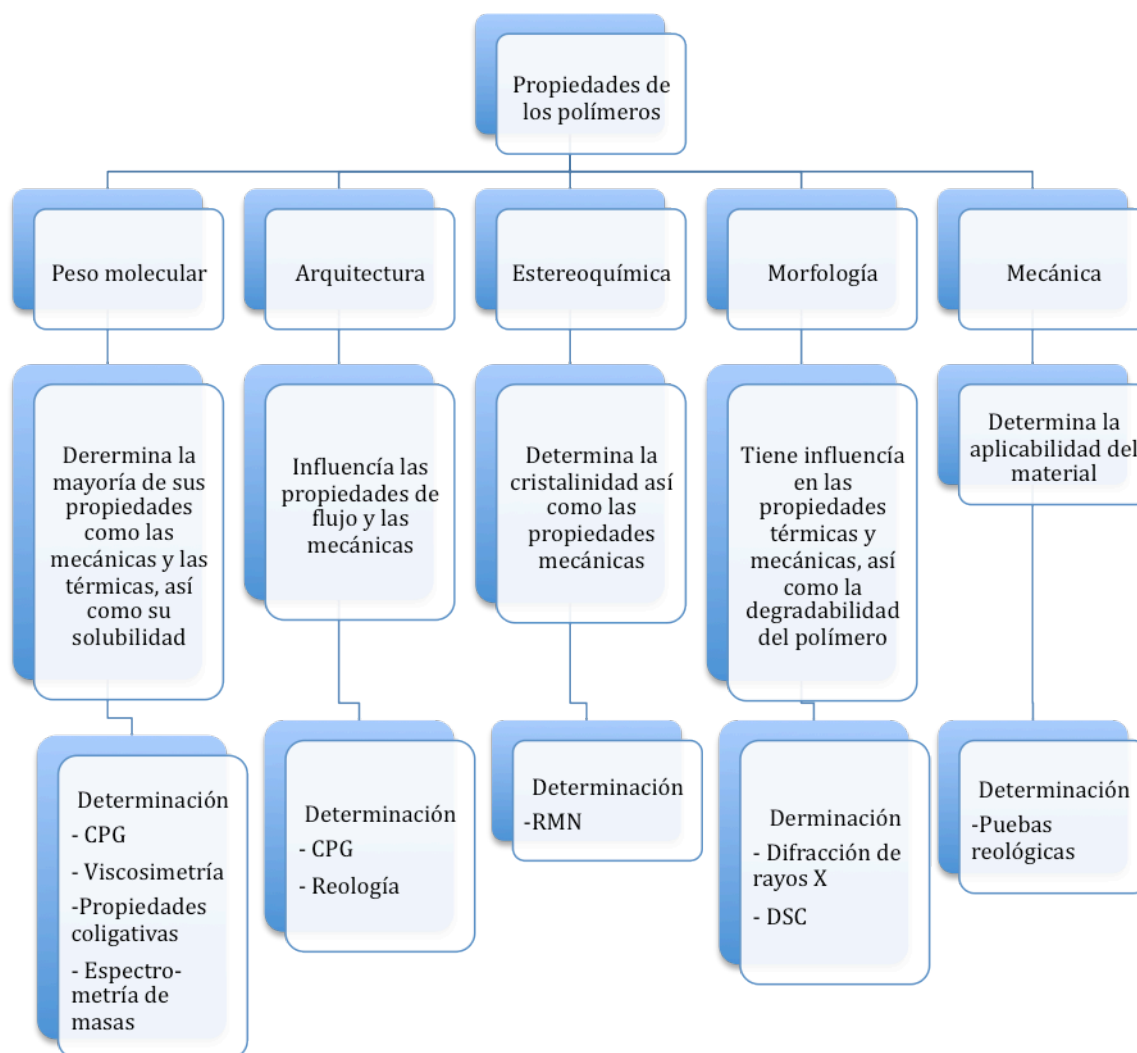


Figura II.3. Características generales de los polímeros y algunas técnicas analíticas para su determinación [6]. CPG: Cromatografía de Permeación en Gel, RMN: Resonancia Magnética Nuclear, DSC: Calorimetría Diferencial de Barrido.

Existen dos variables de gran importancia para la determinación de MMD y MM: el número y el peso de los diferentes oligómeros. Estas variables permiten calcular dos parámetros fundamentales para la caracterización de los polímeros, la *masa molar número promedio* \bar{M}_n (Ec. II.1) y la *masa molar peso promedio* \bar{M}_w (Ec II.2):

$$\bar{M}_n = \frac{(\sum m_i N_i)}{(\sum N_i)} \quad \dots \text{ (II.1)}$$

$$\overline{M}_w = \frac{(\sum m_i^2 N_i)}{(\sum m_i N_i)} \quad \dots \text{ (II.2)}$$

donde N_i es el número de cadenas de masa m_i . Una vez conocidos los valores de \overline{M}_n y \overline{M}_w , se puede conocer el valor del índice de polidispersidad, definido por (Ec. II.3):

$$D = \frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n} \quad \dots \text{ (II.3)}$$

En esta ecuación \overline{M}_n siempre es menor, o a lo más igual, que \overline{M}_w por lo que el valor de D siempre será igual o mayor a 1 pero nunca menor. Si $D \approx 1$ significa que el polímero presenta una estrecha distribución de masas molares, mientras que un valor mayor a 2, implica una amplia *polidispersidad*. Este último caso puede indicar la presencia de moléculas de baja masa molar, o bien, que el perfil de distribución del polímero no es unimodal [8].

Un polímero polidisperso (o polímero no uniforme) es aquél que está conformado por moléculas no uniformes, ya sea con respecto a su masa molar relativa, su constitución o ambas [2]. La polidispersidad nos habla entonces de un intervalo de masa en el que oscila la composición de un polímero sintetizado, es un indicador de la amplitud de la distribución de masas molares propia del polímero.

La determinación de la *distribución de la masa molar* (MMD), así como la *masa molar* (MM), ha sido por años muy difícil debido a la complejidad teórica o experimental de las mediciones. Se pueden describir dos clases de métodos que permiten estas determinaciones: los métodos directos y los métodos indirectos (Fig. II.4). Esta clasificación se aplica sólo a métodos convencionales [10] pues existen actualmente otras técnicas con las que se reduce tiempo y costo de análisis sin sacrificar precisión en las mediciones. Ejemplo de estas últimas es la espectrometría de masas con nuevas técnicas de ionización y programas sofisticados que permiten obtener y procesar mayor número de datos [8].

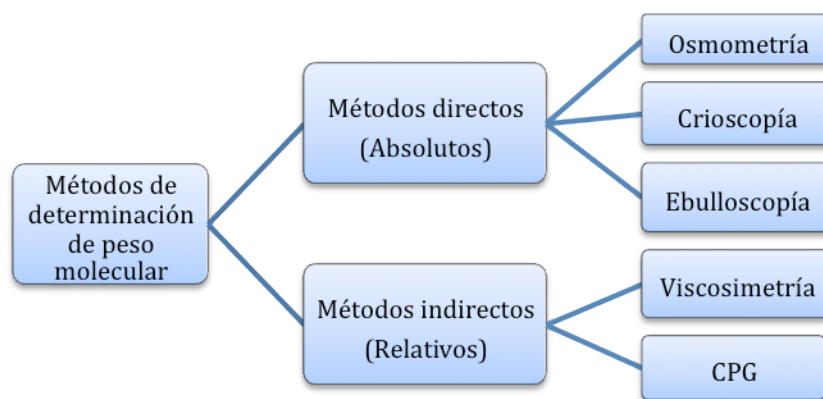


Figura II.4. Clasificación de los métodos para determinar MMD y MM.

II.1.2.1 Métodos Directos

Los métodos directos o absolutos se caracterizan por efectuar mediciones de propiedades físicas directamente relacionados con la masa molar a través de ecuaciones, por lo que no necesitan de calibraciones. La mayoría de estos métodos se basan en propiedades coligativas [7].

Osmometría

La osmometría es un ejemplo de un método directo para la obtención de MMD y MM. El procedimiento consiste en medir la presión osmótica Π de una disolución del polímero y trazar un gráfico de Π/RTC vs C (donde C es la concentración del polímero en disolución, T la temperatura absoluta y R la constante de los gases). Resulta un gráfico con una zona lineal en el intervalo de bajas concentraciones, cuya ordenada al origen es $1/\bar{M}_n$, como se deduce de la siguiente relación entre Π y C (Ec. II.4):

$$\frac{\Pi}{RT} = \frac{C}{\bar{M}_n} + A_2C^2 + A_3C^3 \quad \dots \text{ (II.4)}$$

donde A_2 y A_3 son el segundo y el tercer coeficiente de la expansión virial. La aplicación de esta técnica es limitada a masas de polímeros menores a 100,000 debido a que aumenta la incertidumbre en la medición al aumentar la masa molar.

II.1.2.2 Métodos indirectos

Los métodos indirectos consisten en medir un parámetro que puede relacionarse con la masa molar mediante una calibración. Se emplean polímeros de \bar{M}_n y \bar{M}_w conocidos como estándares para el trazo de la curva de calibración [7,8].

Cromatografía de exclusión

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por las siglas del nombre en inglés: *size exclusion chromatography*) es una técnica que permite la determinación indirecta de la masa molar de los polímeros. Es una variante de la cromatografía de líquidos cuyo modo de operación es prácticamente idéntico (Fig. II.5). Los métodos de exclusión por tamaño se dividen en *Cromatografía de filtración en gel (CFG)* y *Cromatografía de permeación en gel (CPG)*. En el primero se emplean disolventes acuosos como fase móvil y empaques de columna hidrofílicos, mientras que en el segundo se emplean disolventes orgánicos y empaques de columna hidrofóbicos. Puede considerarse que son métodos complementarios, pues se utiliza uno u otro dependiendo de la naturaleza de la muestra [8].

El mecanismo de separación en esta técnica es muy simple ya que, en principio (*idealmente*), no existen interacciones entre la fase estacionaria y los analitos. De hecho, es deseable que no se presente ningún tipo de interacción debido a que éstas

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

inciden sobre el ensanchamiento y la forma de los picos y pueden falsear los resultados. Cuando se introduce la muestra, las moléculas difunden en la estructura porosa de la fase estacionaria, penetrando en ésta tanto como se los permite su tamaño y forma. Las moléculas cuyo tamaño es mayor al tamaño medio del poro de la fase estacionaria, son excluidas provocando así su rápida migración a través de la columna. Estas moléculas emergen juntas en el tiempo más corto, correspondiente a la salida del volumen intersticial de la columna. Las moléculas con tamaños mucho menores al tamaño promedio del poro, pueden permear completamente el volumen poroso recorriendo un camino más largo, por lo que son las últimas en salir de la columna. Estas moléculas también emergen juntas, en un tiempo de retención que corresponde a la salida del volumen muerto de la columna. Entre estos dos extremos se encuentran las moléculas con tamaño intermedio que permear selectivamente el volumen poroso y por ello son las que presentan un fraccionamiento [7,8].

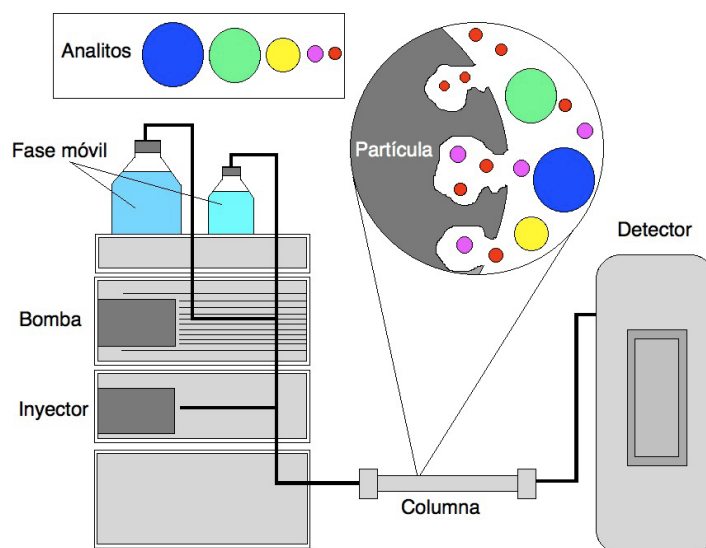


Figura II.5. Diagrama de un equipo de cromatografía de exclusión (SEC) y mecanismo de separación. Solo las moléculas más pequeñas logran entrar en los poros de las partículas de la fase estacionaria.

El volumen total V_t de una columna empacada está dado por (Ec. II.5):

$$V_t = V_g + V_i + V_o \quad \dots \text{(II.5)}$$

donde V_g es el volumen ocupado por la matriz sólida del gel, V_i es el volumen del disolvente retenido en sus poros (volumen intrapartícula) y V_o es el volumen libre exterior a las partículas del gel (volumen intersticial) . La ecuación que describe el volumen de retención de una molécula en SEC es (Ec. II.6):

$$V_r = V_o + KV_i \quad \dots \text{(II.6)}$$

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

Donde K (constante de exclusión por tamaño) es la fracción del volumen poroso accesible a la molécula ($0 \leq K \leq 1$).

El intervalo útil de masas molares para un empaque de exclusión por tamaño se obtiene por medio de un calibrado (Fig. II.6). En este diagrama puede observarse el *límite de exclusión total* que corresponde a la masa molar de una especie por encima del cual no existe penetración en los poros de la fase estacionaria, por lo que las moléculas de mayor masa eluirán al mismo tiempo dando un solo pico. Ocurre algo similar con los analitos de masas molares muy pequeñas. El *límite de permeación total* corresponde a la masa molar abajo del cual los solutos pueden penetrar completamente en los poros de la fase estacionaria, por lo que, cuando eluyen, salen al mismo tiempo dando un solo pico. El intervalo de uso de esta columna queda entonces delimitado por estas dos masas molares [9].

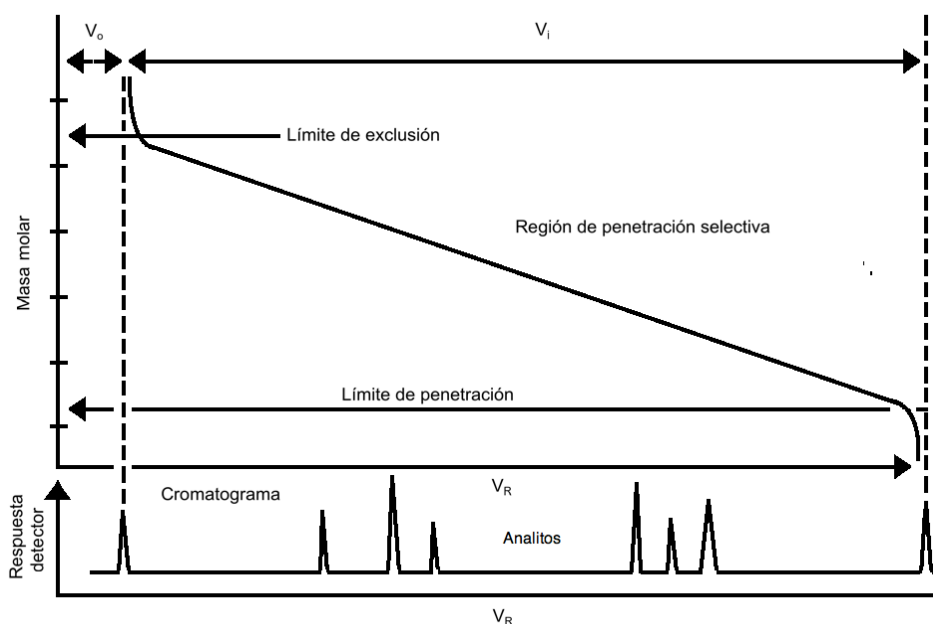


Figura II.6. Curva de calibrado de una columna de exclusión por tamaño. Los límites A y B marcan los límites de exclusión y de permeación total, respectivamente.

Esta técnica cromatográfica se considera como un método indirecto debido a que, para conocer la masa molar de los polímeros estudiados, se requiere de una previa estandarización. Los compuestos que se emplean como estándares se pueden analizar por otras técnicas (métodos directos) para determinar su masas molares. Una vez conocidas, se preparan disoluciones y se inyectan en el sistema SEC. Así, se traza una curva de calibración con el **logaritmo de la masa molar** (Log MM) de los estándares vs sus **volúmenes de retención** (V_R) y se determina la masa molar del analito deseado por interpolación en esta curva, empleando su propio volumen de retención. Pueden calcularse \bar{M}_n , \bar{M}_w y D de esta forma.

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

Si un polímero diferente necesita ser analizado, se requiere establecer una nueva curva de calibración. Sin embargo, si la relación entre la masa molar y el tamaño de la molécula es conocida para ambos, el polímero estándar y el polímero desconocido, se puede solo transformar el eje de la masa molar. **Benoit y su equipo** encontraron que se podía obtener una **curva universal** para todos los polímeros cuando se graficaba el producto de la *viscosidad intrínseca* y la *masa molar* (también conocido como *volumen hidrodinámico*) contra el *volumen de retención*.

La ecuación de *Mark-Houwink* relaciona la viscosidad intrínseca con la masa molar (Ecuación II.7):

$$[\eta] = K_{MM}MM^a \dots(\text{II.7})$$

Los coeficientes K_{MM} y a son característicos de cada combinación de polímero, disolvente y temperatura, éstos son conocidos como las constantes de *Mark-Houwink*. Si se tienen estas constantes para el polímero bajo las condiciones de interés, se puede convertir un eje de masa molar en otro utilizando la siguiente relación (Ecuación II.8):

$$\text{Log}MM_2 = \left(\frac{1}{1+a_2}\right) \times \text{Log}\left(\frac{K_1}{K_2}\right) + \left(\frac{1+a_1}{1+a_2}\right) * \text{Log}MM_1 \dots (\text{II.8})$$

Esta relación trabaja bien para polímeros grandes, pero falla en el intervalo de masas molares de oligómeros [10].

II.1.2.3 Métodos no convencionales

Existen métodos que permiten el análisis de polímeros y que no pueden clasificarse junto con los métodos anteriores, ejemplo de esto es la *espectrometría de masas*, la cual permite el análisis completo de la composición oligomérica de las muestras.

Una de las técnicas de masas más socorrida es la *espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz*, acoplada a un *analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF)*. Desarrollada a finales de los años 80's por Hillenkamp y Karas, es la más nueva y prometedora técnica de análisis de grandes biomoléculas. Permite la desorción y ionización de moléculas muy grandes e incluso de mezclas complejas. También permite obtener información sobre la masa molar de oligómeros individuales (MM), la distribución de la masa molar (MMD), las unidades repetibles, grupos terminales, presencia de anillos y muchos otros datos de interés. Por ello, esta técnica juega un importante papel en el análisis de polímeros en vista de las recurrentes dificultades que presentan los métodos tradicionales de caracterización, como la baja sensibilidad y la necesidad de estándares para calibración.

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

Proceso MALDI

La muestra es incorporada en una matriz apropiada y posteriormente se somete a radiación con un láser. El láser promueve la formación de iones moleculares. La matriz, capaz de absorber luz de la longitud de onda emitida por el láser, está constituida por un compuesto de molécula pequeña, tal como los que se muestran en la Figura II.7.

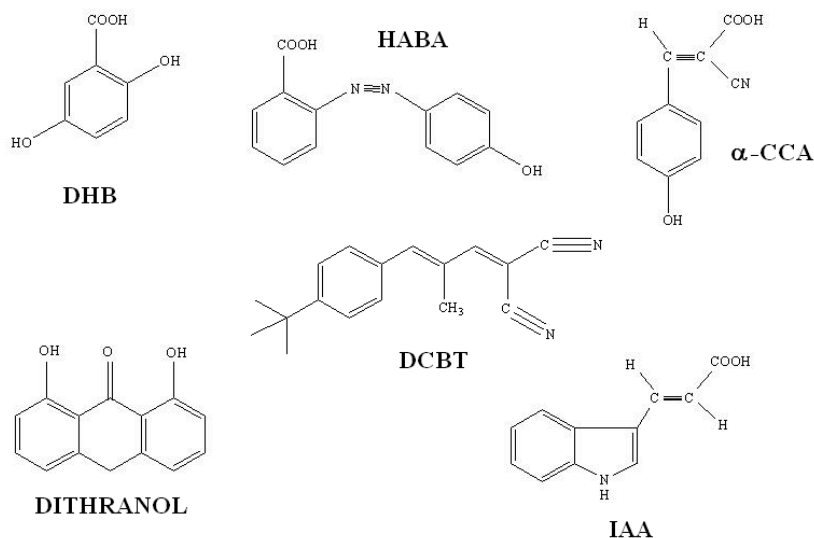


Figura II.7. Matrices más empleadas en MALDI para el análisis de polímeros sintéticos. DHB: Ácido 2,5-dihidroxi-benzóico, HABA: Ácido 2-(4-hidroxifenilazo)-benzóico, α -CCA: Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico, DCBT: Trans-2-[3-(4-ter-1-butilfenil)-2-metil-2-propeniliden] malonitrilo, IAA: Ácido trans-3-indoleacrilico.

Una gota de la muestra seguida de una gota de la matriz se colocan en una placa de metal y se deja evaporar (método de gota seca), lo que se propicia la formación de cristales (Fig. II.8).

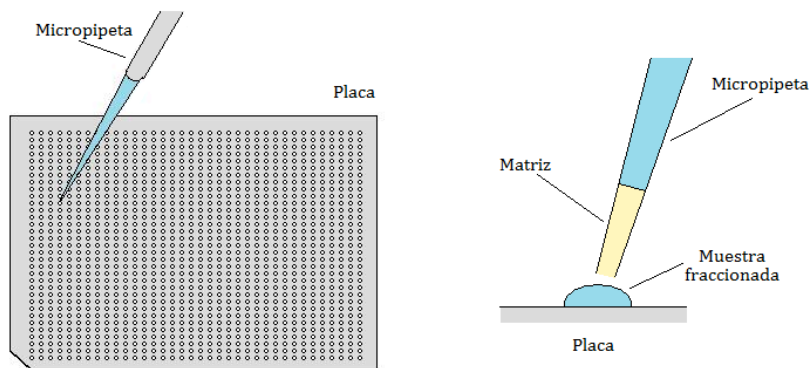


Figura II.8. Placa de acero inoxidable para la colocación de muestra. Aplicación de las muestras por el método de gota seca.

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

La placa se coloca en el espectrómetro y el láser es dirigido automáticamente sobre ella. La luz emitida por el láser, generalmente con una longitud de onda de 337 nm, causa desorción e ionización de la muestra tanto por protonación como desprotonación, generando iones predominantemente monovalentes (Fig. II.9). También pueden formarse especies iónicas por adición de iones catiónicos como Na⁺ y K⁺. Los iones producidos son posteriormente acelerados hasta el analizador.

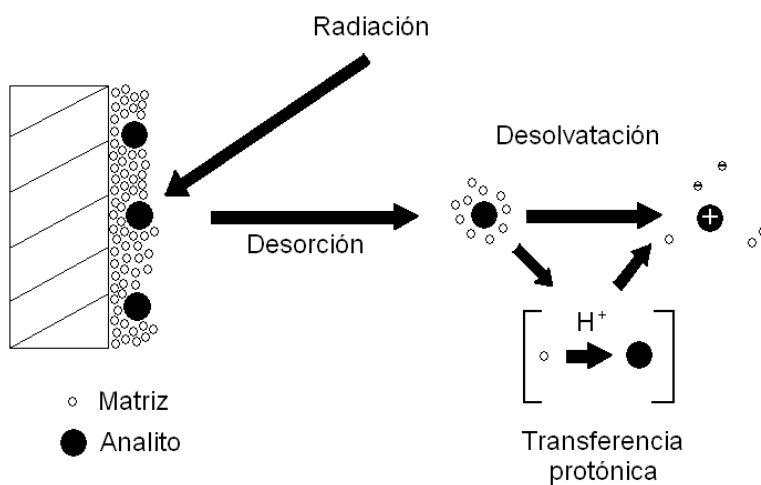


Figura II.9. Proceso de desorción-ionización del sistema MALDI.

Proceso TOF

Este es uno de los analizadores más simples. Mide la relación masa-carga (m/z) de un ión determinando el tiempo (t) requerido para recorrer la longitud (d) de un tubo de vuelo desde que el ión abandona la fuente de ionización. El ión es impulsado con una velocidad inicial (v) la cual depende directamente de su masa (Fig. II.10). El tiempo de vuelo del ión es proporcional a la raíz cuadrada de su relación m/z dada una aceleración constante provocada por el voltaje (V) (Ecuaciones II.9 y II.10):

$$t = \frac{d}{v} \quad \dots(\text{II.9})$$

$$t^2 = \frac{m}{z} \left(\frac{d^2}{2Ve} \right) \quad \dots(\text{II.10})$$

Donde, e es la carga del electrón.

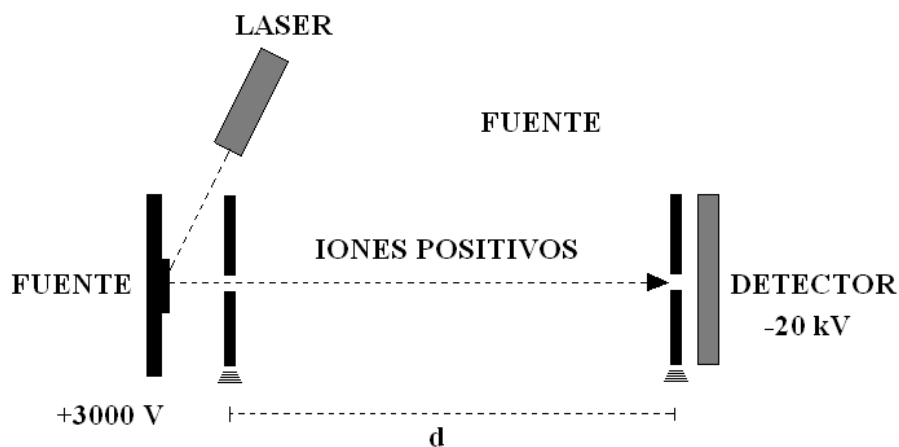


Figura II.10. Diagrama de un espectrómetro lineal de tiempo de vuelo (TOF).

Algunos analizadores de masa TOF incluyen un espejo de iones o “reflectrón” al final del vuelo, el cual repele los iones y los dirige a través del tubo hacia el detector (Fig. II.11). De esta forma, se ve incrementada la longitud del tubo de vuelo con lo que mejora la resolución. El reflectrón sirve también para corregir las pequeñas diferencias en la energía cinética (E_K) que existen entre iones de la misma masa. Estas diferencias se deben a la posición que guarda cada ión en la fuente de iones al momento de ser acelerados al aplicar una diferencia de potencial. Las diferencias en la energía cinética de los iones se reducen debido a que los iones con E_K mayor viajan más lejos en el reflectrón que los iones con E_K menor. Esto ocasiona que los iones con la misma masa se enfoquen mejor en el detector aumentando considerablemente la resolución y la precisión del cálculo de masas.

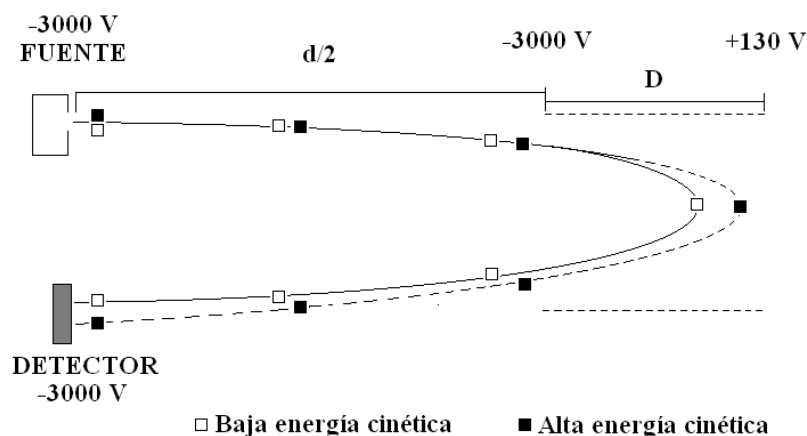


Figura II.11. Diagrama de un espectrómetro de reflectrón de tiempo de vuelo (TOF).

II.1.2.4 Análisis de polímeros por HPLC

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés: High Performance Liquid Chromatography)) es una de las técnicas favoritas para el análisis cuantitativo de polímeros debido a su relativa facilidad de uso. Consta de cuatro partes esenciales [7,9]:

- Columna empacada con partículas de sílice con propiedades polares (fase normal), o bien, de sílice químicamente unida a grupos no polares (fase reversa).
- Sistema de inyección que permite la introducción de la muestra en la columna.
- Sistema de bombas que permiten el flujo constante de los disolventes que efectuarán el proceso cromatográfico en la columna.
- Sistema de detección

En el caso de la fase normal, el proceso cromatográfico se basa en el fenómeno de adsorción por interacción de los grupos polares de los analitos con los silanoles superficiales de la sílice. Los polímeros menos polares eluyen más rápidamente que los polímeros más polares. El proceso en fase reversa se basa en el fenómeno de hidrofobicidad; en este caso, los polímeros menos polares son más fuertemente retenidos. La HPLC ha sido ampliamente usada para determinaciones cuantitativas de polímeros, así como en la determinación del perfil cromatográfico (polidispersidad). Uno de los principales problemas de la cromatografía de líquidos aplicada a los polímeros es la solubilidad de las muestras. Muchos polímeros no son solubles en los disolventes más comunes, sin embargo pueden hacerse mezclas para conseguir disoluciones completamente homogéneas [9].

Entre los detectores comúnmente empleados en HPLC se encuentran: el detector de índice de refracción (RI), el UV-Visible, el de fluorescencia, el de conductividad y el electroquímico. Sin embargo, no todos pueden ser usados para las determinaciones de polímeros pues muchos de estos compuestos no poseen las propiedades fisicoquímicas o estructurales necesarias para generar una respuesta en un detector dado.

El detector **RI** es un detector de tipo universal por lo que ha sido ampliamente utilizado en estudios de polímeros. Sin embargo, su baja sensibilidad (mil veces menor a la del detector UV-Visible) es una limitante para algunas determinaciones de tipo cuantitativo. En años recientes este detector ha sido progresivamente reemplazado en muchas de sus aplicaciones por el detector de dispersión de luz tras evaporación (ELSD). El ELSD alcanza una sensibilidad de dos a tres órdenes de magnitud mayor que la del RI, por ello no sólo es empleado en polímeros, sino en sustancias de alta masa molar que no son muy solubles [11].

El principio de operación del **ELSD** es bastante simple (Fig. II.12). El efluente de la columna cromatográfica entra al nebulizador del detector, donde es calentado y se convierte en una fina niebla mediante la ayuda de un gas acarreador que

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

normalmente es N_2 . Esta niebla se transporta, con el mismo flujo de gas, a través de una cámara calentada a temperatura adecuada para evaporar completamente al disolvente, dando como resultado la formación de pequeñas partículas sólidas del analito. La nube de partículas llega finalmente al sistema de detección donde es irradiada por un haz luminoso. Parte de la luz es dispersada en todas direcciones al interactuar con las partículas sólidas y una fracción de ésta es medida perpendicularmente al flujo por un fotodetector [9,11].

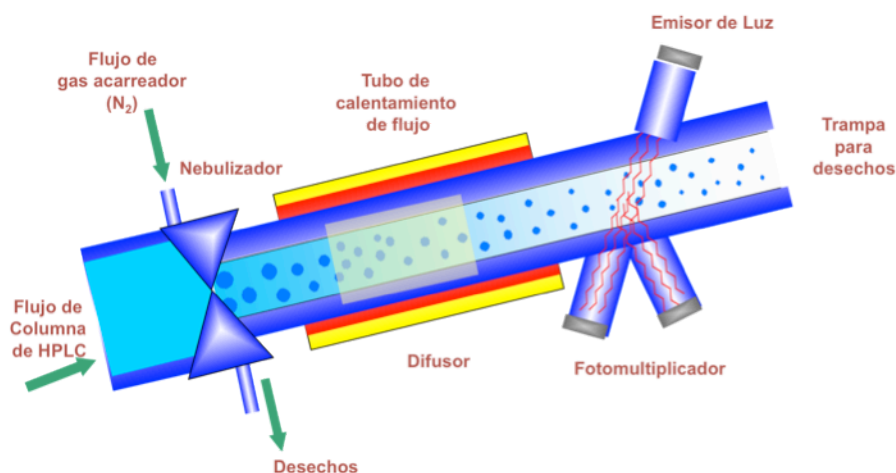


Figura. II.12. Diagrama interno del detector ELSD.

Este detector tiene algunas desventajas, entre las que se encuentra una pobre sensibilidad para compuestos ligeros, además de que la respuesta es lineal con la masa sólo en un pequeño intervalo de concentraciones. Sin embargo, a pesar de estas desventajas, es muy útil en el área de polímeros debido a que puede detectar a estos compuestos sin importar su estructura. Adicionalmente, su respuesta es independiente de la fase móvil utilizada, pero es necesario que todos los componentes de dicha fase puedan ser volatilizables a temperaturas no muy altas. La efectividad de este detector en el análisis de polímeros ha resultado muy adecuada, pues se han llegado a reportar límites de detección para *alquilfenoles* y *alcoholes polietoxilados* que se encuentran en el orden de mg/L, favoreciendo así su uso [11].

II.2 Tensoactivos

Es de importancia recordar, que los alquil alcoholes polietoxilados (AAP) son compuestos muy especiales, debido a que además de ser *polímeros*, presentan también propiedades superficiales que les permiten actuar como *tensoactivos*.

Un tensoactivo es una sustancia que tiene el efecto de alterar la naturaleza de las interfaces y por lo tanto sus propiedades fisicoquímicas. La más importante de estas propiedades es la *tensión superficial*, la cual se reduce debido a la acumulación de moléculas de tensoactivo en la interfase. El efecto se debe a la estructura de estas moléculas, constituidas por una parte hidrofílica o “cabeza” y una hidrofóbica o “cola” (Fig II.13) [12].

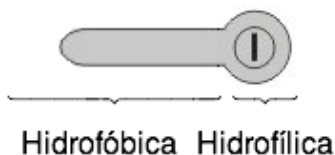


Figura II.13. Estructura general de un tensoactivo.

La naturaleza química de estos compuestos es muy variada y existe un gran campo de aplicación dependiendo de sus propiedades específicas. Sin embargo, la clave de todos los efectos deseables de los tensoactivos es su estructura dual.

El análisis de estos compuestos es de gran importancia pues casi son omnipresentes, se encuentran en muchos productos y se emplean en gran parte de los procesos industriales.

La producción de tensoactivos en México es muy importante (Fig II.14A), tan solo en el 2005 la producción de tensoactivos totales fue de 537,289 toneladas dando ingresos de hasta 4,115.2 millones de pesos en ese mismo año (Fig II.14B) [13].

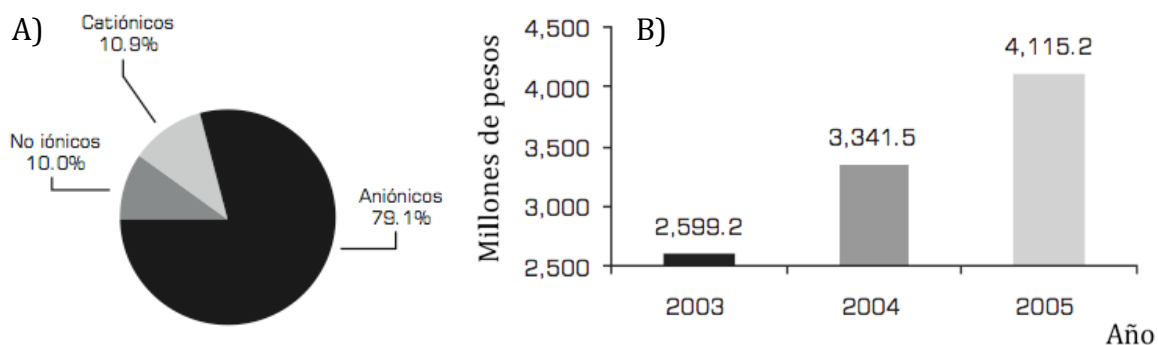


Figura II.14. A) Distribución de la producción nacional de tensoactivos en el 2005. B) Valor de la producción de tensoactivos totales en el periodo 2003-2005.

II.2.1 Estructura y actividad de los tensoactivos

A pesar de la existencia de muchos tipos diferentes de tensoactivos, sus características estructurales se basan en estos simples principios[12,14]:

- La estructura base está constituida por la unión química de una o más especies hidrofóbicas con una o más especies hidrofílicas.
- La actividad sobre la superficie depende de la naturaleza y la relación entre los grupos lipofílicos e hidrofílicos y sus arreglos espaciales.

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

- Las especies hidrofílicas pueden ser moléculas con grupos funcionales cargados eléctricamente (iónicas) o estructuras polares no cargadas. Las especies hidrofóbicas pueden ser cadenas alifáticas, alifático-aromáticas o aromáticas.

Puede considerarse a una sustancia como un tensoactivo si, en disolución, altera la tensión superficial del disolvente. El origen de la actividad superficial de estos compuestos se basa en su estructura. Los efectos emulsificantes, de limpieza y de detergencia que poseen pueden ser intensificados o disminuidos de acuerdo con el largo de su cadena alquílica o la naturaleza del grupo hidrofílico.

Una de las principales propiedades de los tensoactivos es la *concentración micelar crítica* (CMC) que ocurre cuando las moléculas de tensoactivo se unen en disolución acuosa para formar *micelas* (Fig II.15). Éstas son de unos cuantos nanómetros de tamaño y con formas ovaladas; se crean al acomodarse las moléculas del tensoactivo con sus partes hidrofílicas hacia afuera, en contacto directo con las moléculas de agua, mientras que las partes hidrofóbicas se acomodan hacia dentro de la estructura para evitar cualquier interacción con el disolvente polar [12,14].

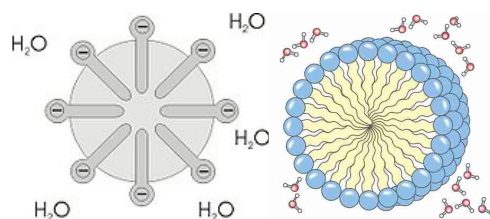


Figura II.15. Micelas. La parte externa o cabeza mantiene contacto con la fase acuosa mientras que la interna se aísla compactándose. Esta parte es la que puede secuestrar y almacenar sustancias hidrofóbicas.

Las micelas pueden capturar moléculas de sustancias orgánicas dentro de su estructura formando emulsiones. Los tensoactivos pueden, por lo tanto, estabilizar dispersiones con la creación de nuevas interfases.

II.2.2 Usos y aplicaciones en la industria[15]

Los tensoactivos se han empleado tradicionalmente en la industria de los detergentes, pues fungen como principios activos de estos productos. Sin embargo, tienen muchos más usos y aplicaciones poco conocidas. Se emplean como dispersantes y emulsificantes, incrementan la producción en la extracción de petróleo, estabilizan cosméticos, medicamentos y alimentos entre otros. Sus aplicaciones dependen de su naturaleza química así como de su grado de actividad. Griffin¹⁵ encontró una forma de cuantificar la relación entre las partes hidrofílica e hidrofóbica de una molécula, lo que permitió establecer el grado de actividad de los tensoactivos con base en el balance hidrofílico-lipofílico (HLB), cuyo valor aumenta al aumentar la polaridad general de la molécula. Los valores de HLB pueden ser usados para indicar la conveniencia de un tensoactivo en una aplicación particular (Tabla II.3).

Tabla II.3. Aplicaciones de los tensoactivos según su balance hidrofílico-lipofílico (HLB).

Intervalo de HLB	Aplicación
<3	Películas superficiales
3-6	Emulsificadores de agua en aceite
7-9	Agente humectante
8-15	Emulsificadores de aceite en agua
13-15	Detergentes
15-18	Solubilizantes

Dado el amplio intervalo de valores de HLB que pueden tener los tensoactivos, y la baja toxicidad de la mayoría de ellos, no es extraño que se les encuentren cada vez más aplicaciones. Algunos ejemplos se enlistan en la Tabla II.4.

Tabla II.4. Aplicaciones de tensoactivos.

Campo de aplicación	Función
Proceso textil	Ayuda en todos los pasos, coloración, blanqueamiento, desengrasado, etc.
Detergencia	Ablandadores, agentes de limpieza, etc.
Procesado de metales	Proceso ácido para la remoción de óxido.
Agricultura	Emulsificadores y agentes de secado para herbicidas.
Polímeros	Estabilizadores de emulsiones, plastificantes.
Papel	Mejoran la absorbencia y la resistencia a la humedad.
Procesado de piel	Ayudan en todos los pasos.
Cosméticos y fármacos	Agentes emulsificantes.
Alimentos	Emulsificantes de grasas

II.2.3 Clasificación de tensoactivos

Debido a la amplia gama de estructuras de los tensoactivos existentes, pueden encontrarse en la literatura varias formas de clasificación. Una de las más comunes consiste en separarlos según la carga que adquieren en disolución acuosa (Fig. II.16) [12].

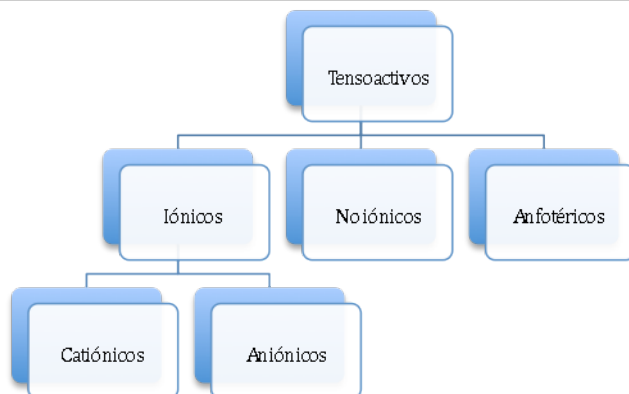


Figura II.16. Clasificación de tensoactivos según su carga en disolución.

Existe otra clasificación que agrupa a los tensoactivos haciendo la distinción entre aniónicos, catiónicos, anfotéricos y neutros. En ésta, los tensoactivos polietoxilados, a pesar de ser *No iónicos*, se consideran en un grupo aparte debido a razones analíticas [15]:

1. Tensoactivos aniónicos
2. Tensoactivos catiónicos
3. Tensoactivos anfotéricos
4. Tensoactivos No iónicos
5. Tensoactivos de aductos de alquilenóxidos
6. Tensoactivos poliméricos y con heteroátomos

II.2.3.1 Iónicos

Esta clase se caracteriza por estar compuesta por un par de iones de carga opuesta donde, como regla, solo uno de ellos actúa como tensoactivo. El contra ión es una especie inorgánica u orgánica de baja masa molar. Es claro que existen dos tipos en esta clasificación: ***tensoactivos aniónicos*** y ***tensoactivos catiónicos***.

Los tensoactivos aniónicos tienen en su estructura grupos con carga negativa mientras que los catiónicos poseen carga positiva (Fig. II.17). Los tensoactivos aniónicos sirven frecuentemente como jabones y los catiónicos como germicidas o desinfectantes.

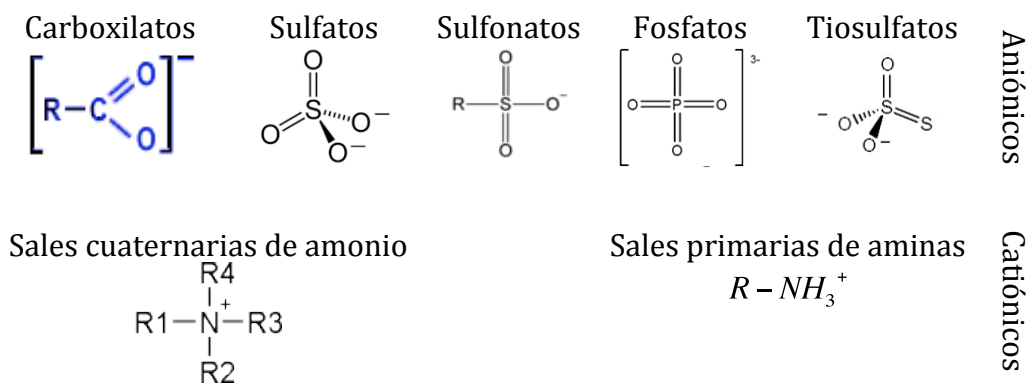


Figura II.17. Ejemplos de tensoactivos aniónicos y catiónicos.

II.2.3.2 No iónicos y Anfotéricos

Los tensoactivos *No iónicos* son todos aquellos que no forman iones en disolución. Se emplean principalmente como detergentes o emulsificadores, dependiendo de su estructura y de su naturaleza. Pueden contener varios grupos funcionales en la estructura principal, como alcoholes (-OH) y éteres o poliéteres (-O-), entre otros.

Los tensoactivos *Anfotéricos* son aquellos que están constituidos por un par de iones que al disociarse genera dos especies iónicas, ambas con la capacidad de modificar la tensión superficial del disolvente. Son un caso especial de tensoactivos electroneutros, en el cual tanto el catión como el anión componen la misma molécula.

II.3 Alcoholes polietoxilados

Los derivados del óxido de etileno se pueden dividir en dos clases definidas por su masa molar; sin embargo, esta clasificación se basa en métodos de producción, nomenclatura comercial, propiedades y usos. La primera clase corresponde a los polímeros de baja masa molar con un intervalo que comprende entre 200-20,000 g/mol y reciben el nombre general de polietilenglicoles (PEGs) en muchas publicaciones. Se emplean en cerámicos, lubricantes, cosméticos, fármacos, uretanos y en muchas más aplicaciones. La segunda clasificación se refiere a los derivados poliméricos de alta masa molar que se encuentran en el intervalo de 1×10^5 - 5×10^6 g/mol y son nombrados polímeros de óxido de etileno o resinas de óxidos de polietileno. Estos compuestos se pueden emplear como agentes limpiadores, lubricantes, adhesivos y en otras aplicaciones donde se desean algunas de sus propiedades, como su solubilidad en agua y su alta viscosidad [16].

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

Los polímeros derivados del óxido de etileno también son conocidos como poliéteres o polioles. Los alquil alcoholes polietoxilados (AAP) corresponden a derivados poliméricos que tienen una estructura basada en una molécula de alcohol alifático. Los AAP poseen propiedades muy características debido a que, además de ser polímeros, son también tensoactivos (Fig. II.18).

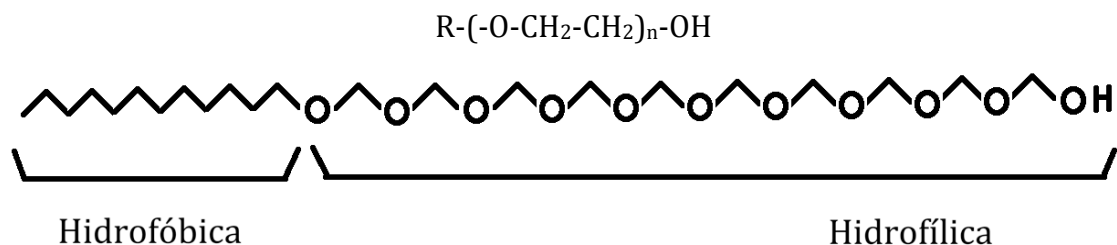


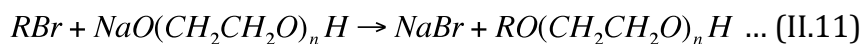
Figura II.18. Estructura general de un alquil alcohol polietoxilado. Ejemplo del alcohol $\text{C}_{12}\text{E}_{10}$.

Además de su amplio uso, estos compuestos adquirieron desde hace años una gran importancia debido a que se ha demostrado su amabilidad con el medioambiente; al ser alcoholes de cadenas lineales se ve favorecida su biodegradabilidad [12].

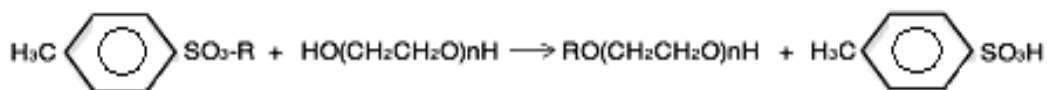
II.3.1 Método de síntesis

Existen tres formas de sintetizar a los alquil alcoholes polietoxilados [15,16]:

1. Eterificación por reacción de bromuro de alquilo y la sal monosódica de polietilenglicol; comúnmente conocida como síntesis de Williamson (Ec. II.11).



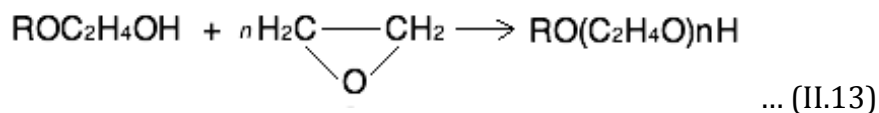
2. Eterificación por reacción del alquil-*p*-toluensulfonato y el polietilenglicol (Ec. II.12).



... (II.12)

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

3. Eterificación por reacción de un alcohol alifático y óxido de etileno (Ec. II.13).

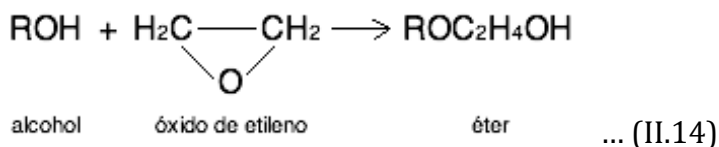


Las reacciones 1 y 2 fueron comúnmente empleadas para la síntesis de alcoholes polietoxilados con distribución uniforme de óxido de etileno a lo largo de su cadena principal. Sin embargo, para la síntesis comercial de estos tensoactivos no iónicos, el tercer método es mucho más utilizado debido al bajo costo y disponibilidad de los reactivos, alcohol y óxido de etileno, además de la relativa simplicidad en el proceso de la reacción.

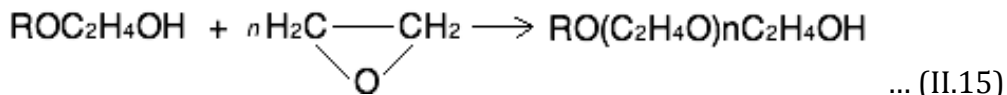
II.3.1.1 Reacción de condensación

Los óxidos de etileno se reportaron por primera vez por un grupo de químicos de la I.G. Farbenindustrie, quienes condensaron metanol, etanol, propanol e isobutanol con óxido de etileno usando un catalizador ácido o básico. Schoeller y Wittwer, ya en 1930, también efectuaron exitosamente la reacción entre un alcohol de cadena larga como el octadecanol y el óxido de etileno. Desde entonces, estos tensoactivos poliméricos se han desarrollado ampliamente demostrando su utilidad en muchos productos y procesos [15].

La reacción fundamental en la síntesis de alcoholes polietoxilados a partir de alcoholes alifáticos consiste en una adición de óxido de etileno al grupo hidroxilo de la molécula de alcohol para formar el éter (Ec. II.14):



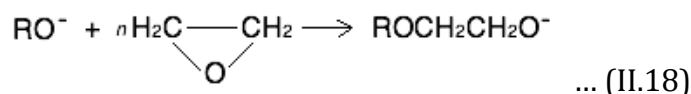
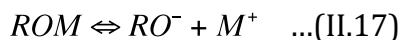
La molécula de éter reacciona posteriormente con moléculas adicionales de óxido de etileno para producir el alcohol polietoxilado (Ec. II.15):



Donde $n+1$ es el número de moles de óxido de etileno adicionado a una mol del alcohol base. Esta reacción se lleva a cabo en presencia de un catalizador ácido o básico que favorece la adición.

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

En el caso del uso de catalizadores básicos, se ha observado que la catálisis es más efectiva cuando aumenta la basicidad del catalizador. Esto ha servido a varios autores para determinar el posible mecanismo de reacción de la formación de los alquil alcoholes polietoxilados (Ec. II.16-18), pues se ha comprobado que sigue los mismos pasos que la oxietilación de los fenoles.



Donde R corresponde a la cadena alifática del alcohol, R' puede ser H, CH₃ o C₂H₅, y M cualquiera de los iones alcalinos Na⁺ o K⁺.

De las ecuaciones anteriores se deduce que a mayor fuerza de la base se favorece la formación de la especie ROM (Ec. II.16), la cual es responsable del equilibrio de disociación (Ec. II.17) y la sucesiva formación de RO⁻. También es de notarse que la concentración de la base debe jugar un papel determinante en la cinética de reacción.

La síntesis de los alcoholes polietoxilados por condensación se ve afectada por diversos parámetros que tienen influencia sobre la cinética de reacción [15]:

- **Catalizador empleado.** A mayor fuerza de la base se favorece la reacción de condensación.
- **Concentración de la base.** Juega un papel importante pues el grado de la reacción incrementa con la concentración del catalizador.
- **Temperatura.** El grado de la adición del óxido de etileno incrementa con la temperatura de reacción; a mayor temperatura, mayor rapidez de síntesis. Normalmente se emplean temperaturas de 135 a 200°C.
- **Presión.** La velocidad de reacción aumenta cuando se eleva la presión. Se ha observado que la tasa de reacción aumenta al aumentar la presión del óxido de etileno.
- **Estructura.** La estructura del alcohol alifático tiene influencia debido a que es una de las especies que dan origen al producto polietoxilado. Se ha observado que, para una serie homóloga, cuando aumenta el número de carbonos en la cadena alifática del alcohol decrece la razón de etoxilación. El mismo fenómeno ocurre cuando se presentan ramificaciones, esto es, a mayor número de ramificaciones presentes en la cadena del alcohol, decrece la etoxilación.

Es importante mencionar que, a pesar de que se controlen y optimicen estos parámetros, la reacción de condensación de los alcoholes polietoxilados no es específica, o mejor expresado, no da como resultado un compuesto único sino una mezcla de homólogos que varía únicamente en el grado de etoxilación. Esta polidispersidad será la que enmarcará las características fisicoquímicas de los alcoholes polietoxilados.

II.3.2 Propiedades fisicoquímicas y usos industriales

Los alquil alcoholes polietoxilados poseen propiedades fisicoquímicas muy especiales y ampliamente aprovechadas en la industria. Estas se deben a la naturaleza dual de sus estructuras. Algunas de ellas son [12,15]:

- **Solubilidad.** Los alcoholes polietoxilados muestran un amplio intervalo de solubilidades; pueden encontrarse desde los que son completamente solubles en aceite hasta los que lo son en agua. Esto es característico en los tensoactivos *No iónicos* y, en el caso presente, depende del número de unidades etoxilo en sus estructuras. En general, a mayor número de etoxilos en la cadena principal, mayor es la solubilidad en agua. Los compuestos que tienen de 1 a 5 unidades etoxilo presentan solubilidad en grasas, mientras que en el intervalo de 8 a 10 unidades etoxilo comienzan las propiedades dispersantes en agua debido a su mayor solubilidad en este medio. También se ha reportado que los alcoholes con alto número de etoxilos presentan un descenso en su solubilidad acuosa al aumentar la temperatura.
- **Densidad.** Esta propiedad se incrementa ligeramente con el aumento del número de unidades etoxilo, pero decrece al aumentar la temperatura.
- **Viscosidad.** Presenta la misma tendencia que la densidad, aumenta con el número de etoxilos y decrece al subir la temperatura.

Los alquil alcoholes polietoxilados poseen también propiedades de superficie como: detergencia, humectación, formación de espuma y abatimiento de la tensión superficial. Estas propiedades condicionan sus posibles aplicaciones industriales.

Existe una gran variedad de usos para estos productos, algunos ejemplos son:

- A) Detergentes. Su principal uso doméstico y en la industria es como agentes de limpieza. Se emplean en fórmulas para detergentes de ropa, vajillas, limpiadores, etc.
- B) Textil. Tienen un importante papel en la fabricación de telas naturales y sintéticas. Se usan como lubricantes o en el proceso de teñido, entre otras.
- C) Agricultura. Se emplean como emulsificantes en plaguicidas debido a que no son afectados por la dureza del agua o por el pH.

- D) Industria del papel. Se usan para mejorar la absorbencia del papel.
- E) Otros. Tienen muchos otros usos, como estabilizadores del caucho, formación de látex, en el proceso de curtido de piel, en pinturas y plásticos.

II.3.3 Análisis y métodos de caracterización

Debido a su amplia utilización en la industria, se han publicado un gran número de artículos enfocados al análisis de alcoholes polietoxilados, ya sea para control de calidad, o bien, para determinarlos con fines ambientales [12,15].

Los métodos reportados para el análisis de estos compuestos se pueden clasificar en dos grandes grupos: los que miden la concentración global de tensoactivo sin discriminar entre las especies presentes en la muestra y los que separan los tensoactivos previo a su análisis (Fig. II.19) [19]. Dentro de los primeros se encuentran los métodos espectrofotométricos como UV o fluorescencia, la precipitación, las reacciones de complejación, la medida de carbono orgánico total (COT) o demanda química de oxígeno (DQO). En el segundo grupo se encuentran las técnicas cromatográficas como la cromatografía de exclusión o permeación en gel (CPG), la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (CG).

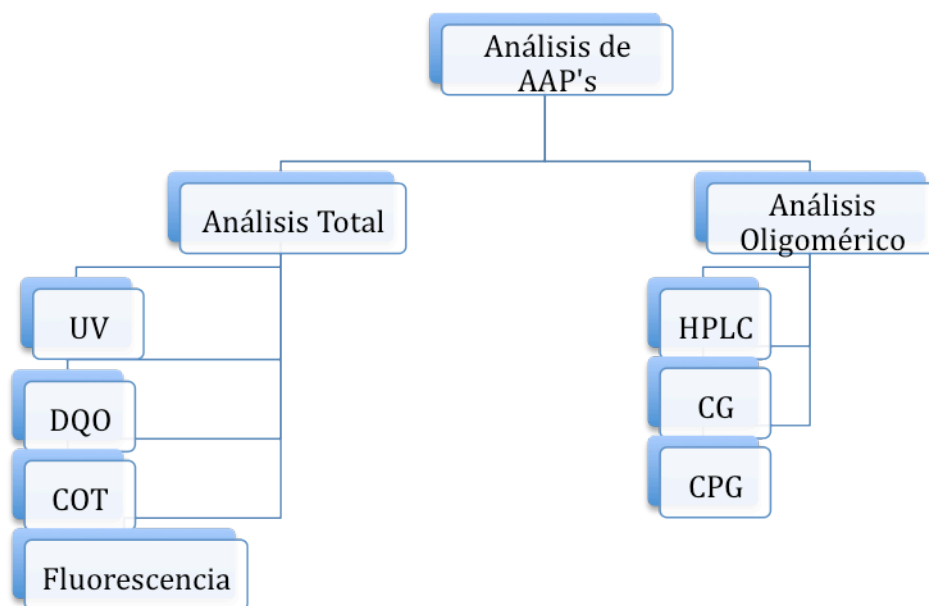


Figura II.19. Clasificación de las técnicas de análisis para alcoholes polietoxilados y algunos ejemplos.

Las técnicas cromatográficas se han empleado por mucho tiempo debido principalmente a los grandes beneficios que aportan; determinación de masas molares, cuantificación en diversas matrices y perfiles de distribución de oligómeros

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

son solo algunos ejemplos [7,8]. Entre estas técnicas, HPLC ha sido probablemente la más empleada para el análisis cuantitativo de alcoholes polietoxilados, como puede constatarse en la literatura sobre el tema, donde sólo un número menor de artículos reportan el uso de técnicas complementarias como CG o SEC para realizar estudios más específicos. En la Tabla II.5 se resumen las condiciones experimentales utilizadas en algunos de los métodos reportados para el análisis de diferentes alcoholes polietoxilados por HPLC.

En la Tabla II.5 se ha hecho énfasis en los trabajos dirigidos al análisis de los alquil alcoholes polietoxilados; sin embargo, algunos de estos métodos también son aplicables para la determinación de alquilfenoles polietoxilados, o bien, fueron diseñados para analizar mezclas de ambos tipos de tensoactivos. En algunos otros trabajos (no incluidos en la Tabla II.5), se han reportado métodos globales para la determinación conjunta de AAP y tensoactivos iónicos o anfotéricos con fines ambientales. También se han descrito diversas técnicas de preparación de muestra para el análisis de tensoactivos, entre ellas destacan la extracción en fase sólida (EFS) y la microextracción en fase sólida (MEFS).

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

Tabla II.5. Métodos reportados para el análisis de alcoholes polietoxilados por HPLC.

Tensoactivos analizados	Tipo de determinación	Columna	Disolventes	Modo de elución	Detector	Ref.
Polietilenglicol estearatos (PEG)	1. Estudio oligomérico	YMC-Pack C ₈ (250×4.6 mm, d.i.) 5 µm	AcCN/H ₂ O	Gradiente, mezclas de 80-20% H ₂ O -AcCN a 65-35% H ₂ O -AcCN y retorno a 80-20%	ELSD, ESI-EM	[17]
	2. Estudio cuantitativo	Wakosil 10 C ₁₈ (250×4.6 mm, d.i.) 10 µm	MeOH/H ₂ O			
Alquil alcoholes polietoxilados (AAP) y Nonilfenoles polietoxilados (NPE)	1. Estudio oligomérico	Columna Apex 1 Sílica (250×4.6 mm, d.i.) 5 µm Precolum.	AcCN/H ₂ O	Gradiente, 100 a 65 % de AcCN	ELSD, UV (NPE)	[18]
	2. Estudio cuantitativo	Hypersil ODS (250×4.6 mm, d.i.) 5 µm				
AAP, NPE y otros tensoactivos no iónicos simultáneos	Estudio cuantitativo	ODS H80 (250×4.6 mm, d.i.) 4 µm	MeOH/H ₂ O	Gradiente, 70 a 100 % de MeOH	ELSD	[19]
AAP	Estudio cuantitativo, tratamiento previo por Soxhlet y en columna	Lichrocart RP-C18	MeOH/H ₂ O	Gradiente, 80 a 100% de MeOH	UV derivatización con fenil isocianato	[20]
		Spherisorb ODS (100×3 mm, d.i.)	AcCN/H ₂ O	Gradiente, 50 a 100% de AcCN		
NPE	Estudio de propiedades cromato-gráficas (Termodinámicas)	RP-18 (200×4.6 mm, d.i.) 10 µm	MeOH/H ₂ O	Isocrático, mezclas con 90, 85 y 80% MeOH	RI	[21]
AAP	Estudio cuantitativo	Supelcosil TPR 100 (150×4.6 mm, d.i.)	AcCN/H ₂ O	Gradiente, 40 a 100 % ACN	Termospray-EM derivatización con 2 fluoro-N-metil piridinio p-toluen sulfonato	[22]
	1. Estudio cromatográfico (Multivariable)	Beckman C8 (250×4.6 mm, d.i.) 5 µm	AcCN/H ₂ O	Isocrático, mezclas del 50 al 60% de AcCN con diferentes adiciones de NaCl y sales de alquilamonio.		
AAP	2. Estudio cuantitativo	ODS-Zorbax	A: MeOH B: AcCN/H ₂ O (70:30%)	Gradiente, mezclas de 60% A hasta 95% A en 10 min.	UV EM	[24]

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

Tensoactivos analizados	Tipo de determinación	Columna	Disolventes	Modo de elución	Detector	Ref.
AAP en mezcla con otros tensoactivos aniónicos y anfotericos	Estudio cualitativo	Synergi Hydro-RP 80 (150x2.0 mm, d.i.) 4 µm	MeOH/ disolución acuosa de ac. acético	Gradiente, 5 a 100% de MeOH	ESI-EM	[25]
		Altima C18 (250x2.1 mm, d.i.) 5 µm	AcCN/ disolución acuosa de acetato de amonio	Gradiente, 5 a 85% ACN	LCQ-EM	
NPE	1. Estudio cuantitativo	Shodex GF-310 2D (150x2.1 mm, d.i.) 5 µm	AcCN/ disolución acuosa de acetato de amonio	Gradiente, 10 a 55% ACN	ESI-EM	[26]
	2. Estudio oligomérico					
AAP	1. Estudio cuantitativo	Luna C18 (150x2.0 mm, d.i.) 5 µm	Fase A NH ₄ OH/H ₂ O (0.1%) Fase B NH ₄ OH en AcCN/THF (0.1%: 90-10%)	Gradiente Fase B 15% hasta 100% en 25 min. Y 40°C.	ESI-EM derivatización con anhídrido ftálico	[27]
	2. Estudio oligomérico					
Octilfenol etoxilado	Estudio cuantitativo	Fluofix 120 (150x2.0 mm, d.i.) 5 µm	MeOH/H ₂ O	Isocrático MeOH/H ₂ O 50-50%	UV FAB-EM	[28]
AAP	Estudio oligomérico	Sepharon SGX C18 (f. reversa) Sepharon SGX sílica (f. normal)	Diversos: 1. AcCN/H ₂ O, 2. MeOH/H ₂ O, 3. PrOH/C ₆ H ₁₄ 4. AcCN/DCM/H ₂ O	Isocrático (40 y 65°): 1: AcCN del 70 al 100%, 2: MeOH del 80 al 100%, 3: PrOH del 20 al 80%, 4: (69.3-30-0.7%)	RI APCI-EM	[29]
AAP	Estudio cromatográfico	LiChrospher 100 RP-18 (250x4 mm, d.i.)	Mezclas AcCN/H ₂ O	Isocrático, mezclas de 90 a 100% AcCN	UV derivados cloruro de 3,5-dinitro benzolil	[30]
AAP	Estudio cuantitativo	SupelcoGel TPR-100 (100x2.1 mm, d.i.)	AcCN/H ₂ O	Gradiente, 40 a 100% ACN	ESI-EM derivatización con 2-fluoro-N-metil piridinio p-toluen sulfonato	[31]

EM: espectrometría de masas, ESI: ionización por electrospray, FAB: bombardeo de átomos rápidos, APCI: ionización química a presión atmosférica, LCQ: trampa lineal de iones, MEFS: microextracción en fase sólida, ELSD: detector de dispersión de luz tras evaporación de disolvente, RI: detector de índice de refracción, AcCN: acetonitrilo, MeOH: metanol, PrOH: 2-propanol

II.3.3.1 Comportamiento en HPLC

El análisis de los AAP por cromatografía de líquidos se puede realizar con base en dos criterios, la separación por cadenas hidrofóbicas y la resolución oligomérica o separación por cadenas hidrofílicas [29].

En general el análisis de AAP con base en su cadena hidrófoba se realiza en columnas de fase reversa, por las interacciones que tienen lugar entre la cadena alquílica de los alcoholes y la fase estacionaria poco polar. Se ha reportado que, para una misma serie, el tiempo de retención aumenta al aumentar el número de carbonos en la cadena alifática del tensoactivo, lo que es un comportamiento típico de la cromatografía en fase reversa. Algunos autores han encontrado que el número de unidades EO en las cadenas principales afecta el tiempo de retención de los alcoholes. A mayor número nominal de etoxilos, mayor es el tiempo de retención en fases reversas, aunque ésta no es una regla general ya que también se ha observado el efecto inverso en ciertas composiciones de fase móvil. Para este tipo de análisis se ha reportado tanto el uso de columnas C₈ como C₁₈, aunque existe una marcada tendencia por esta última [18,29].

Para el caso de la separación con respecto a sus cadenas hidrofílicas (o bien, por número de etoxilos), la fase estacionaria más utilizada ha sido la sílice. El estudio de AAP con base en este criterio se ha llevado a cabo comúnmente en fase normal con una amplia gama de fases móviles, desde hidrocarburos modificados con un poco de alcohol hasta mezclas de disolventes medianamente polares modificadas con un poco de agua. No obstante, también se encuentran algunos casos donde se utilizaron fases reversas con mezclas agua-disolvente orgánico como fase móvil. Este tipo de análisis permite establecer un perfil de los oligómeros que constituyen al alcohol polietoxilado, lo que ayuda a determinar la *polidispersidad* de las muestras pues indica el número de oligómeros presentes y su cantidad relativa [18].

Cualquiera que sea el tipo de separación, en la gran mayoría de los trabajos examinados se utilizaron gradientes de elución, probablemente con el fin de mejorar las características de los picos (simetría y ensanchamiento) y disminuir los tiempos de análisis. La elución isocrática se utilizó primordialmente en estudios de comportamiento cromatográfico o para la determinación de constantes termodinámicas a partir de datos de retención.

En lo referente a los métodos de detección, gran parte de los artículos reportan el uso de técnicas de espectrometría de masas como FAB-EM, ESI-EM y APCI-EM. . Otro detector muy utilizado fue el de dispersión de luz tras evaporación de disolvente (ELSD), empleado no sólo para el análisis de alquil alcoholes sino también para otros derivados polietoxilados como ácidos y ésteres. Aunque en menor proporción, los detectores más convencionales como el UV y el de índice de refracción (RI) también han sido utilizados en el análisis de AAP, a pesar de sus limitaciones. En efecto, el RI es poco sensible y sólo puede trabajarse en condiciones de elución isocrática. El UV tiene la desventaja de que los alquil alcoholes polietoxilados prácticamente no dan

respuesta aún a bajas longitudes de onda; sin embargo, es posible introducir grupos cromóforos en estos analitos mediante reacciones de derivatización con reactivos como el cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo [27].

II.4 Diseño y análisis de experimentos

Es de gran importancia, para cualquier estudio científico, tener presente que existen múltiples factores o parámetros físicos y químicos que pueden influir en el comportamiento de una sustancia en un sistema dado. Por tal motivo, el uso de herramientas estadísticas en la planeación de experimentos y en el tratamiento de los datos es indispensable para discernir, con la mayor rapidez y efectividad posibles, el grado de influencia de cada uno de esos factores y sus eventuales interrelaciones.

En el caso del análisis cromatográfico, el objetivo de todo buen cromatografista es encontrar condiciones óptimas para la separación y determinación de los componentes de interés en una muestra dada. Sin embargo, en ocasiones el problema no es sencillo y requiere de arduas jornadas de trabajo donde por ensayo y error se llega a un resultado medianamente satisfactorio. Es allí donde entra la necesidad de establecer un método más confiable y eficiente de experimentación, método que es posible encontrar gracias al diseño y análisis de experimentos. Por ejemplo, una de las herramientas más útiles en la determinación de condiciones cromatográficas para un soluto se basa en los estudios de relaciones lineales de energía de solvatación (LSER, por las siglas del nombre en inglés: linear solvation energy relationships), que permiten derivar un modelo capaz de predecir modificaciones en las variables de respuesta a partir de variables principales. La ecuación de LSER para cromatografía de líquidos es la siguiente (Ecuación II.19):

$$\text{Propiedad del Solute: } c + eE + sS + aA + bB + vV \quad \dots \text{ (II.19)}$$

Dónde la *propiedad del soluto* puede ser de cualquier tipo, como $\log k'$, $\log P$, etc.; E es el exceso de refracción molar; S es la dipolaridad/polarizabilidad; A son todos los enlaces ácidos de hidrógeno; B son todos los hidrógenos básicos; V es el volumen de McGowan ($\text{cm}^3\text{mol}^{-1}$); c es una constante (ordenada al origen) e , s , a , b y v son coeficientes del modelo de regresión multilínea. En esta ecuación, las variables independientes (mayúsculas) representan interacciones *soluto-disolvente* que afectan la retención. Los coeficientes (minúsculas) se relacionan con la naturaleza química de las fases móvil-estacionaria y pueden ser calculadas con facilidad por medio del modelo polinomial.

El modelo LSER puede ser aplicado con una gran cantidad de variaciones en las condiciones cromatográficas. Esta técnica tiene fines predictivos y de exploración sobre parámetros como el tiempo de retención que, aunque no es suficientemente

II. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

preciso, puede emplearse para describir y explicar el proceso de reparto y, de alguna forma, para optimizar separaciones [32].

Se han establecido relaciones lineales entre el logaritmo del factor de retención (k) y la fracción en volumen del modificador orgánico (ϕ) para una amplia serie de compuestos (Ecuación II.20):

$$\text{Log } k = \log k_w - S\phi \quad \dots(\text{II.20})$$

Dónde S es la pendiente y $\log k_w$ es la ordenada al origen.

Las relaciones lineales de energía de solvatación son abundantemente empleadas para caracterización de fases estacionarias (polímeros). Otro importante aspecto es para determinar parámetros de lipofilicidad (hidrofobicidad) a partir de los datos de retención.

El modelo antes mencionado, como otros, requiere de un proceso de experimentación para poder deducir ecuaciones que ayuden a describir comportamientos. Los experimentos se usan para estudiar el desempeño de estos procesos y sistemas.

Un proceso es una combinación de máquinas, métodos, personas o pasos que transforman una entrada en una salida que tiene una o más respuestas observables. Existen varias estrategias para la experimentación, como las que se mencionan a continuación [33]:

- Enfoque de la mejor conjetura. Consiste en definir factores a los cuales se les dará interés primario, y se les dará o no interés según el resultado que se desee obtener. Este procedimiento tiene dos desventajas. Una es que si la conjetura inicial no produce los resultados deseados, entonces se tendrá que hacer otra y esto podría continuar por tiempo indefinido sin garantía de éxito. Por el contrario, si la conjetura inicial produce un resultado satisfactorio, entonces podrían suspenderse las pruebas aún cuando no hay ninguna garantía de que se ha encontrado la mejor solución.
- Enfoque de un factor a la vez. Este método consiste en seleccionar un punto de partida o **línea base** de los niveles para cada factor, para después variar sucesivamente cada uno en su intervalo, manteniendo constantes los otros factores en el nivel base. Al finalizar, se construyen una serie de gráficas que muestran la forma en que la variable de respuesta es afectada al variar cada factor manteniendo los demás constantes. La desventaja de este enfoque es que no considera las posibles interacciones entre los factores.

Una forma más adecuada para trabajar con varios factores es manejar un programa de experimentación basado en un diseño factorial.

II.4.1 Diseño factorial 2^k

Se trata de una estrategia experimental en la que los factores se hacen variar en **conjunto**, en lugar de uno a la vez. El diseño de experimentos considera todas las combinaciones posibles de los factores en sus niveles alto y bajo. Por ejemplo, a un estudio con dos factores le correspondería un **diseño factorial 2^2** (dos factores, cada uno con dos niveles) y, geoméricamente, los cuatro experimentos formarían los vértices de un cuadrado. Para el caso de un estudio con tres factores, se tendría un **diseño factorial 2^3** y las ocho determinaciones representarían geoméricamente los vértices de un cubo. Esta estrategia permite determinar las posibles interacciones entre factores; además es posible afinar y hacer más robusto al modelo generado si se realizan réplicas de los experimentos [33].

II.4.2 Aplicaciones del diseño experimental y pautas generales para diseño.

El diseño de experimentos puede aplicarse en múltiples disciplinas debido a la cantidad de información que ofrece. Algunos ejemplos son: la caracterización de procesos en la industria, el diseño de un nuevo producto, el desarrollo e investigación de las ciencias exactas, la optimización de métodos de análisis, etc. Sea cual sea el objetivo de su uso, es necesario seguir rigurosamente una serie de pautas para poder obtener resultados útiles y confiables. Estas pautas son:

1. Identificación y enunciado del problema.
2. Elección de los factores, definición de sus intervalos de variación y determinación de los niveles.
3. Selección de la variable de respuesta.
4. Elección del diseño experimental.
5. Realización de los experimentos.
6. Análisis estadístico de los datos
7. Conclusiones y recomendaciones.

Algo que es muy importante tener en cuenta durante este proceso, es que el diseño experimental y el análisis deben ser lo más sencillo posible, así será más fácil entender e interpretar los resultados.

III. OBJETIVOS

Hipótesis

Es posible predecir, en forma general, las condiciones adecuadas para la separación y análisis de muestras de tensoactivos del tipo alcohol alquílico polietoxilado, si se realiza un estudio cromatográfico detallado de una serie de estándares convenientemente elegidos, que permitan obtener la información fisico-química pertinente para deducir y comprender mejor el mecanismo de retención de estos compuestos hidrofóbicos-hidrofilicos en columnas de fase reversa.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo principal

Estudiar el comportamiento cromatográfico de alcoholes alquil polietoxilados en fase reversa en función del tamaño de sus cadenas hidrofóbicas e hidrofílicas, con el fin de determinar la influencia de los parámetros experimentales sobre la retención y separación, tanto de los tensoactivos entre sí como de los oligómeros que los constituyen.

III.2 Objetivos específicos

- Establecer condiciones óptimas para la detección de alcoholes alquil polietoxilados en medios acetonitrilo-agua y metanol-agua, mediante el detector de dispersión de luz tras evaporación de disolvente.
- Determinar el efecto de la composición de la fase móvil sobre la retención y la resolución oligomérica de una serie de estándares de alcoholes alquil polietoxilados en columnas de fase reversa. Dicha serie estará constituida por compuestos con cadenas hidrocarbonadas de 12 a 18 carbonos y cadenas etoxiladas de diversos tamaños.
- Analizar la influencia de la velocidad de flujo de la fase móvil y la temperatura de la columna sobre la retención, simetría de pico y resolución oligomérica de alcoholes alquil polietoxilados en columnas de fase reversa.
- Desarrollar modelos estadísticos que permitan cuantificar el efecto relativo de las principales variables experimentales en la retención y resolución oligomérica de este tipo de analitos.

III. OBJETIVOS

- Deducir las condiciones óptimas para el análisis de mezclas de alcoholes polietoxilados comerciales, con diferente longitud de cadena hidrocarbonada y diversos grados de polidispersidad, mediante cromatografía de líquidos en fase reversa con detector de dispersión de luz tras evaporación de disolvente.
- Encontrar las mejores condiciones cromatográficas para la separación de los oligómeros constituyentes de los tensoactivos del tipo alcohol alquílico polietoxilado.
- Determinar el orden de elución de los oligómeros en las condiciones cromatográficas establecidas, mediante el auxilio de técnicas de espectrometría de masas.

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

IV.1 Material y Equipo

Material Volumétrico

- Matraces aforados de 500 y 1000 mL
- Pipetas volumétricas de 5, 10, 20, 25 y 50 mL
- Pipetas graduadas
- Micropipetas Eppendorf de 250, 50 y 10 μ L con puntas Transferpette, Wertheim Alemania
- Vasos de precipitados
- Tubos eppendorf de 2 mL
- Jeringa de 100 μ l para cromatografía de líquidos, Hamilton, Microliter 710

Equipo y Accesorios

- Sistema purificador y desionizador de agua NANOPURE, Barnstead Thermolyne modelo 04747
- Balanza analítica Ohaus
- Columna analítica (150 \times 4.6 mm d.i.) empacada con fase reversa Hypersil ODS, 5 μ m, de Thermo Scientific
- Calefactor de columna, Eppendorf
- Unión "T" de polipropileno para tubería de 1/16" d.e.
- Bomba cuaternaria para cromatografía de líquidos, Gilson modelo 305.
- Bomba secundaria, Gilson modelo 306.
- Módulo manométrico, Gilson modelo 805.
- Mezclador dinámico, Gilson modelo 811B.
- Inyector Rheodyne 7125 con bucle de 20 μ L.
- Detector de dispersión de luz tras evaporación de disolvente (ELSD, por las siglas del nombre en inglés: evaporative light scattering detector), de Polymer Laboratories modelo LC-1150.
- Espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4800 plus, Applied Biosystems con láser Nd TAG de 355 nm

Programas y Equipo de Cómputo

- Sistema de adquisición y tratamiento de datos cromatográficos constituido por: computadora Compaq Presario Pentium, programa Clarity versión 2.6.04.402 de Datapex, Praga, República Checa
- Análisis estadístico por STATGRAPHICS Centurion XV versión 15.1.02 de StatPont, USA

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

- Sistema de adquisición y tratamiento de datos espectroscópicos por: Universal MS Data Analysis Tool, Mass Navigator versión 1.2 de Mitsui Industry Co., Japón

IV.2 Reactivos y disolventes

Serie C₁₂

- 1-Dodecanol (C₁₂H₂₆O), Sigma-Aldrich, MO, USA.
- Polioxietilén-4-lauril éter (Brij®), (C₂H₄O)₄C₁₂H₂₆O, Sigma-Aldrich, MO, USA.
- Polioxietilén-10-lauril éter, (C₂H₄O)₁₀C₁₂H₂₆O, Sigma-Aldrich, MO, USA.
- Polioxietilén-23-lauril éter (Brij®35) (C₂H₄O)₂₃C₁₂H₂₆O, Sigma-Aldrich, MO, USA.

Serie C₁₄

- 1-Tetradecanol (C₁₄H₃₀O), Sigma-Aldrich, MO, USA.
- Polioxietilén-4-tetradecil éter, (C₂H₄O)₄C₁₄H₃₀O, Sigma-Aldrich, MO, USA.
- Polioxietilén-8-tetradecil éter, ((C₂H₄O)₈C₁₄H₃₀O, Sigma-Aldrich, MO, USA.

Serie C₁₆

- 1-Hexadecanol (C₁₆H₃₄O), Sigma-Aldrich, MO, USA.
- Dietilén glicol monohexadecil éter (Brij®52) (C₂H₄O)₂C₁₆H₃₄O, Sigma-Aldrich, MO, USA.
- Polioxietilén-10-cetil éter (Brij®56) (C₂H₄O)₁₀C₁₆H₃₄O, Sigma-Aldrich, MO, USA.
- Polioxietilén-20-cetil éter (Brij®58) (C₂H₄O)₂₀C₁₆H₃₄O, Sigma-Aldrich, MO, USA.

Serie C₁₈

- 1-Octadecanol (C₁₈H₃₈O), Sigma-Aldrich, MO, USA.
- Polioxietilén-4-estearil éter, (C₂H₄O)₄C₁₈H₃₈O, Fluka, Suiza.
- Polioxietilén-10-estearil éter (Brij®76), (C₂H₄O)₁₀C₁₈H₃₈O, Sigma-Aldrich, MO, USA.
- Polioxietilén-20-estearil éter (Brij®78), (C₂H₄O)₂₀C₁₈H₃₈O, Sigma-Aldrich, MO, USA.
- Polioxietilén-100-estearil éter (Brij®700), (C₂H₄O)₁₀₀C₁₈H₃₈O, Sigma-Aldrich, MO, USA.

Matrices

- Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (α -CCA)
- Trans-2-[3-(4-ter-1-butilfenil)-2-metil-2-propeniliden]malonitrilo (DCBT)
- Ácido trifluoroacético (TFA)

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Disolventes

- Metanol (MeOH) grado HPLC, Fisher Scientific
- Acetonitrilo (AcCN) grado HPLC, Prolabo
- Tetrahidrofurano grado HPLC, J.T. Baker

IV.3 Metodología

IV.3.1 Optimización de condiciones generales

Inicialmente se realizaron pruebas de solubilidad para todos los alcoholes de las series C12-C18 en disolventes polares puros (metanol, acetonitrilo y agua) y en mezclas MeOH-agua y AcCN-agua. Posteriormente, se prepararon disoluciones estándar de cada analito a concentración apropiada en varios medios, dependiendo de su solubilidad y de la respuesta generada en el detector. Las concentraciones variaron en el intervalo de 260 a 1540 ppm (mg/L) en metanol, metanol-agua o acetonitrilo-agua (Tabla IV.1).

Tabla IV.1. Concentraciones promedio de los estándares de alcoholes polietoxilados.

Serie							
C ₁₂ n _x		C ₁₄ n _x		C ₁₆ n _x		C ₁₈ n _x	
Compuesto	Conc. [ppm]	Compuesto	Conc. [ppm]	Compuesto	Conc. [ppm]	Compuesto	Conc. [ppm]
C ₁₂ OH	1540	C ₁₄ OH	1450	C ₁₆ OH	700	C ₁₈ OH	850
C ₁₂ n ₄	612	C ₁₄ n ₄	860	C ₁₆ n ₂	350	C ₁₈ n ₄	440
C ₁₂ n ₁₀	670	C ₁₄ n ₈	300	C ₁₆ n ₁₀	280	C ₁₈ n ₁₀	320
C ₁₂ n ₂₃	620	-	-	C ₁₆ n ₂₀	260	C ₁₈ n ₂₀	550
-	-	-	-	-	-	C ₁₈ n ₁₀₀	600

En la nomenclatura empleada **n_x** representa al número nominal de etoxilos (EO) unidos a la cadena principal **C_y**.

La optimización de parámetros de trabajo del detector ELSD se llevó a cabo utilizando como analitos de prueba a los alcoholes C₁₈n₁₀ y C₁₂n₁₀. Para obtener una buena respuesta de estos compuestos en las fases móviles estudiadas, se varió la temperatura de nebulización entre 40 y 90°C, la temperatura de evaporación entre 60

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

y 110°C, y la velocidad de flujo del gas acarreador (N₂) en el intervalo de 0.5-2 mL/min.

En lo que respecta a la separación cromatográfica, se establecieron algunas operaciones rutinarias para evitar problemas de contaminación cruzada, así como el aumento de presión por oclusión de filtros y tuberías o formación de depósitos en la columna. Después de cada corrida cromatográfica, se efectuó un lavado del bucle del inyector con 1 mL de agua seguido de 1 mL de metanol. Así mismo, se realizaron lavados exhaustivos de la columna después de un cierto número de corridas, cuando se observaba un incremento en el ruido de la línea base. Estos lavados consistieron en hacer pasar por la columna una serie de disolventes (5 a 10 mL de cada uno), primero en orden decreciente de polaridad y luego regresando al más polar. La serie completa fue la siguiente: agua-metanol-acetonitrilo-tetrahidrofurano-acetonitrilo-metanol-agua.

IV.3.2 Estudio de retención y separación en función de la composición de la fase móvil.

A partir de los resultados obtenidos en ensayos preliminares de retención de los solutos en la columna de fase reversa C-18, se decidió dividir el estudio en dos partes según el disolvente orgánico presente en la fase móvil.

El estudio de retención en fases móviles metanol-agua se realizó trabajando en el intervalo de 100 a 85% de disolvente orgánico, con incrementos paulatinos de 5% (v/v) en el contenido de agua para cada ensayo. No se trabajó a contenidos de metanol menores al 85% debido a la alta retención de algunos analitos, lo que ocasionaba picos muy ensanchados, difíciles de detectar y con gran incertidumbre en la asignación del tiempo de retención. En el caso de las fases móviles acetonitrilo-agua, se trabajó principalmente en el intervalo de 100 a 80% de disolvente orgánico, pero también se exploraron fases móviles hasta con 50% de agua para uno de los analitos de interés.

En todos los casos, la composición de las fases móviles se controló cuidadosamente, midiendo los volúmenes de agua y disolvente orgánico con pipetas volumétricas y matraces aforados antes de mezclarlos. Las fases móviles preparadas se almacenaron en frascos ámbar a temperatura ambiente y se renovaron, al máximo, cada dos días. Pevio a su uso, las fases móviles fueron degasificadas por ultrasonido durante ~4 min.

La temperatura se controló mediante un calefactor de columnas, eligiendo la temperatura óptima en función de la simetría de los picos de los solutos y otros factores prácticos (estabilidad de la columna, temperatura ambiente). Se probaron temperaturas desde 20 hasta 40°C, optando finalmente por fijar una temperatura de 30°C. La velocidad de flujo de la fase móvil se varió también desde 0.3 hasta 1 mL/min, eligiendo esta última para reducir los tiempos de análisis. Cabe mencionar

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

que en algunos experimentos los tiempos de retención de los solutos fueron sumamente largos, requiriéndose de varios días para completar el análisis de toda la serie de compuestos.

Cada alcohol se inyectó en el cromatógrafo en todas las condiciones probadas, con una o dos réplicas por analito.

Las condiciones del detector ELSD empleadas en estos estudios fueron las siguientes:

- Fases metanol-agua. Temperatura de nebulización 80°C, temperatura de evaporación 90°C y flujo del gas acarreador (N₂) de 1.0 mL/min.
- Fases acetonitrilo-agua. Temperatura de nebulización 40°C, temperatura de evaporación 90°C y flujo del gas acarreador (N₂) de 0.6 mL/min.

IV.3.3 Análisis multivariable

Una vez conocidas las tendencias de comportamiento de los alcoholes en las fases móviles MeOH-H₂O, se realizaron una serie de experimentos especialmente diseñados para cuantificar la influencia relativa de las principales variables experimentales mediante el análisis estadístico de los datos obtenidos en éstos. Se eligió como soluto modelo al alcohol cetílico decaetoxilado C₁₆H₃₄O₁₀ (valor nominal) y se tomó como efecto principal al **volumen de retención (V_R)** de dicho compuesto. Se variaron tres factores principales: **Temperatura (°C)**, **composición de la fase móvil (%H₂O)** y **velocidad de la fase móvil (mL/min)**.

Para mantener la mayor simplicidad posible en el estudio, se empleó un modelo factorial 2^K, en donde K representa el número de variables incluidas en el modelo (**ver Anexo II**). lo que implica que se requiere de 2³ = 8 experimentos para completar el estudio; sin embargo se realizó una réplica para mejorar el modelo, por lo que se necesitaron 16 experimentos en total. En la Tabla IV.2 se especifican las variables analizadas, sus niveles fijados y las combinaciones de niveles que completaron los 8 experimentos base.

Debido al comportamiento particular de los alquil alcoholes polietoxilados en las mezclas *acetonitrilo-agua*, el estudio de variables se efectuó de forma *cualitativa* mediante la comparación de cromatogramas para diferentes condiciones de análisis que se detallan en la Tabla IV.3. En este caso se sustituyó el **factor composición de la fase móvil (%H₂O)** por el **largo de cadena hidrocarbonada (L)** que fue más adecuado. Los ensayos fueron realizados en fase móvil AcCN-H₂O (90-10%).

Para todas las pruebas señaladas en la Tabla IV.2, las condiciones del detector ELSD fueron: temperatura de nebulización 40°C, temperatura de evaporación 90°C y flujo de N₂ a 0.6 mL/min.

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Tabla IV.2. Condiciones de análisis multivariable para las fases MeOH-H₂O. Se muestran los niveles alto y bajo para los factores principales así como su combinación para el desarrollo experimental. El orden de los experimentos es arbitrario.

	Fases Móviles MeOH-H ₂ O	Niveles		Experimentos							
		+	-	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Factores	Temperatura (°C)	40	25	+	+	+	+	-	-	-	-
	Composición de fase móvil (%H ₂ O)	15	0	+	+	-	-	+	+	-	-
	Velocidad de la fase móvil (mL/min)	1	0.3	+	-	+	-	+	-	+	-
	Efecto principal	Volumen de retención (V _R)									

Tabla IV.3. Condiciones de análisis multivariable para las fases AcCN-H₂O. Se muestran los niveles alto y bajo para los factores principales así como su combinación para el desarrollo experimental. El análisis fue estrictamente *cualitativo*. El orden de los experimentos es arbitrario.

	Fases Móviles AcCN-H ₂ O	Niveles		Experimentos							
		+	-	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Factores	Temperatura (°C)	40	25	+	+	+	+	-	-	-	-
	Velocidad de la fase móvil (mL/min)	1	0.3	+	+	-	-	+	+	-	-
	Largo de cadena hidrocarbonada (L)	12	16	+	-	+	-	+	-	+	-
	Efecto principal	Volumen de retención (V _R)									

IV.3.4 Análisis de Masas por MALDI-TOF

Los oligómeros de los tensoactivos separados en la columna de fase reversa fueron recolectados por fraccionamiento del efluente mediante una unión T, colocada justo antes de la entrada al detector (Fig. IV.1). Este arreglo experimental permitió monitorear el efluente de la columna, colectando simultáneamente pequeñas fracciones de cada pico eluido. Cabe hacer notar que, por el modo de operación del detector ELSD, la muestra no puede ser colectada a la salida de éste ya que la fase móvil es evaporada y los solutos son expulsados del detector como una nube de polvo dispersa en el gas acarreador.

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

La recolección de oligómeros se realizó únicamente para los alcoholes $C_{12n_{10}}$, C_{14n_4} , $C_{16n_{10}}$ y $C_{18n_{10}}$, separados utilizando la fase móvil acetonitrilo-agua 90:10 (v/v) a flujo de 1 mL/min. Las condiciones del detector ELSD fueron: temperatura de nebulización 40°C, temperatura de evaporación 90°C y flujo de N_2 a 0.6 mL/min.

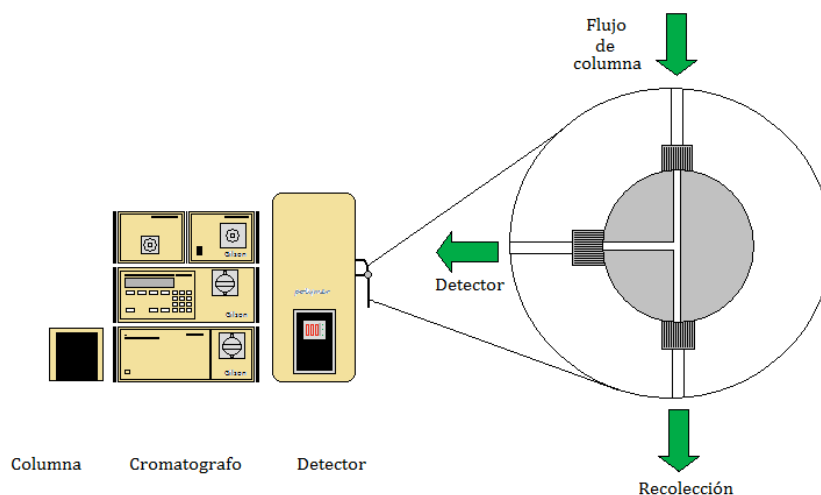


Figura IV.1. Diagrama del dispositivo para fraccionamiento de los oligómeros separados por HPLC. La recolección se realizó con el monitoreo simultáneo de picos por el detector ELSD.

Las fracciones se colectaron en tubos eppendorf etiquetados; posteriormente se evaporaron a sequedad y se les añadió un volumen de 0.5 mL de metanol. Estos oligómeros se analizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF usando el *método de gota seca* (Dried droplet method) para la preparación de muestra.

Se evaluó la eficacia de tres matrices en la preparación de muestra para el proceso de ionización-detección. Para la matriz A se pesaron 5.24 mg de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (α -CCA) y se diluyeron en 520 μ L de una disolución de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% (v/v) en acetonitrilo-agua 50:50 (v/v). Para la matriz B se pesaron 2.4 mg de DCBT (trans-2-[3-(4-ter-1-butilfenil)-2-metil-2-propeniliden]malonitrilo) y se diluyeron en 240 μ L de la disolución de TFA antes mencionada. La última matriz (C) fue preparada con 250 mg de DCBT diluidos en acetonitrilo puro. En la placa de muestreo se colocaron mediante una micropipeta Eppendorf 0.8 μ L de las disoluciones estándar de cada uno de los alcoholes por triplicado, así como los estándares necesarios para la calibración del equipo. A cada muestra se le añadió un volumen de 0.8 μ L de una de las tres matrices y se dejaron secar las micro gotas. La placa se introdujo en el equipo MALDI-TOF/TOF donde se corrió cada muestra hasta encontrar las mejores condiciones para su análisis. Posteriormente, se realizó el mismo procedimiento para cada uno de los oligómeros fraccionadas (por duplicado), empleando únicamente la matriz B.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Precisión de las mediciones

Para el estudio de los alcoholes polietoxilados, como para cualquier otro análisis, es de gran importancia determinar la confiabilidad de los datos recabados experimentalmente. La precisión en las mediciones cromatográficas resulta indispensable para poder sustentar las posibles hipótesis y conclusiones del estudio. Dado que los alquil alcoholes polietoxilados presentan comportamientos de retención muy particulares, generan picos relativamente anchos y su detección es poco sensible, se consideró necesario realizar un análisis previo de los datos experimentales para determinar la incertidumbre en las mediciones.

La principal variable de respuesta a lo largo del presente estudio fue el *volumen de retención* (V_R) de los analitos inyectados, debido a que explica de una forma más adecuada el comportamiento cromatográfico de los analitos, sin depender del valor de la *velocidad de flujo* de trabajo. De forma general, los datos obtenidos para todas las muestras presentaron una variabilidad semejante. Como ejemplo, en la Tabla V.1 se muestra el estudio de precisión realizado para los alcoholes láurico y esteárico polietoxilados con cadena nominal de 10 y 20 etoxilos, respectivamente, en todas las fases móviles metanol-agua utilizadas en este trabajo. Las réplicas para cada condición de fase móvil fueron realizadas en diferentes días. Se calcularon el intervalo de confianza (**IC**) y el coeficiente de variación (**CV%**), parámetros que permiten evaluar el grado de dispersión en las mediciones.

Tabla V.1. Estudio de precisión de los volúmenes de retención para los compuestos C₁₂n₁₀ y C₁₈n₂₀ en fases móviles MeOH-H₂O de diferente composición. Flujo 1 mL/min, temperatura 30°C.

C ₁₂ n ₁₀		Volumen de retención V _R (mL)			
Fase móvil	n	\bar{x}	s	IC	CV (%)
MeOH (100 %)	3	3.03	0.042	±0.10	1.39
MeOH-H ₂ O (95-5 %)	3	3.62	0.055	±0.14	1.52
MeOH-H ₂ O (90-10 %)	3	5.00	0.099	±0.25	1.98
MeOH-H ₂ O (85-15 %)	3	7.82	0.099	±0.25	1.27
C ₁₈ n ₁₀		Volumen de retención V _R (mL)			
Fase móvil	n	\bar{x}	s	IC	CV (%)
MeOH (100 %)	3	5.86	0.109	±0.27	1.86
MeOH-H ₂ O (95-5 %)	3	8.83	0.025	±0.06	0.28
MeOH-H ₂ O (90-10 %)	3	18.4	0.096	±0.24	0.52
MeOH-H ₂ O (85-15 %)	3	43.7	1.88	±4.67	4.30

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede notarse, las desviaciones estándar y los coeficientes de variación del volumen de retención son relativamente pequeños para el alcohol láurico etoxilado en todas las condiciones probadas y para el alcohol esteárico etoxilado en las primeras tres fases móviles. Sin embargo, la fase móvil que contiene la mayor proporción de agua muestra un marcado aumento en estos parámetros. Así, el coeficiente de variación pasa de valores <2% en las fases móviles más ricas en metanol a un valor de 4.3% en la fase móvil, más rica en agua. Este incremento en la *desviación estándar* y en el *coeficiente de variación* en la fase móvil con 15% de H₂O solo se registró para los estándares de alcohol esteárico con números de etoxilación nominal (EO) 10 y 20, todos los demás alcoholes polietoxilados presentaron un comportamiento *normal*, esto es, semejante al del alcohol láurico. Lo anterior puede observarse más claramente en la Fig. V.1, donde se grafica V_R (puntos experimentales) en función del %H₂O en la fase móvil para los dos analitos y se incluyen los intervalos de confianza calculados al 95% de seguridad. Es obvio que, para volúmenes de retención muy altos, la precisión en la determinación de este parámetro disminuye, lo cual está sin duda asociado al fuerte ensanchamiento del pico cromatográfico y la consiguiente dificultad para detectar su centro de masa. No obstante, una precisión <5% para el más alto volumen de retención puede considerarse aceptable, tomando en cuenta que los tensoactivos en estudio no son en realidad compuestos puros sino una distribución de homólogos con cadenas etoxiladas de diferente tamaño; por ello, sus picos en general son anchos comparados con los de otros solutos y este ensanchamiento se magnifica al aumentar la retención.

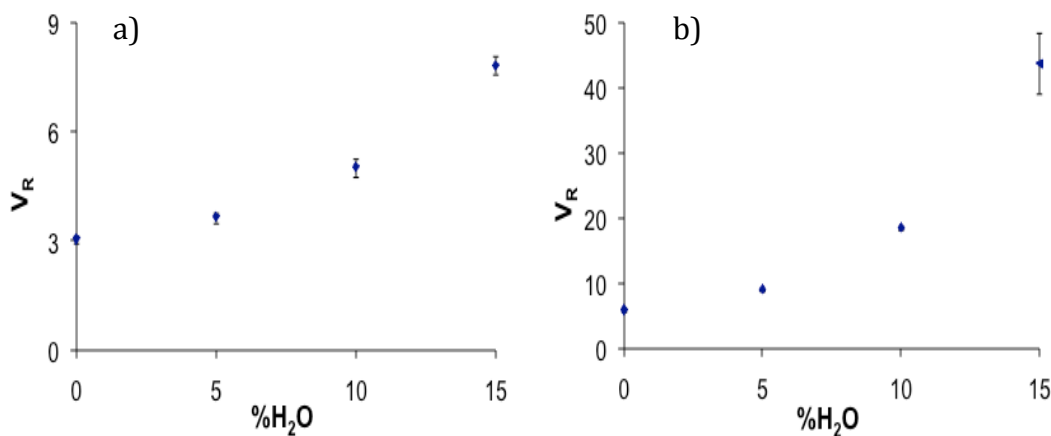


Figura V.1. Curvas de V_R vs %H₂O con sus respectivos intervalos de confianza al 95%.
Analitos: a) C₁₂n₁₀ y b) C₁₈n₁₀.

Algo que se debe tomar en cuenta cuando se habla del comportamiento cromatográfico de estos compuestos es su solubilidad en la fase móvil. Debido a la larga cadena hidrocarbonada, su solubilidad en las fases móviles más ricas en agua es limitada (especialmente para los compuestos de la serie C₁₈), lo que además de provocar una fuerte retención, causa ensanchamiento de picos y algunos problemas de elución incompleta. Durante el presente estudio se observó que, después de una

serie de corridas cromatográficas, era necesario lavar exhaustivamente la columna para poder obtener resultados reproducibles y para evitar un progresivo aumento en la caída de presión de la columna.

V.2. Comportamiento Cromatográfico en Fases Móviles MeOH-H₂O

IV.2.1 Optimización de condiciones experimentales

Se efectuaron pruebas previas al estudio de comportamiento cromatográfico para poder encontrar las mejores condiciones de elución y detección de los compuestos de interés. Primero, se varió la velocidad de flujo de la fase móvil en el intervalo de 0.5 a 1 mL/min. No se observó un cambio significativo en la forma y simetría de los picos cromatográficos, por lo que se optó por elegir la velocidad de flujo más alta con el objeto de disminuir los tiempos de análisis. En efecto, los volúmenes de retención de los tensoactivos en algunas fases móviles ensayadas fueron muy altos, de modo que el estudio de los 16 analitos, y sus réplicas, resultaría prohibitivo si se trabajara a bajas velocidades de flujo.

Posteriormente, se hicieron ensayos variando la temperatura del calefactor de columna de 20 a 45°C e inyectando el polímero C₁₈n₂₀ en una fase móvil de MeOH puro a flujo de 1 mL/min. En la Figura IV.2 se ilustran los resultados obtenidos. Como generalmente sucede en los sistemas de cromatografía en fase reversa, al aumentar la temperatura aumenta la solubilidad del soluto en la fase móvil y disminuye su retención; paralelamente, los picos se vuelven más altos y estrechos debido a la disminución de la viscosidad de la fase móvil que se traduce en una menor resistencia a la transferencia de masa.

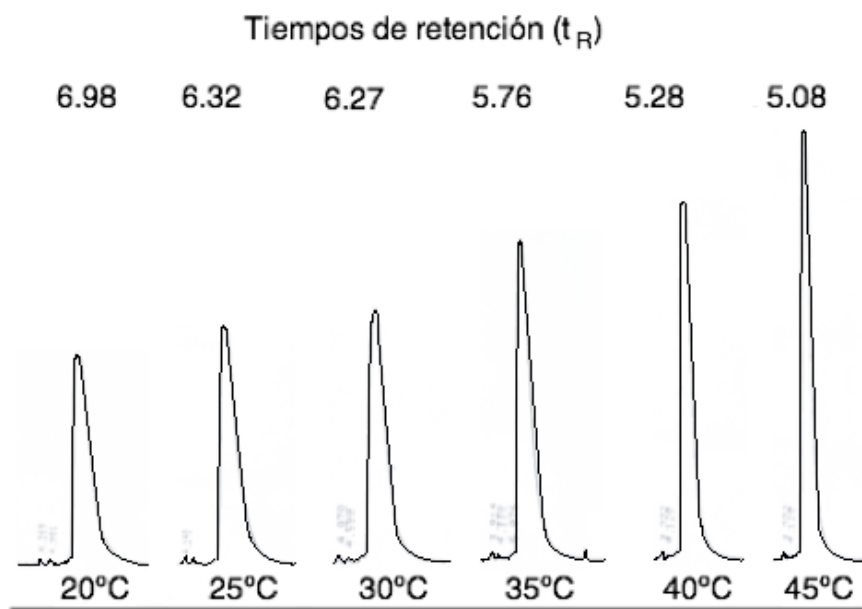


Figura V.2. Influencia de la temperatura en el tiempo de retención del soluto C₁₈n₂₀. Fase móvil: MeOH a flujo de 1 mL/min.

A pesar de que a temperaturas más altas podrían disminuirse los tiempos de análisis, también se afectan los factores de selectividad y por ende la capacidad de separación de analitos en el sistema cromatográfico; además se acorta el tiempo de vida útil de la columna. Por otra parte, a temperaturas bajas ($< 25^{\circ}\text{C}$), se corre el riesgo de no poder regular este parámetro en las estaciones cálidas del año o incluso en temporadas templadas, debido al calentamiento del aparato después de varias horas de trabajo. Con base en estas consideraciones, se decidió que el mejor compromiso entre todos los factores mencionados era una temperatura intermedia, por lo que se eligió trabajar a 30°C .

La optimización del detector ELSD implica determinar las condiciones de velocidad de flujo del gas acarreador, así como las temperaturas de nebulización y de evaporación, que conduzcan a una máxima respuesta de los analitos en las fases móviles de interés (en este caso mezclas MeOH-agua).

La velocidad de flujo del gas acarreador (N_2) es el primer parámetro a ajustar, por lo que se hicieron ensayos variándolo desde 0.5 hasta 2 mL/min. Este parámetro es muy importante ya que determina las características del aerosol líquido formado en el nebulizador (tamaño y forma de gotas), el tiempo de residencia del fluido en la cámara de evaporación y las características del aerosol de partículas sólidas que llega a la zona de detección (disgregación y tamaño de las partículas, turbulencia del fluido). Se observó que a flujos menores a 1 mL/min aumentaba mucho el ruido de fondo, mientras que a altos flujos decrecía notablemente la señal del analito. Por ello, este parámetro se fijó en 1 mL/min para esta parte del estudio.

La temperatura de evaporación (T_{ev}) se evaluó entre 60 y 110°C . La recomendada en el manual del detector para MeOH es de 70°C mientras que para H_2O es de 110°C . Experimentalmente se observó que a temperaturas menores de 90°C se producía un fuerte incremento en la señal del ruido, probablemente debido a una evaporación incompleta de la fracción acuosa de la fase móvil. Por otro lado, a altas temperaturas decrecía el tamaño del pico del analito, razón por la cual se seleccionó $T_{ev} = 90^{\circ}\text{C}$. En cuanto a la temperatura de nebulización (T_{neb}), que es el último parámetro a ajustar, se hicieron variaciones en el intervalo de 40 a 90°C . No se observaron cambios sustanciales en la detección, aunque a temperaturas altas se notó una ligera mejoría en la señal, por lo que se seleccionó $T_{neb} = 80^{\circ}\text{C}$.

Cabe mencionar que, a pesar de todos los ajustes realizados, la sensibilidad del detector ELSD para los alcoholes padres (no etoxilados) fue muy pobre, siendo menos sensible cuanto más corta era la cadena hidrocarbonada. El alcohol láurico no pudo detectarse en ninguna condición de fase móvil aunque su concentración en la disolución inyectada se aumentó hasta 1540 ppm; el alcohol mirístico (1450 ppm) dio una señal pequeña pero perceptible en las fases móviles ricas en disolvente orgánico pero no se detectó en las fases con mayor contenido de agua. Esto se atribuye a los bajos puntos de fusión de estos alcoholes ($\sim 25^{\circ}\text{C}$ y $\sim 38^{\circ}\text{C}$, respectivamente), que probablemente son incompatibles con el principio y temperaturas de operación del detector. Los alcoholes cetílico y esteárico sí lograron detectarse en todas las

condiciones ensayadas. Por otra parte, todos los derivados etoxilados de los alcoholes fueron detectables, incluso el derivado del alcohol láurico con una cadena de tan sólo 4 etoxilos.

IV.2.2 Estudio de retención y separación

El comportamiento de las cuatro series de alquil alcoholes etoxilados en la columna de fase reversa con fases móviles MeOH-H₂O siguió pautas muy semejantes (Fig. V.3 a-d). Los picos en los cromatogramas fueron más o menos simétricos y gaussianos, aunque relativamente anchos en comparación con los que se obtienen al inyectar solutos más simples y pequeños. La retención de los analitos en estas fases móviles correspondió a un comportamiento típico de fase reversa, esto es, mostró un aumento al incrementar la longitud de la cadena hidrocarbonada del alcohol o al aumentar la concentración de agua en el eluyente. Sin embargo, el efecto de la longitud de la cadena etoxilada sobre la retención fue mínimo, como puede constatarse al comparar entre sí los volúmenes de retención de los compuestos de una misma serie en una fase móvil dada.

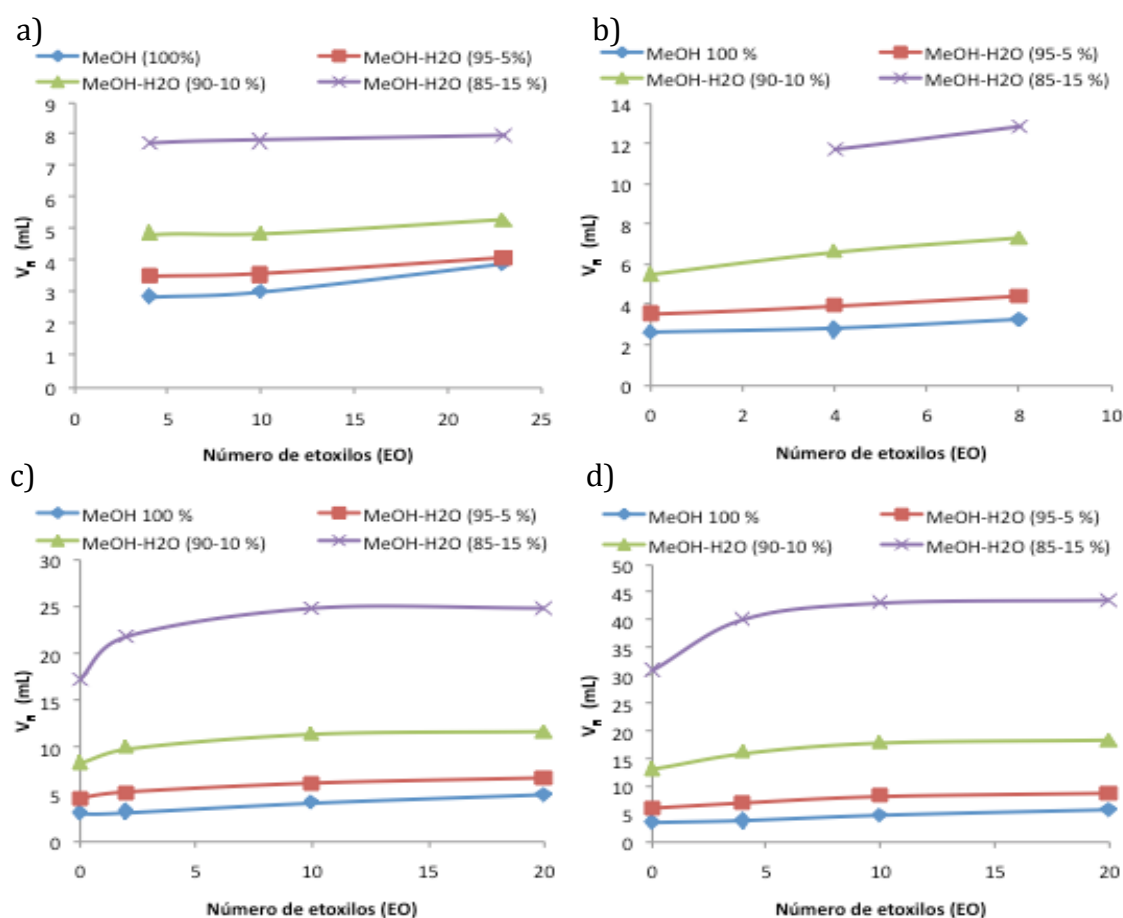


Fig. V.3. Dependencia del volumen de retención (V_R) con el número de etoxilos presentes para las series a) C₁₂nX, b) C₁₄nX, c) C₁₆nX y d) C₁₈nX.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La comparación de los cuatro gráficos de la Fig. V.3, muestra la gran influencia que ejerce el tamaño de la cadena alquílica, no sólo sobre la retención en sí, sino también sobre la magnitud del efecto que tiene la composición de la fase móvil en la retención. Así, al aumentar el contenido de agua en la fase móvil, se observa que el incremento en el volumen de retención es mucho más importante para los compuestos de la serie C18 que para los compuestos de la serie C12. Esta correlación entre longitud de cadena hidrocarbonada y composición de la fase móvil puede apreciarse más claramente en el gráfico de la Figura V.4, donde se representa el incremento del volumen de retención debido al cambio de fase móvil (de 0 a 15% de agua) en función del tamaño de la cadena alquílica de los alcoholes etoxilados. El ΔV_R se calculó a partir de los volúmenes de retención promedio en las dos composiciones de fase móvil, tomando en cuenta a todos los compuestos de la serie en cuestión, excepto al alcohol padre.

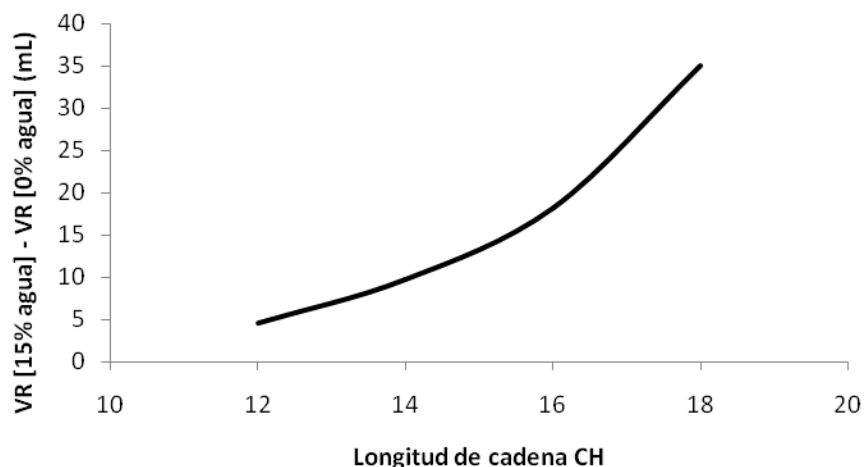


Fig. V.4. Incremento de V_R por aumento en el contenido de agua de la fase móvil (0-15%, v/v) en función de la longitud de cadena alquílica.

Un análisis más detallado de los gráficos de la Fig. V.3 muestra que el aumento de retención con el contenido de agua de la fase móvil sigue una tendencia exponencial. Este comportamiento no es específico de los alcoholes polietoxilados pues se ha observado para muchos otros compuestos en diferentes tipos de fases reversas [10], tanto con fases móviles MeOH-agua como AcCN-agua o THF-agua. El gráfico de la Fig. V.5 ilustra de manera más clara el efecto mencionado para el caso de los alcoholes etoxilados de la serie C18, incluyendo al alcohol padre. En esta figura también se incluyó al compuesto C_{18n100} cuyo comportamiento difiere totalmente del de los otros miembros de la serie, ya que su retención es pequeña en metanol puro y disminuye aún más al aumentar el contenido de agua de la fase móvil. Esto se atribuye, por una parte, al gran tamaño de la molécula, que probablemente es excluida de la mayor parte de los poros de la fase estacionaria. Adicionalmente, la larga cadena etoxilada de este polímero le confiere un carácter polar que contrarresta y supera a la

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

hidrofobicidad de la cadena alquílica C18, al grado de hacerlo muy soluble en agua, medianamente soluble en metanol y muy poco soluble en acetonitrilo.

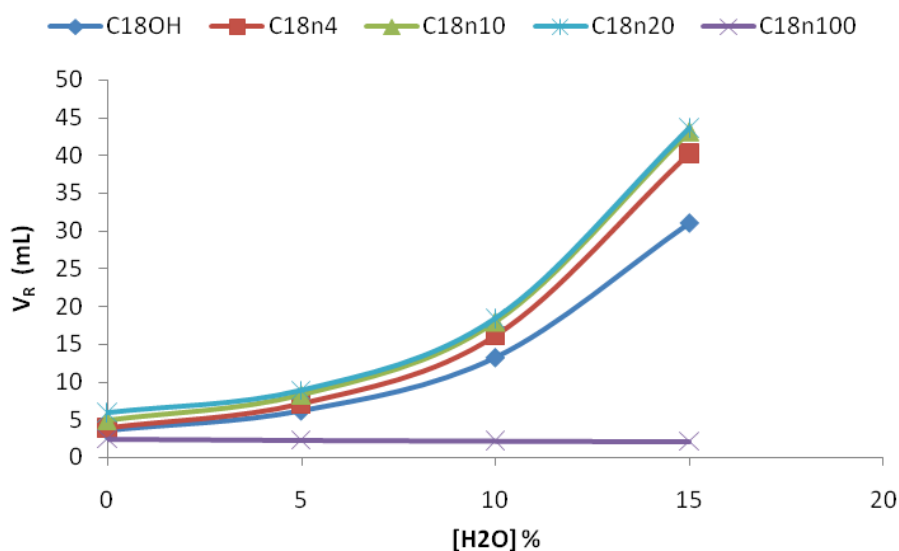


Fig. V.5. Volumen de retención (V_R) en función de la cantidad de agua en la fase móvil para la serie C18.

Por el contrario, para los compuestos con 20 o menos unidades EO, el volumen de retención fue prácticamente independiente de la longitud de la cadena etoxilada, aunque sí se percibió en algunos casos una ligera disminución de retención para los homólogos menos etoxilados y en mayor medida para el alcohol padre (Fig. V.5). Los volúmenes de retención de los homólogos con cadenas de 10 y 20 etoxilos pueden considerarse idénticos en todas las composiciones de fase móvil (MeOH-agua) ensayadas, ya que las diferencias entre ambos solutos fueron del mismo orden que la incertidumbre de las mediciones (Tabla V.2).

Tabla V.2. Diferencias en los volúmenes de retención promedio de los homólogos con cadenas de 10 y 20 etoxilos de las series C16 y C18.

Analito	V_R (mL)*	
	C ₁₆ n _X	C ₁₈ n _X
C _{YN} 10	24.85	43.14
C _{YN} 20	24.86	43.68
Diferencia	0.01	0.54

*Fase móvil MeOH-agua 85:15 (v/v)

De acuerdo con los resultados presentados, se puede establecer que el comportamiento de los alquil alcoholes etoxilados en cromatografía de fase reversa con fases móviles MeOH-H₂O está determinado por la longitud de su cadena hidrocarbonada, que contribuye positivamente a la retención, y la presencia del grupo

terminal polar (alcohol) que disminuye los efectos hidrofóbicos y por lo tanto tiene una contribución negativa en la retención. El efecto de la cadena etoxilada es mínimo pero, sorprendentemente, su pequeña contribución a la retención es positiva, como lo muestran los menores volúmenes de retención de los alcoholes padres con respecto a sus correspondientes derivados etoxilados. Esta contribución es tanto más notable cuanto mayores son los volúmenes de retención, es decir, se percibe en mayor medida para los compuestos con cadena hidrocarbonada más larga en la fases móviles más ricas en agua. El efecto de la cadena etoxilada parece estar asociado casi únicamente con su presencia o ausencia sin importar su tamaño, como lo constata la gran semejanza en los volúmenes de retención de los homólogos etoxilados de una misma serie en todas las composiciones de fase móvil probadas. En resumen, el sistema cromatográfico estudiado en esta parte del trabajo presenta selectividad hacia los grupos metileno de la cadena alquílica pero no hacia los grupos etoxi.

Cabe mencionar que las conclusiones anteriores están restringidas a los alquil alcoholes etoxilados relativamente pequeños. Los compuestos de cadena etoxilada muy grande (p. ej. 100 unidades EO) sufren efectos de exclusión en la columna utilizada para el estudio, cuyo diámetro de poro promedio es de 120 Å. De hecho, esta columna está recomendada para solutos de masa molar menor a 2,000 Da.

Una posible explicación mecanística del comportamiento observado debe tomar en cuenta la estructura de la superficie de la fase estacionaria (fase reversa C18). De acuerdo con las teorías más aceptadas, la superficie de la fase C18 se recubre de una capa líquida de composición diferente a la del seno de la fase móvil. Esta capa, rica en disolvente orgánico (en este caso metanol), permite el desplegamiento de las cadenas C18, confiriéndoles cierto grado de movilidad. Así, lo que se llama "fase estacionaria" es en realidad un complejo microcosmos que no tiene las propiedades de un sólido, pero tampoco las de un líquido [34]. Cuando un alcohol alquílico es retenido, su cadena hidrocarbonada se sumerge en la fase estacionaria, acomodándose entre las cadenas C18 e interaccionando débilmente con ellas (interacciones de dispersión), mientras que el grupo -OH se orienta hacia la interfase interaccionando con moléculas de metanol, principalmente por formación de puentes hidrógeno. A su vez, las moléculas de metanol interaccionan entre ellas y con moléculas de agua cercanas a la interfase, formando una extensa red unida por puentes H. Se puede pensar que esta estructura "jala" al soluto hacia la interfase, impidiendo la total inmersión de su cadena alquílica en la porción más hidrofóbica de la capa estacionaria. En el caso de un alquil alcohol etoxilado, la cadena etoxilada puede ser vista como un "brazo espaciador" que separa la función -OH de la cadena alquílica. Cuando este soluto es retenido, el grupo -CH₂-CH₂-O- juega hasta cierto punto un papel ambivalente. Por una parte, la función éter interacciona con las moléculas de metanol o agua presentes en la capa estacionaria o en la interfase, pero siendo sólo un aceptor de protones tiene menos tendencia (que el grupo -OH) a incorporarse en una red de puentes hidrógeno; por otra parte, el grupo etilo experimenta cierta atracción hacia las cadenas C18 de la fase estacionaria. Estas dos fuerzas, más o menos balanceadas, hacen del grupo etoxi una entidad inerte respecto a la retención, pero probablemente útil como "brazo espaciador", ya que permitiría un

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mejor acomodo y una mayor inmersión de la cadena alquílica del soluto en las cadenas C18 de la fase reversa. Este esquema explicaría el ligero aumento de retención de los alcoholes etoxilados con respecto a su respectivo alcohol padre no etoxilado. Según los resultados obtenidos, basta con una cadena de entre 2 y 4 etoxilos para que el efecto de brazo espaciador se manifieste plenamente. En la Figura V.6 se ilustra el mecanismo planteado.

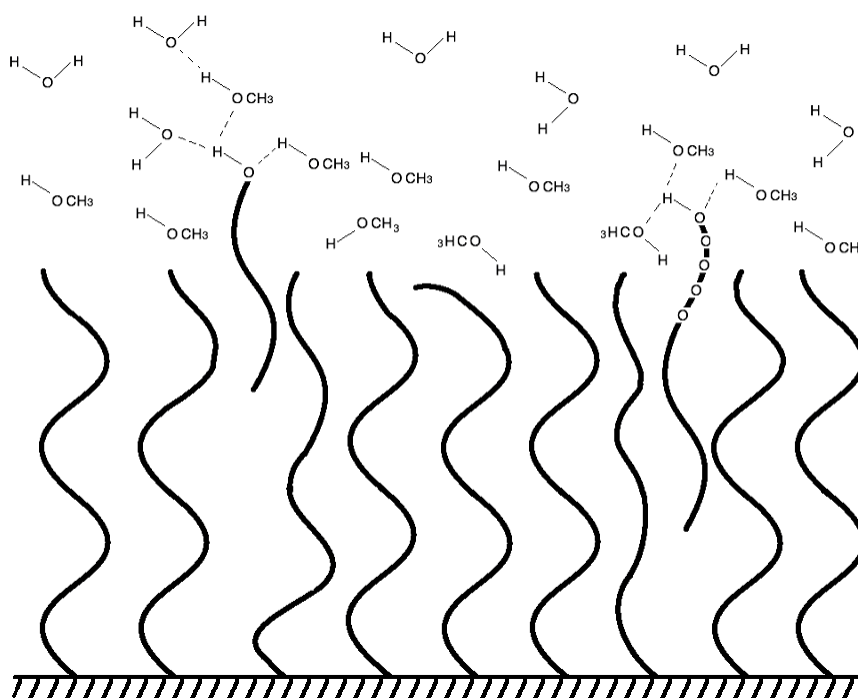


Fig. V.6. Ilustración de la propuesta mecanística. Efecto de "brazo espaciador" de la cadena etoxilada favoreciendo la retención del tensoactivo con respecto al alcohol padre.

De acuerdo con la discusión anterior, la casi nula selectividad del sistema cromatográfico hacia los grupos etoxi es el resultado de un balance de fuerzas opuestas, tanto en el seno de la fase móvil como en el interior de la capa estacionaria. En ambos casos, las interacciones moderadas de la función éter con moléculas de agua o metanol serían contrarrestadas por el carácter apolar del grupo etilo. En un estudio previo sobre el comportamiento cromatográfico de alquil alcoholes etoxilados [29], se estimó que el coeficiente de selectividad (α) por grupo etoxi, en una fase reversa C18 con fase móvil MeOH-H₂O 90:10 (v/v), era de tan sólo 1.004, mientras que el coeficiente de selectividad por grupo metileno de la cadena alquílica era de 1.27; estas estimaciones concuerdan con lo observado y discutido en el presente trabajo.

Es importante hacer notar que la transparencia de las cadenas etoxi respecto a la retención es cierta en el intervalo de composiciones de fase móvil estudiado en este trabajo, es decir mezclas MeOH-H₂O desde 85:15 hasta 100:0 (v/v). Debido a la fuerte

hidrofobicidad de las cadenas hidrocarbonadas de los alquil alcoholes etoxilados, no se trabajó con fases móviles más ricas en agua pues los volúmenes de retención serían muy grandes, los tiempos de análisis exageradamente largos y la detección de los picos casi imposible por su fuerte ensanchamiento. En la literatura se ha reportado que el comportamiento ambivalente de la cadena etoxi también se manifiesta en otras fases móviles (p. ej. mezclas acetona-agua) dentro de cierto intervalo de composición [35]. Estas condiciones donde la cadena etoxi es invisible se conocen como “condiciones críticas”. Fuera de la zona crítica sí es posible separar compuestos que sólo difieren en el número de unidades EO en sus cadenas polares. Por ejemplo, se ha reportado la separación de los oligómeros del producto PEG 600 en columnas de fase reversa C-18 con una fase móvil MeOH-H₂O 34.6:65.4 (v/v) [35]. Evidentemente, sólo compuestos suficientemente polares, como los polietilén-glicoles, pueden trabajarse en fases móviles ricas en agua.

La cromatografía de líquidos en condiciones críticas (LCCC, del inglés: liquid chromatography under critical conditions) también presenta ventajas, pues la transparencia de la cadena etoxi puede ser aprovechada para separar polímeros etoxilados con base en algún otro grupo funcional. En el caso de los alquil alcoholes etoxilados, las condiciones críticas (fases móviles MeOH-H₂O ricas en disolvente orgánico) pueden ser aprovechadas para la separación por cadena alquílica y cuantificación de mezclas de estos tensoactivos en productos comerciales. Como ejemplo, en la Fig. V.7 se presenta la separación de una mezcla de los alcoholes C₁₂n₁₀, C₁₄n₈, C₁₆n₁₀ y C₁₈n₁₀ con fases móviles de diferente composición. Como puede observarse, los analitos alcanzan a separarse desde la fase móvil con MeOH 100% y su resolución es ya total en la mezcla MeOH-H₂O 95:5 (v/v).

Es importante subrayar que los cromatogramas serían prácticamente idénticos cualquiera que fuera la longitud de las cadenas etoxi de los analitos, siempre y cuando no se produzcan fenómenos de exclusión. De hecho, cada uno de los compuestos ensayados está conformado por varios oligómeros que sólo difieren en el número de unidades EO en sus cadenas. En la Tabla V.3 se muestra el valor de la resolución entre analitos contiguos, calculado para las cuatro separaciones mostradas en la Fig. V.7.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

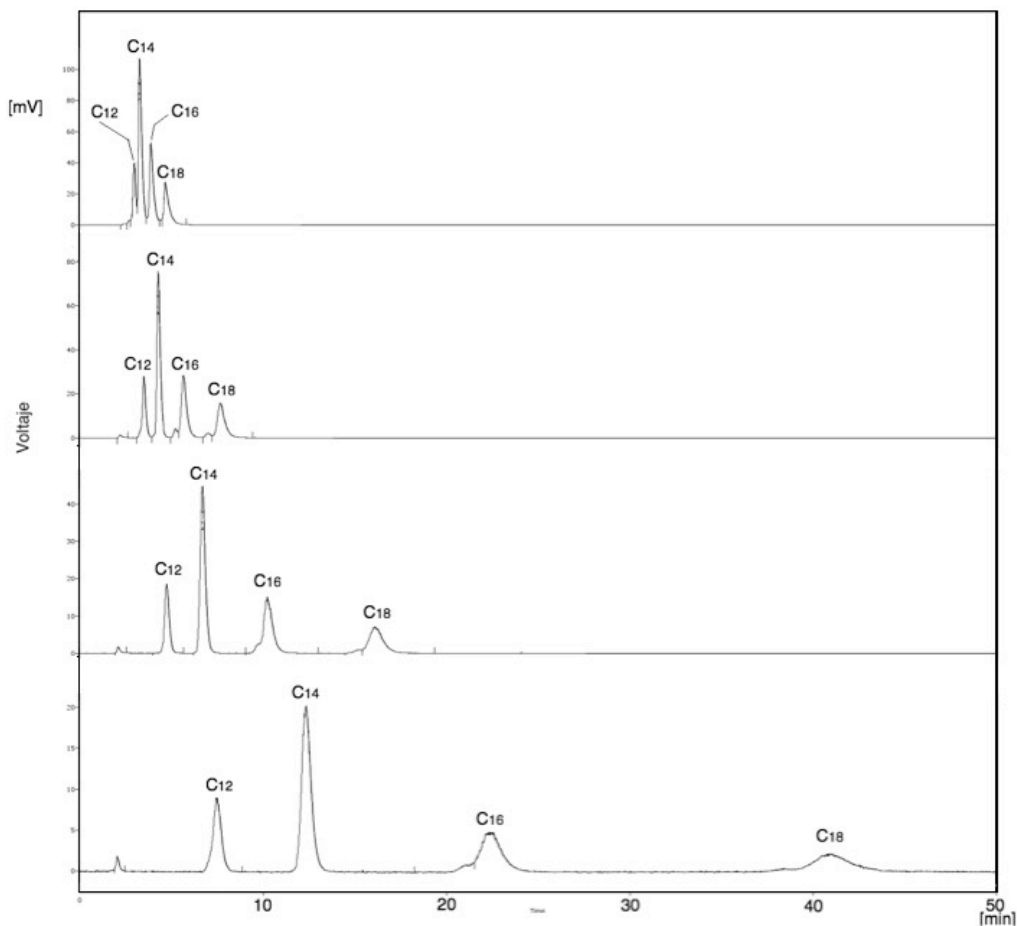


Figura V.7. Separación de una mezcla de alcoholes polietoxilados ($C_{12}n_{10} + C_{14}n_8 + C_{16}n_{10} + C_{18}n_{10}$) con: A) MeOH (100%), B) MeOH-H₂O (95-5%), C) MeOH-H₂O (90-10%) y D) MeOH-H₂O (85-15%). Columna (150× 4.6 mm d.i.) de fase reversa Hypersil ODS, 5 μ m, a temperatura de 30°C. Flujo 1 mL/min.

Tabla V.3. Resolución en la separación de la mezcla de alcoholes polietoxilados con diferentes fases móviles (Figura IV.7).

Analito	Conc. (ppm)	Resolución			
		MeOH (100%)	MeOH-H ₂ O (95-5%)	MeOH-H ₂ O (90-10%)	MeOH-H ₂ O (85-15%)
$C_{12}n_{10}$	340	0.865	2.341	4.078	5.783
$C_{14}n_8$	330	1.837	3.359	5.174	6.583
$C_{16}n_{10}$	330	1.962	3.360	5.382	6.581
$C_{18}n_{10}$	330				

V.2.3. Estudio Multivariable

En los sistemas de cromatografía en fase reversa, la retención y separación de los compuestos de interés de una muestra se ajusta típicamente por cambios en la composición de la fase móvil. Sin embargo, existen otros parámetros como la temperatura de la columna que, dependiendo de la naturaleza de los analitos, podrían afectar notablemente su retención y separación, incidiendo en la precisión y exactitud de las determinaciones cuantitativas. Por ejemplo, una curva de calibración para un analito podría tener una pendiente diferente si se traza al inicio del día o a mediodía, obligando a una recalibración frecuente con la consiguiente pérdida de tiempo. En cambio, para otro analito de la misma muestra, este fenómeno podría no presentarse o ser insignificante. Es sabido que, en general, los compuestos de molécula pequeña y polaridad media o alta son poco afectados por la temperatura, mientras que las moléculas grandes y/o complejas pueden sufrir alteraciones notables en su retención y en la forma y simetría de sus picos al variar la temperatura de unos cuantos grados. Otro parámetro de interés es la velocidad de flujo de la fase móvil que obviamente afecta a los tiempos de retención pero, en principio, no debería afectar a los volúmenes de retención. No obstante, se han observado cambios en los volúmenes de retención de ciertos analitos al variar la velocidad de flujo y, nuevamente, son las moléculas grandes y complejas las que pueden sufrir este tipo de efecto.

Dado que los alquil alcoholes etoxilados son compuestos de molécula más o menos grande y de comportamiento muy particular por su carácter dual hidrofóbico/hidrofílico, se consideró importante estudiar el efecto relativo de los parámetros temperatura y flujo sobre la retención, comparándolo con el efecto de la composición de la fase móvil. Los intervalos de variación seleccionados para estos parámetros estuvieron basados en consideraciones prácticas como: temperatura ambiente, estabilidad de la columna, tiempos de análisis, ensanchamiento y detectabilidad del pico cromatográfico.

El estudio estadístico se llevó a cabo tomando como ejemplo a un compuesto de la serie C_{16nX} , debido a que los volúmenes de retención de los miembros de esta serie fueron intermedios entre los de la serie menos hidrofóbica (C_{12nX}) y la serie más hidrofóbica (C_{18nX}). Específicamente se eligió al compuesto C_{16n10} . Los niveles alto y bajo de los parámetros para el estudio multivariable de su efecto en el volumen de retención del alcohol fueron reportados en la parte experimental (Tabla III.2). En la Tabla V.4 se presenta el resultado de la estimación de efectos, calculado a partir de los datos cromatográficos obtenidos en los 8 experimentos del diseño factorial y su respectiva réplica.

Tabla V.4. Estimación de efectos sobre el volumen de retención de C₁₆N₁₀.

<i>Factor</i>	<i>Estimación de efecto</i>	<i>Error estándar*</i>
Promedio	13.448	0.011
A: Temperatura	-4.363	0.023
B: Flujo	0.832	0.023
C: %H₂O	18.738	0.023
AB	0.126	0.023
AC	-3.450	0.023
BC	0.664	0.023
ABC	0.055	0.023
Bloque	0.042	0.023

*El error estándar está basado en el error total con 7 grados de libertad.

Se puede observar que se registraron diferencias importantes en el efecto estimado para los diferentes factores (los parámetros, sus interacciones y el factor bloque relacionado con las medidas replicadas). Por medio de un ANOVA (Tabla V.5) se analizaron las variaciones de V_R entre experimentos (incluyendo réplicas) con la finalidad de separar la contribución efectiva de cada factor a dicha variación. Posteriormente se determinó la significancia de los 8 factores con el objeto de eliminar a aquellos cuyo efecto pudiera ser atribuido al azar. Para considerar que un efecto era significativamente diferente de cero, se estableció como criterio un valor de probabilidad menor a 1% ($P < 0.01$).

Tabla V.5. Análisis de varianzas para el volumen de retención de C₁₆N₁₀.

<i>Parámetro</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>G.L</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Fc</i>	<i>P</i>
A: Temperatura	76.1597	1	76.1597	37425.06	2.6×10^{-14}
B: Flujo	2.76856	1	2.76856	1360.48	2.8×10^{-9}
C: %H ₂ O	1404.44	1	1404.44	690145.21	9.7×10^{-19}
AB	0.063731	1	0.063731	31.32	0.0008
AC	47.6059	1	47.6059	23393.65	1.3×10^{-13}
BC	1.76292	1	1.76292	866.30	1.3×10^{-8}
ABC	0.0122988	1	0.0122988	6.04	0.0436
Bloques	0.00719952	1	0.00719952	3.54	0.1020
Error total	0.0142449	7	0.00203499		
Total (corr.)	1532.83	15			

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con los valores de probabilidad reportados en la Tabla V.5, los efectos de interacción triple (Temperatura-Flujo-%H₂O) y bloques no son significativos, según el criterio establecido, y pueden ser ignorados. El coeficiente de determinación del modelo resultante fue muy bueno ($R^2 = 99.997\%$), demostrando su adecuado grado de ajuste a los valores experimentales y confirmando la poca influencia de los factores eliminados.

El siguiente paso en la explicación del comportamiento de V_R del polímero C₁₆n₁₀ en fases móviles MeOH-H₂O fue la formulación del modelo polinomial. En la tabla V.6 se reporta el valor de los coeficientes del modelo obtenidos aplicando las ecuaciones adecuadas (Apéndice II).

Tabla V.6. Coeficientes de regresión para el modelo polinomial

<i>Factor</i>	<i>Coeficiente</i>
Constante	13.45
A: Temperatura	-2.18
B: Flujo	0.42
C: %H ₂ O	9.37
AB	0.06
AC	-1.72
BC	0.33

El modelo de regresión que se presenta a continuación (ecuación V.1) se encuentra en su forma codificada, es decir, requiere de la normalización de los valores de los parámetros (en el intervalo +1 a -1) para poder ser aplicado. El interés de esta forma de presentación es que permite comparar la importancia de la contribución de cada término al volumen de retención.

Modelo para la predicción del volumen de retención: (V.1)

$$V_R = 13.45 - 2.18 * \text{Temperatura} + 0.42 * \text{Flujo} + 9.37 * \%H_2O + 0.06 * \text{Temperatura} * \text{Flujo} - 1.72 * \text{Temperatura} * \%H_2O + 0.33 * \text{Flujo} * \%H_2O$$

La ecuación V.1 se evaluó contrastando el valor de V_R calculado con el valor obtenido experimentalmente para las ocho condiciones que delimitan los intervalos de variación de los tres parámetros estudiados. Como se muestra en la Tabla V.7, los volúmenes de retención calculados son bastante cercanos a los observados y, en todos los casos, el V_R experimental se encuentra dentro del intervalo de confianza calculado por el programa.

Tabla V.7. Comparación de los V_R experimentales y calculados (ecuación IV.1). Se incluye el intervalo de confianza para los valores calculados.

<i>Fila</i>	<i>Valor Observado (mL)</i>	<i>Valor Calculado (mL)</i>	<i>IC 95.0% bajo para la media (mL)</i>	<i>IC 95.0% alto para la media (mL)</i>
1	25.98	26.04	25.96	26.12
2	4.59	4.56	4.48	4.64
3	4.49	4.51	4.39	4.55
4	3.49	3.47	3.40	3.56
5	3.74	3.77	3.64	3.80
6	18.07	18.10	17.97	18.13
7	19.69	19.72	19.65	19.81
8	27.35	27.41	27.28	27.44

En la Fig. V.8 se presenta de manera más ilustrativa el ajuste del modelo, mediante un gráfico que relaciona los valores experimentales con los valores predichos. La línea de normalidad tiene una pendiente de 0.9999 y abarca a los ocho puntos considerados.

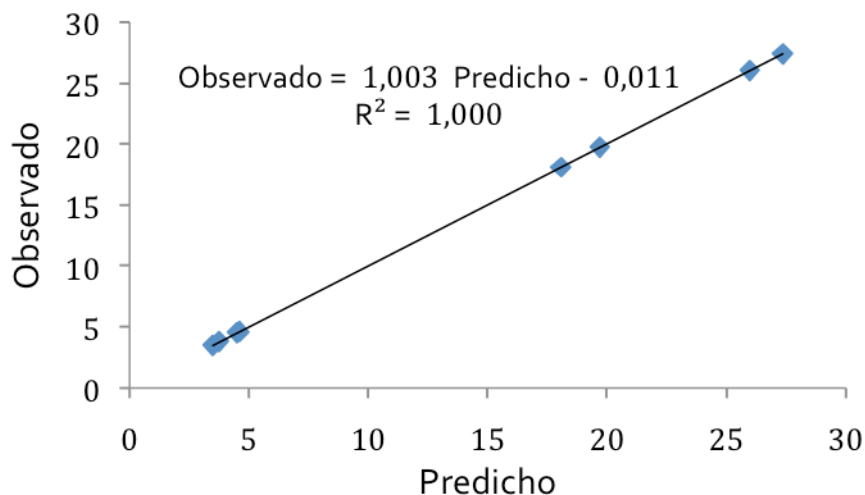


Figura.V.8. Gráfico de valores observados contra valores predichos calculados por la Ec. V.1.

Otra manera de visualizar el efecto relativo de cada uno de los factores considerados en el modelo es mediante un gráfico de Pareto (Fig. V.9). En él se observa claramente la fuerte predominancia del efecto debido al contenido de agua de la fase móvil (C), pero también la temperatura (A) y la interacción Temperatura-%H₂O (AC), son bastante importantes y contribuyen de manera muy significativa al volumen de retención del alcohol etoxilado. En la gráfica también se puede observar la línea de efecto estandarizado (muy cercana al nivel base de las barras), cuya posición está relacionada con la incertidumbre de las mediciones y el criterio de significancia

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

establecido. La porción de las barras que sobrepasa esta línea representa la contribución efectiva del factor al efecto principal (el volumen de retención). Aunque todos los factores presentan una contribución estadísticamente significativa, es evidente que el efecto de la interacción Temperatura-Flujo (AB) es muy inferior a todos los demás, por lo que podría omitirse.

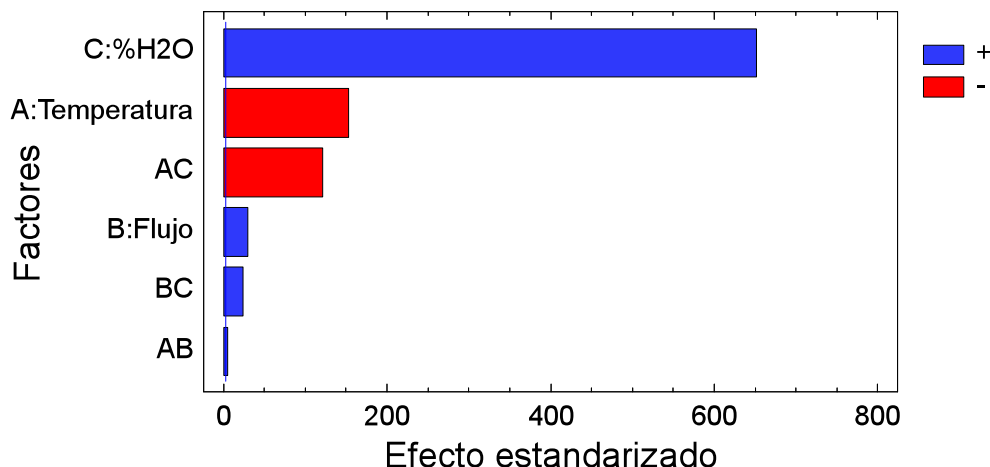


Fig.V.9. Diagrama de Pareto para la comparación de efectos de los parámetros analizados.

En el *gráfico de Pareto* se muestra también el sentido, positivo o negativo, de la contribución de cada factor a la retención. Un aumento en el %H₂O o en el flujo provoca un aumento en el volumen de retención del soluto (efecto positivo), mientras que un aumento en la temperatura disminuye el V_R (efecto negativo). Así mismo, la interacción Flujo-%H₂O tiene una contribución positiva, mientras que la interacción Temperatura-%H₂O contribuye negativamente

Existen varias formas alternativas para representar el efecto de los diferentes factores sobre V_R , ejemplo de ello son los gráficos de *Efectos principales* y de *Interacciones*. El gráfico de *Efectos principales* toma en consideración la magnitud de los efectos en el plano medio V_R obtenido del modelo polinomial (Fig. V.10). En la discusión de este gráfico se tomará como referencia al contenido de agua de la fase móvil, que es el factor que mayor efecto produce sobre la retención del alcohol polietoxilado de prueba (C₁₆n₁₀); un cambio del nivel bajo al alto de este parámetro (0-15%) produce un cambio con pendiente positiva muy pronunciada en el V_R . Comparado con ese factor, un cambio del nivel bajo al alto en la **temperatura** (25-40°C) produce un cambio en V_R con pendiente negativa, pero el valor absoluto de esta pendiente es aproximadamente la cuarta parte con respecto a la pendiente del parámetro de referencia. No obstante, es evidente que para obtener resultados reproducibles en el análisis de tensoactivos del tipo alquil alcohol etoxilado (AAP), es imprescindible controlar la temperatura de la columna. Finalmente, un cambio del nivel bajo al alto del factor **flujo** (0.3 a 1 mL/min) se traduce en un pequeño incremento en V_R pues la pendiente es apenas ligeramente positiva. Con base en esta observación y dado que la reproducibilidad de flujo de las bombas cromatográficas actuales es del orden del 1%, es posible afirmar que la variabilidad experimental

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

asociada a la bomba no tendrá prácticamente ninguna incidencia sobre la repetibilidad de los cromatogramas en el análisis cuantitativo de AAPs.

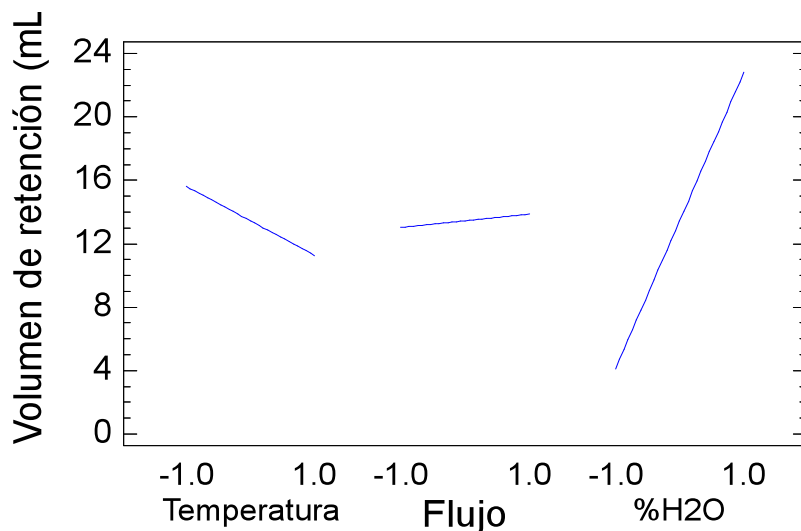


Fig.V.10. Gráfico de *Efectos principales* sobre el volumen de retención

El efecto negativo de la temperatura indica que la retención de los AAP en las condiciones utilizadas (fase reversa C18 con fases móviles MeOH-H₂O ricas en disolvente orgánico) es energéticamente favorable ($\Delta H < 0$) y está controlada por la entalpía. Estas conclusiones se derivan de las relaciones siguientes (ecuaciones V.2-V.4):

$$V_R = V_m + K W_{st} \quad (V.2)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ = -RT \ln K \quad (V.3)$$

$$\ln K = -\left(\frac{\Delta H^\circ}{RT}\right) + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (\text{ecuación de Van't Hoff}) \quad (V.4)$$

Donde: V_m es el volumen muerto de la columna, W_{st} es la masa de fase estacionaria en la columna, K es la constante de distribución del soluto entre la fase estacionaria y la fase móvil, T es la temperatura absoluta y ΔG° , ΔH° y ΔS° son, respectivamente, los cambios de energía libre, entalpía y entropía en el estado estándar, asociados al proceso de retención del soluto. Es evidente que la disminución del volumen de retención al aumentar la temperatura proviene de una menor constante de distribución a temperaturas más altas. A su vez, la disminución de K al aumentar T forzosamente implica que el cambio de entalpía durante el proceso de retención es negativo, como lo muestra la ecuación de Van't Hoff (suponiendo que ΔH° y ΔS° son independientes de la temperatura en el intervalo de 25-40 °C). Desde el punto de vista mecanístico, esto significa que el alcohol polietoxilado está en un estado de menor energía en la fase estacionaria que en la fase móvil, lo cual es debido a la mejor

solvatación de su cadena alquílica en la capa estacionaria más rica en metanol que en la fase móvil que contiene agua; además, en la fase estacionaria la cadena alquílica interacciona con las cadenas C18 unidas al soporte. Como ya se ha mencionado, en condiciones críticas (como las aquí usadas), la cadena alquílica del tensoactivo domina la retención y la cadena etoxilada es inerte. Por otra parte, se ha sugerido que la transferencia de un polímero de cadena alquílica larga a la fase estacionaria está asociada con un cambio de entropía negativo [39]; esto puede deberse a que el soluto pasa del seno de la fase móvil, donde está sujeto a fuertes interacciones hidrofóbicas, a un estado menos tensionado en la capa estacionaria. Cabe recordar que la disolución de un compuesto de gran área hidrocarbonada en agua es un proceso altamente entrópico debido al rechazo neto entre el disolvente y el soluto; este rechazo origina la creación de una cavidad para alojar y aislar al soluto, alrededor de la cual los enlaces de puentes hidrógeno entre moléculas de agua se encuentran distorsionados y perturbados.

El efecto de la temperatura en la retención del alcohol cetílico decaetoxilado es similar al de muchos otros compuestos en fases reversas, incluyendo diversos compuestos poliméricos. Sin embargo, era necesario verificarlo ya que los polímeros de óxido de etileno tienen comportamientos muy peculiares y no siempre se observa un efecto negativo de la temperatura. Por ejemplo, se ha demostrado que la retención de polietilenglicoles en fases móviles acetona-agua o acetonitrilo-agua ricas en agua, aumenta al aumentar la temperatura y que el proceso está controlado por la entropía [35,36]. Incluso, se ha reportado un comportamiento inusual de los oligómeros del C₁₂n₄ en fases móviles ACN-H₂O 70:30 (v/v), ya que al aumentar la temperatura, la retención de algunos oligómeros aumenta y la de otros disminuye [37].

El efecto de la velocidad de flujo está sin duda relacionado con los cambios de presión asociados a la variación de este parámetro. En los experimentos realizados a temperatura de 25°C con una fase móvil MeOH-H₂O 85:15 (v/v) se observó que, al aumentar el flujo de 0.3 a 1 mL/min, la caída de presión en el sistema se incrementó notablemente pasando de 4.1 a 12.4 MPa. Por una parte, un aumento de presión provoca un ligero aumento en el volumen de fase móvil que se requiere para desalojar un soluto no retenido de la columna (volumen muerto de la columna), debido a la compresibilidad de las mezclas MeOH-H₂O [38]. Por lo tanto, el volumen de retención del soluto también aumenta ligeramente, como lo indica la relación siguiente (Ec. V.5):

$$V_R = V_m (1 + k') \quad (V.5)$$

Donde, k' es el factor de capacidad (o de retención) del soluto en el sistema considerado.

Por otra parte, se ha reportado que el logaritmo del factor de capacidad varía linealmente con el aumento de presión en el rango de presiones en que comúnmente se trabaja en HPLC (< 200 atm). El coeficiente de esta dependencia es proporcional al cambio en el volumen molar parcial del soluto cuando se transfiere de la fase móvil a la fase estacionaria (Ec. V.6). Dado que dicho cambio es mayor para los solutos de

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

molécula más grande, el aumento de retención por un aumento en la velocidad de flujo será más pronunciado para este tipo de solutos [34,39]:

$$\left(\frac{\partial \ln k'}{\partial P}\right)_T = -\frac{\Delta \bar{V}}{RT} + \left(\frac{\partial \ln \phi}{\partial P}\right)_T \quad (V.6)$$

En la Ec. V.6, P es la caída de presión de la columna, $\Delta \bar{V}$ es la reducción del volumen molar parcial del soluto durante el proceso de retención, R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta y ϕ es la relación de fases.

La Fig. V.11 muestra el *Gráfico de Interacciones* que ilustra el efecto de las interacciones más significativas, **AC (Temperatura-%H₂O)** y **BC (Flujo-%H₂O)**, sobre **V_R**. Este gráfico corresponde a la proyección del perfil del plano **V_R**, obtenido del modelo matemático, sobre las caras opuestas del paralelepípedo que enmarca a dicho plano en un espacio tridimensional. El paralelepípedo se genera cuando se analizan simultáneamente los efectos de dos factores principales sobre el volumen de retención (ver Fig. V.12). En esta proyección, el segundo factor de la interacción considerada se mantiene en el nivel alto-alto (++), o bajo-bajo (--), mientras el primer factor se hace variar de su nivel bajo al alto. En todos los casos, el parámetro que no forma parte de la interacción estudiada se mantiene en su nivel 0. Así, el análisis de la interacción **AC** se efectúa considerando un flujo de 0.65 mL/min (punto medio del intervalo 0.3-1 mL/min), mientras que el análisis de la interacción **BC** se realiza considerando una temperatura de 32.5 °C (punto medio del intervalo 25-40 °C).

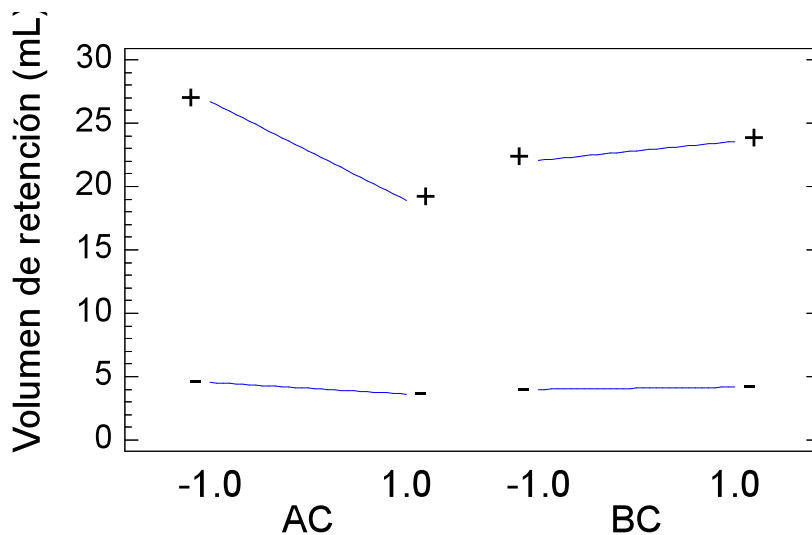


Fig. V.11. Gráfico de *Interacciones*

Las proyecciones del plano **V_R** mostradas en la Fig. V.11, se pueden observar también a partir de los gráficos de *Superficie de respuesta estimada* (Figs. V.12 y V.14), con la ayuda de los gráficos de *Superficie de respuesta estimada de contornos* (Figs. V.13 y V.15).

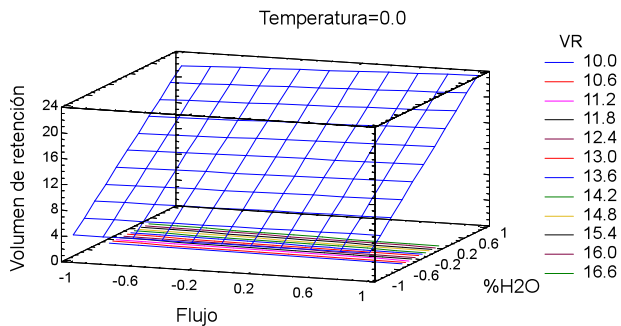


Fig. V.12. Superficie de respuesta estimada para V_R (temperatura en nivel 0). Efecto BC.

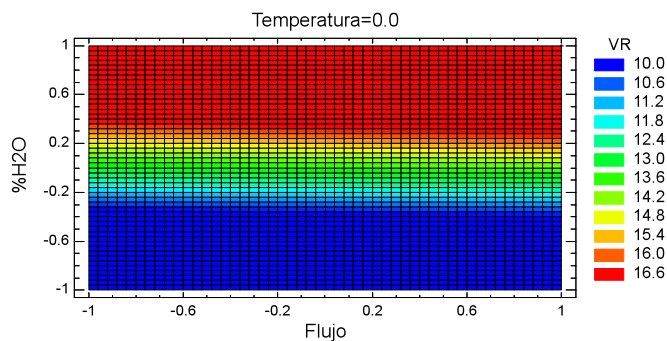


Fig. V.13. Superficie de respuesta estimada de contornos para V_R (temperatura en nivel 0). Efecto BC.

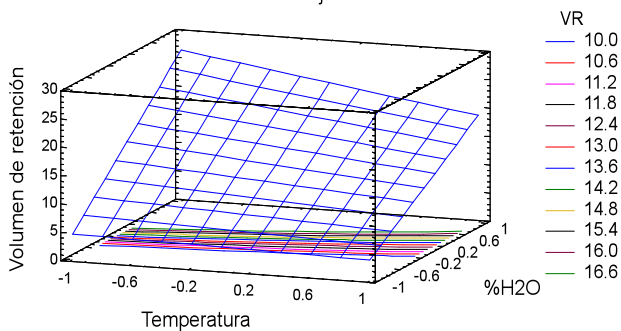


Fig. V.14. Superficie de respuesta estimada para V_R (flujo en nivel 0). Efecto AC.

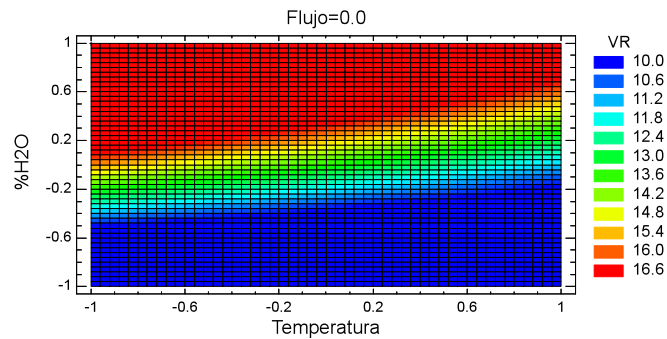


Fig. V.15. Superficie de respuesta estimada de contornos para V_R (flujo en nivel 0). Efecto AC.

Como muestran las figuras IV.11-IV.13, la interacción **BC (Velocidad de flujo-%H₂O)** tiene un efecto pequeño pero claramente observable sobre V_R . Al variar la velocidad de flujo del nivel bajo al alto, la pendiente de la recta proyectada en el plano no es la misma si la cantidad de agua en fase móvil se mantiene en el nivel alto-alto (++) o en el bajo-bajo (--). De hecho, cuando la fase móvil es metanol puro (nivel bajo-bajo del %H₂O), un aumento en la velocidad de flujo de 0.3 a 1 mL/min prácticamente no provoca cambios en el volumen de retención (< 0.2 mL). En cambio, en una fase móvil con 15% de agua (nivel alto-alto del %H₂O), el mismo aumento en la velocidad de flujo provoca un cambio de aproximadamente 1.5 mL en V_R . Este comportamiento se observa de manera muy clara en el gráfico de superficies (Fig. V.12), donde el plano V_R es cuasi-rectangular pero presenta una ligera desviación con pendiente positiva en su borde superior.

Como ya se explicó anteriormente, el efecto del flujo sobre el volumen de retención es debido a los cambios de presión. Cuando la fase móvil es metanol puro, la presión es más baja y los cambios de presión al aumentar el flujo son más pequeños, comparado con lo que sucede cuando la fase móvil es una mezcla metanol-agua. Por tal motivo, el efecto de compresibilidad de la fase móvil debido a cambios de presión debió ser tanto más insignificante cuanto menor fue su contenido de agua. Por otra parte, el cambio en el volumen molar del analito cuando se transfiere de la fase móvil a la fase estacionaria depende de la composición de ambas fases. En el caso presente, la fase estacionaria estuvo conformada por las cadenas C18 embebidas o sumergidas en una capa rica en metanol; por lo tanto, a medida que el contenido de agua de la fase móvil fue más pequeño, más parecidas debieron ser las dos fases y menor sería el cambio en el volumen molar del analito durante el proceso de retención. En resumen, en el nivel bajo-bajo del %H₂O (es decir, en metanol puro), no eran de esperarse cambios significativos ni en el volumen muerto de la columna (V_m), ni en el factor de capacidad (k') del analito, al variar la velocidad de flujo. Por el contrario, en el nivel alto-alto del %H₂O, los cambios de presión al aumentar el flujo fueron más importantes y esto debió reflejarse en un efecto más pronunciado sobre V_m y k' . Todo esto concuerda perfectamente con el comportamiento de la interacción **BC** predicho por el modelo.

La interacción **AC (Temperatura-%H₂O)** es mucho más importante que la interacción **BC**, como lo muestra la Fig. IV.11. Al variar la temperatura de su nivel bajo (25°C) al alto (40°C), la disminución de V_R es considerablemente mayor cuando la proporción de agua en fase móvil se mantiene en el nivel alto-alto (V_R disminuye de ~8 mL) que cuando está en el nivel bajo-bajo (V_R disminuye de ~1 mL). Cabe mencionar que el efecto relativo ($\% \Delta V_R / V_R$) también es mayor en la fase móvil que contiene 15% de H₂O (nivel alto-alto) que en metanol puro (nivel bajo-bajo), ya que el cambio observado corresponde a -29% en el primer caso y -20% en el segundo. Esto se refleja en una deformación del plano V_R que tiende a tomar una forma trapezoidal, con el lado más ancho a temperaturas bajas y el lado más estrecho a temperaturas altas (Fig. V.14). En consecuencia, también puede establecerse que un cambio en la composición de la fase móvil a temperaturas bajas tendrá más efecto sobre el volumen de retención del analito que el mismo cambio realizado a temperaturas altas.

De las observaciones relativas a la interacción **AC** se confirma que la retención de los alquil alcoholes polietoxilados en columnas de fase reversa es energéticamente favorable y está controlada por la entalpía en todo el intervalo de composiciones de fase móvil estudiado, desde metanol puro hasta MeOH-H₂O 85:15 (v/v). Aunque este intervalo puede parecer pequeño, es importante hacer notar que cubre un amplio intervalo de volúmenes de retención del analito de prueba (C₁₆n₁₀), aproximadamente desde 3.5 hasta 27.5 mL. El hecho de que el efecto de la temperatura sea mayor cuando la fase móvil contiene más agua significa que el cambio de entalpía (negativo) por retención es mayor en las fases más ricas en agua. Esto se deduce fácilmente a partir de la ecuación de Van't Hoff (Ec. V.4), puesto que una mayor pendiente en la relación de $\ln K$ Vs $1/T$ significa un valor mayor del término ($-\Delta H^\circ$). Por lo tanto, la interacción **AC** simplemente corrobora que la retención de estos tensoactivos es más favorable en fases móviles que contienen más agua (en el intervalo de 0-15% de agua). Esto es lógico puesto que la diferencia de solubilidad del analito entre la fase estacionaria y la fase móvil aumenta a medida que esta última tiene una mayor proporción de agua.

En conclusión, el estudio multivariable realizado en el intervalo de MeOH 100% hasta MeOH-H₂O 85:15 (v/v), permitió corroborar que el mecanismo de retención de los alquil alcoholes polietoxilados con cadena alifática larga, en estas fases móviles, es un mecanismo típico de fase reversa, donde la cadena hidrocarbonada del soluto lleva la batuta en la retención y la cadena etoxilada es transparente. Esta conclusión es válida en todo el dominio de condiciones experimentales "prácticas", es decir, flujos y temperaturas que no afectan la estabilidad de la columna y tiempos de análisis razonables. Es de destacar que el efecto de la temperatura, aunque no es excesivo, sí es lo suficientemente importante y por ende se requiere controlarla para poder tener separaciones reproducibles. Este efecto es tanto más importante cuanto mayor es el contenido de agua en la fase móvil. Por ello, el control de este parámetro es todavía más necesario cuando las separaciones se realizan por gradiente de elución, pues el cambio de unos cuantos grados en la temperatura ambiente provocará cambios notables en la apariencia de los cromatogramas. Por el contrario, el efecto del flujo en los volúmenes de retención es bastante pequeño y, de hecho, su contribución es ligeramente positiva (mayor retención a mayor flujo). En consecuencia, las fluctuaciones en el flujo proporcionado por la bomba (normalmente <1%) no afectarán el proceso de retención y separación, aunque, evidentemente, sí provocarán pequeños cambios en los tiempos de retención. Con base en lo anterior, sería recomendable trabajar a flujos relativamente altos para disminuir los tiempos de análisis, teniendo únicamente como limitante el mantener una presión razonable para no afectar a la columna.

V.3 Fases móviles ACN-H₂O

V.3.1 Optimización de las condiciones de detección

La optimización del detector ELSD se llevó a cabo utilizando como soluto de prueba al alcohol etoxilado C₁₂n₁₀ y como fase móvil una mezcla AcCN-H₂O 90:10 (v/v) a flujo de 1 mL/min; la temperatura de la columna se mantuvo a 30°C con ayuda del calefactor de columnas. Los parámetros del detector se variaron en los intervalos siguientes: temperatura de evaporación (T_{ev}) 70-120 °C, temperatura de nebulización (T_{neb}) 40-60 °C y flujo de gas acarreador (N₂) 0.5-1 mL/min.

La velocidad de flujo del gas acarreador se evaluó con $T_{neb} = 40^\circ\text{C}$ y $T_{ev} = 90^\circ\text{C}$. Se observó un comportamiento típico, esto es, la intensidad de la señal aumentó al disminuir el flujo, pues este parámetro tiene una influencia inversa en la eficiencia de la nebulización y evaporación. Sin embargo, cuando se trabaja a flujos muy bajos se promueve la formación de gotas de gran tamaño en el nebulizador, lo que hace que cueste más trabajo evaporar completamente al disolvente para permitir la formación de los agregados sólidos del analito que posteriormente serán analizados con base en la cantidad de luz dispersada. Así, aunque un flujo bajo provoca un incremento en la señal detectada, también causa un incremento considerable del ruido. De los resultados obtenidos en el intervalo de flujos analizados, se encontró que el mejor compromiso era trabajar a flujo de 0.6 mL/min. En esta condición, la señal se incrementó en un factor de 6 con respecto a la obtenida a flujo de 1 mL/min y el ruido se mantuvo en niveles aceptables.

La temperatura de evaporación fue el siguiente parámetro a ajustar. En el intervalo de temperaturas probadas (70-120 °C), empleando un flujo de 0.6 mL/min, se observó una pequeña tendencia a disminuir la intensidad de la señal al incrementar la temperatura. Esto se atribuye a que, a mayor temperatura en la cámara de evaporación, se forman agregados de menor tamaño, lo que se traduce en una menor dispersión de la luz cuando éstos llegan a la zona de detección. Por otra parte, si se usa una temperatura muy baja, el ruido aumenta debido a la evaporación incompleta del disolvente en esta cámara. Por las razones anteriores, se eligió una $T_{ev} = 90^\circ\text{C}$ para los estudios posteriores.

Para el caso de la T_{neb} , no se observó una influencia notable en la intensidad de la señal o en el ruido, aunque se percibió una ligera mejora al trabajar alrededor de 40°C, por ello se tomó este valor como el más adecuado.

En la Fig. V.16 se muestran los cromatogramas obtenidos al mantener fijos el flujo de gas en 0.6 mL/min y la T_{neb} en 40°C, variando la T_{ev} entre 90 y 100°C.

Es sabido que el detector ELSD responde a la *masa* y no a la *concentración*, por tal motivo, su respuesta no es idéntica para diferentes analitos. Además, la respuesta no es lineal sino que tiende a ser logarítmica; no obstante, en intervalos de concentración limitados, la respuesta para un mismo analito es más o menos lineal. Con el objeto de ver si éste era el caso a los niveles de concentración empleados en

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

este trabajo, se realizó una prueba utilizando las condiciones óptimas de detección antes establecidas ($T_{ev} = 90^{\circ}\text{C}$, $T_{neb} = 40^{\circ}\text{C}$ y flujo de 0.6 mL/min). Se inyectaron tres disoluciones del analito de prueba $\text{C}_{12}\text{n}_{10}$, doblando progresivamente su concentración (330, 660 y 1320 ppm) para registrar el incremento de la señal. En la Fig. V.17 puede observarse que al aumentar la concentración de 330 a 660 ppm aumenta la intensidad de la señal para el pico mayor del cromatograma de aproximadamente $600\ \mu\text{V}$ hasta $2\ \text{mV}$; cuando se duplica nuevamente la concentración, la señal para dicho pico sube hasta cerca de $4\ \text{mV}$. Puede notarse entonces que existe proporcionalidad entre la respuesta y la concentración del analito.

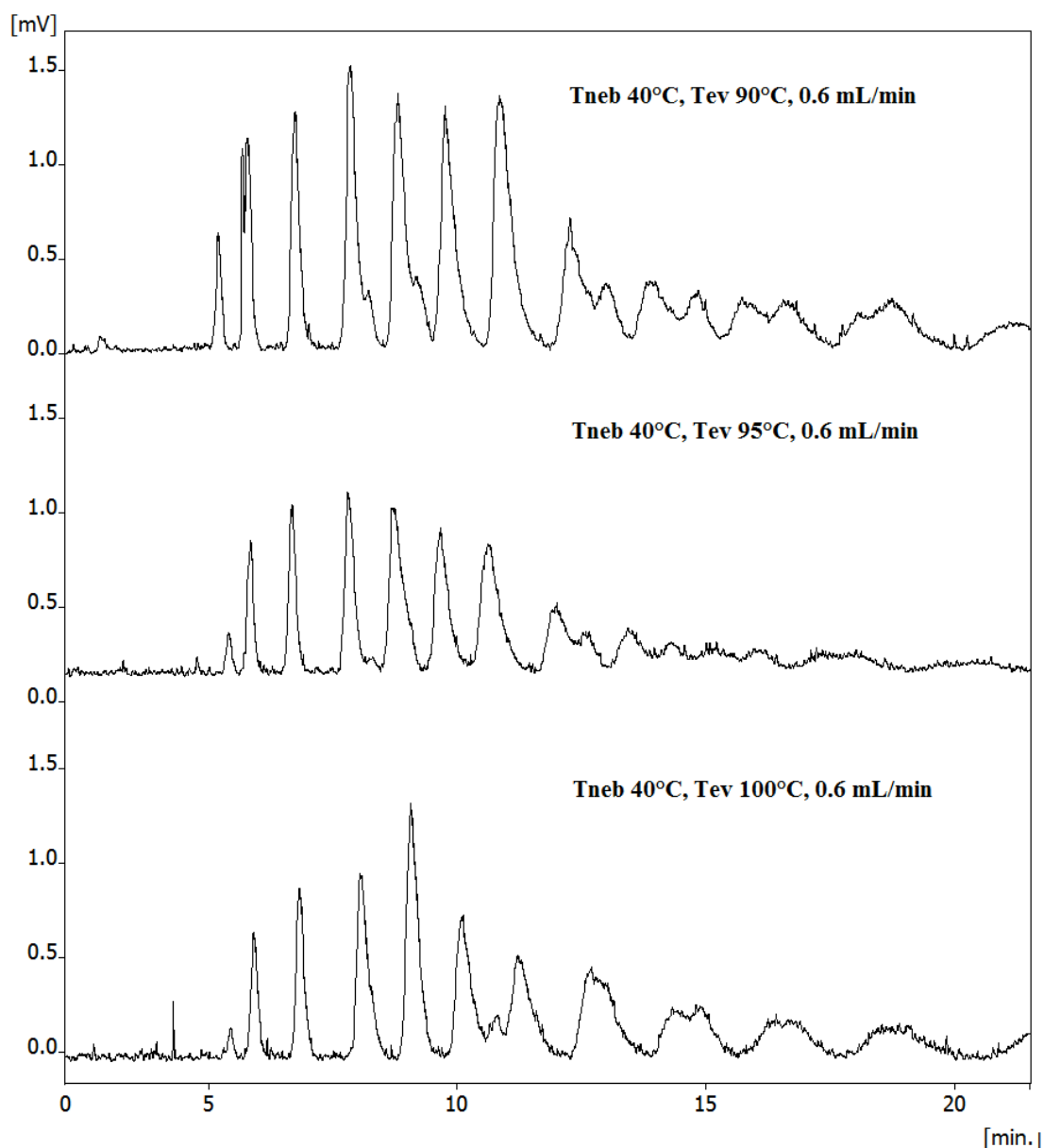


Figura V.16. Cromatogramas obtenidos al variar la temperatura de evaporación del detector ELSD. Analito $\text{C}_{12}\text{n}_{10}$. Fase móvil AcCN-agua 90:10 (v/v) a 0.6 mL/min .

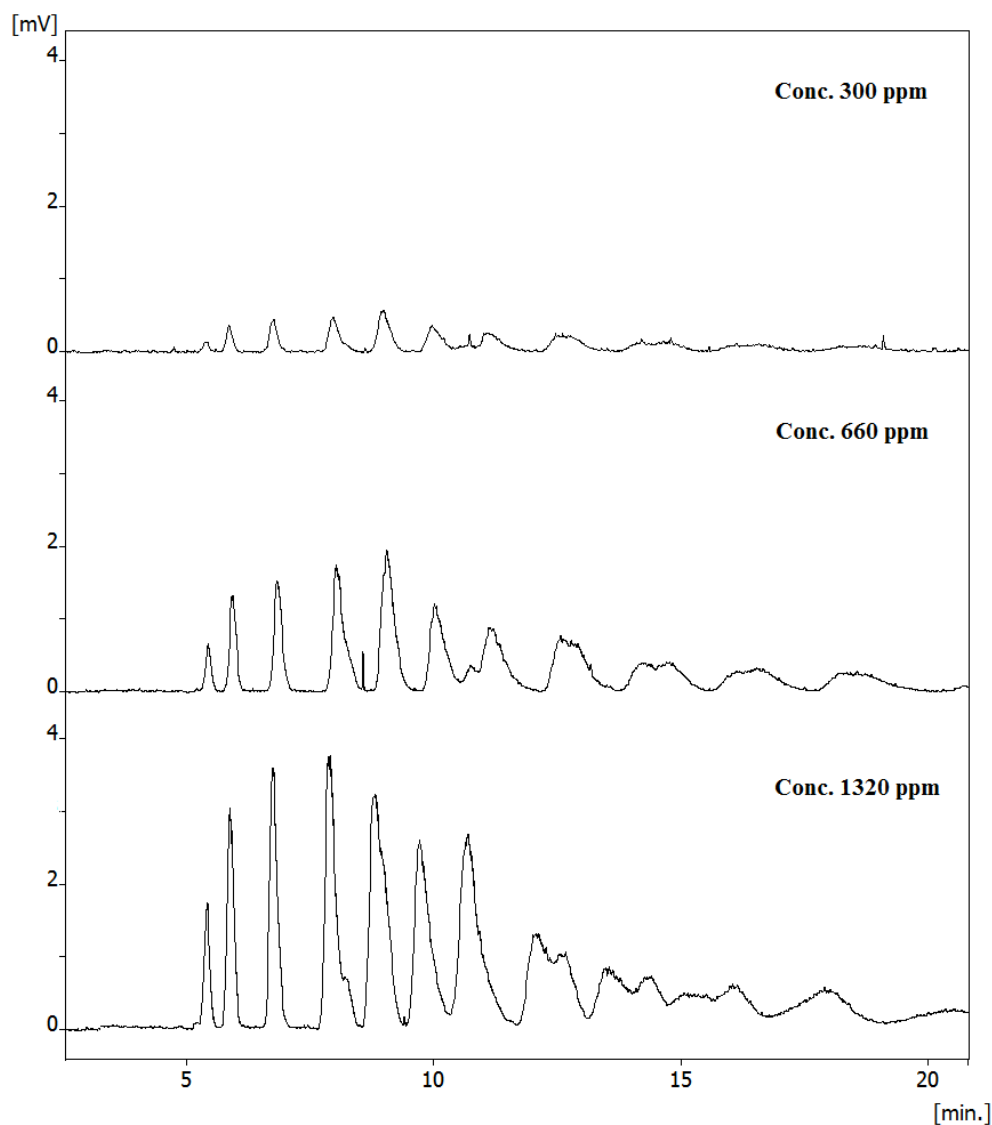


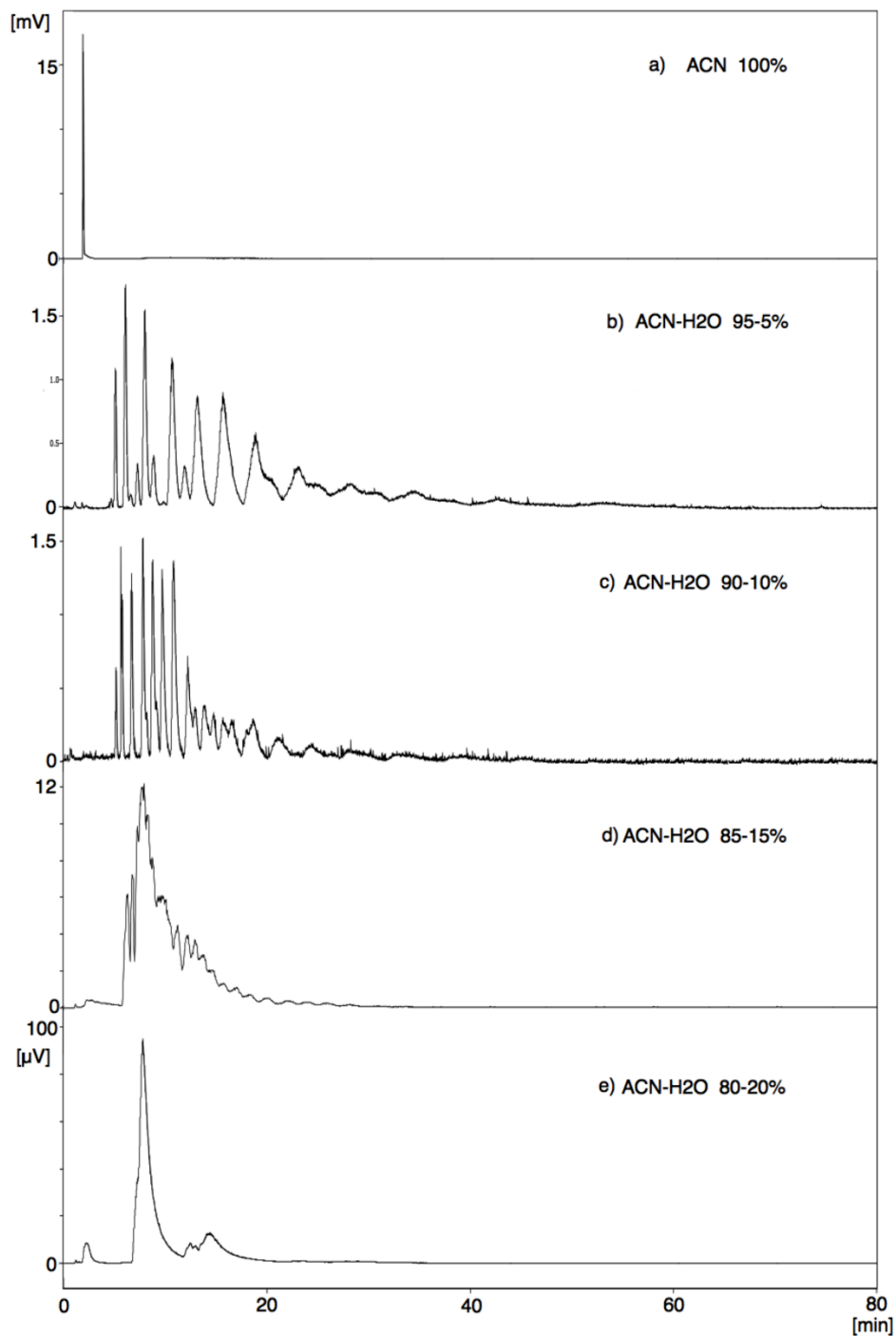
Figura V.17. Respuesta obtenida al doblar consecutivamente la concentración del $C_{12}n_{10}$. Parámetros del detector: $T_{neb} = 40^{\circ}C$, $T_{ev} = 90^{\circ}C$, flujo = 0.6 mL/min

V.3.2 Comportamiento cromatográfico

La principal característica que se observó al estudiar los tensoactivos en las fases móviles AcCN-H₂O fue el desdoblamiento de la señal de la mayoría de los analitos en una multiplicidad de picos. Este desdoblamiento se debe a que la mezcla de disolventes utilizada como fase móvil fue capaz de separar, al menos parcialmente, a los oligómeros constituyentes de los estándares comerciales.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una segunda característica del estudio fue el complejo comportamiento cromatográfico observado para todos los solutos al variar la composición de la fase móvil. Como ejemplo, en la Fig. V.18 se muestran los cromatogramas obtenidos al inyectar el compuesto $C_{12}n_{10}$ utilizando diferentes fases móviles, desde AcCN puro hasta AcCN-H₂O 50:50 (v/v).



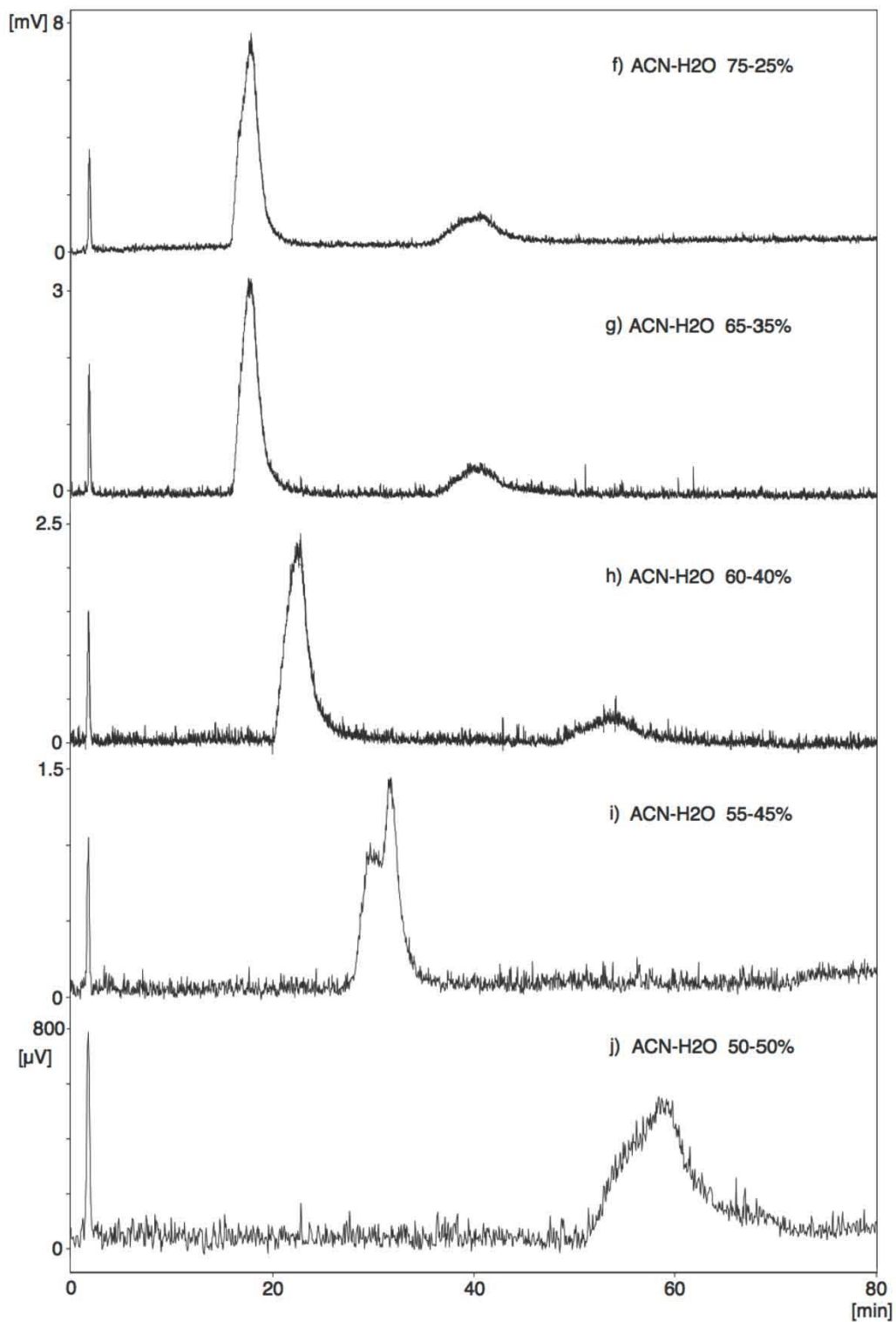


Figura V.18. Cromatogramas obtenidos para el alcohol C₁₂n₁₀ (680 ppm) en las fases móviles AcCN-H₂O con un contenido de agua de: a) 0%, b) 5%, c) 10%, d) 15%, e) 20%, f) 25%, g) 35%, h) 40%, i) 45% y j) 50%. Columna (150× 4.6 mm d.i.) de fase reversa Hypersil ODS, 5 μm, a temperatura de 30°C. Flujo 1 mL/min.

Los cromatogramas de la Fig. V.18 muestran que en AcCN puro el analito genera un solo pico con un volumen de retención pequeño (1.87 mL). Al añadir tan solo 5% de agua a la fase móvil, se produce un cambio dramático apareciendo una serie de picos con volúmenes de retención que abarcan desde aproximadamente 5 mL hasta cerca de 50 mL. Esta amplia distribución de picos corresponde a los oligómeros que constituyen al alcohol etoxilado $C_{12}n_{10}$, cuyos componentes mayoritarios eluyen a bajos volúmenes de retención, seguidos por un buen número de componentes minoritarios que eluyen en forma de picos pequeños y muy ensanchados por lo que son difíciles de detectar. Cuando se incrementa el contenido de agua en fase móvil hasta 10%, la retención en general disminuye pero de manera muy desigual ya que el V_R de los últimos picos disminuye notablemente mientras que el V_R de los primeros picos solo desciende ligeramente o no cambia. En consecuencia, el intervalo de elución se estrecha y se tiene una mejor definición de picos, particularmente de los primeros siete oligómeros que presentan picos bien separados y más simétricos. El proceso de compactación antes descrito continúa en las fases móviles con 15% y 20% de agua, provocando la pérdida de resolución y la coelución de la mayor parte de los oligómeros en un gran pico asimétrico y ancho con un V_R de 7.8 mL en la última de estas fases; además, se observan otras dos pequeñas señales posteriores, separadas del pico principal. A partir de este punto hay un nuevo cambio en el comportamiento cromatográfico pues la retención de los picos que agrupan a los oligómeros vuelve a aumentar. El pico principal se mantiene ancho y asimétrico, incrementando su V_R desde ~20 mL en la fase móvil con 25% de agua hasta ~60 mL en la fase con 50% de agua; sin embargo el aumento de retención no se traduce en una nueva separación de los oligómeros. Las dos pequeñas señales posteriores al pico principal coalescen en una sola, la cual se aleja cada vez más del pico mayoritario a medida que aumenta el contenido de agua en el eluyente. El comportamiento de este pico secundario parece indicar que se trata de especies diferentes a las que constituyen el pico principal. Probablemente, el producto comercial $C_{12}n_{10}$ contenía impurezas de otro alcohol etoxilado de cadena alifática más larga (p. ej. $C_{14}n_x$).

Para poder interpretar este comportamiento, se tomaron como base dos estudios previos de alquil alcoholes etoxilados reportados en la literatura. Cho *et al.* [37] estudiaron la retención y separación del producto $C_{12}n_4$ (Brij 30) en una columna de fase reversa (columna Luna C18, 250 x 4.6 m d.i.) con una fase móvil AcCN-H₂O 70:30 (v/v) a diferentes temperaturas, empleando como detector un espectrómetro de masas. A altas temperaturas (40°C) se observó la separación de tres bloques, uno principal que contenía a los oligómeros del polímero C_{12} (de 0 a 18 unidades EO) parcialmente separados y dos pequeños correspondientes a impurezas de los alcoholes etoxilados C_{10} (menos retenido) y C_{14} (más retenido). Al disminuir la temperatura, la separación de picos dentro de cada bloque se incrementó, obteniéndose una perfecta resolución de todos los oligómeros a 15°C. Un punto muy interesante fue que, a todas las temperaturas ensayadas, el orden de elución de los oligómeros fue en sentido inverso al largo de su cadena etoxilada (los oligómeros con mayor número de etoxilos eluyeron primero). Jandera *et al.* [29], estudiaron el comportamiento de diversas mezclas de alcoholes etoxilados en una columna de fase

reversa (columna Separon SGX C18 150 x 3 mm d.i.) con fases móviles AcCN-H₂O en diferentes proporciones, empleando también un espectrómetro de masas para la detección. Los ensayos realizados a temperatura de 40°C con el polímero C₁₂n_x mostraron que en AcCN puro los oligómeros (de C₁₂n₂ a C₁₂n₁₅) se distribuían en una muy amplia ventana de retención, con factores de capacidad desde ~1.5 hasta ~60, siguiendo un orden de elución directamente proporcional al tamaño de la cadena etoxilada (los oligómeros con mayor número de unidades EO eluyeron al final). Al aumentar el contenido de agua a 5%, la ventana de elución se compactó notablemente, quedando los factores de capacidad en un intervalo de aproximadamente 1.5-5 y manteniéndose el mismo orden de elución. Este proceso continuó en la fase móvil con 10% de agua, donde el intervalo de k' fue de aproximadamente 2-2.5. Un subsecuente aumento a 20% de agua produjo un nuevo cambio pues, aunque la ventana de elución permaneció muy estrecha, la retención aumentó ligeramente (intervalo aproximado de k' entre 2.5 y 3) y el orden de elución de los oligómeros se invirtió (los de cadena etoxilada más larga eluyeron primero). Finalmente, con 30% de agua, la retención siguió aumentando (k' entre 4.5-6.5, aproximadamente) y el orden de elución inverso se mantuvo. En los cromatogramas totales reportados para las fases móviles con 20% y 30% de agua se observa que los oligómeros coeluyen generando un solo pico. Gracias al espectrómetro de masas, los autores pudieron reconstruir cromatogramas parciales y deducir el factor de capacidad de cada oligómero dentro del pico que los agrupaba, para todas las condiciones de fase móvil estudiadas.

Los estudios antes descritos muestran que, en la condición que les es común (temperatura de 40°C y fase móvil con 30% de H₂O), los resultados no fueron iguales pues en uno de los casos se obtuvo una separación parcial de los oligómeros [37], mientras que en el otro se observó un solo pico [29]. Esto indica que la columna utilizada tiene gran influencia sobre la resolución de los oligómeros, tanto por sus dimensiones como por el tipo de fase reversa que contiene; en efecto, la columna utilizada por Cho *et al.* [37] era más larga y estaba empacada con una fase reversa de última generación (sílice ultrapura con enlazamiento denso de cadenas C18 y alto bloqueo de silanoles residuales). No obstante, ambos autores coinciden en que el orden de elución de los oligómeros en esta fase móvil es inversamente proporcional al largo de la cadena etoxilada. Los resultados de nuestro estudio, ilustrados en la Fig. V.18, difieren en varios puntos de los reportados por Jandera *et al.* [29], pero debe considerarse que la fase estacionaria (Hypersil ODS) y la temperatura de la columna (30°C) no fueron iguales. A pesar de ello, el comportamiento cromatográfico globalmente fue similar.

El inusual comportamiento de los alquil alcoholes etoxilados en mezclas AcCN-H₂O está relacionado con la contribución de efectos entálpicos y entrópicos contrarios por parte de la cadena hidrocarbonada y la cadena etoxilada [37]. Para la cadena hidrocarbonada, el paso de la fase móvil a la fase estacionaria es energéticamente favorable debido a su mayor solubilidad en la capa estacionaria orgánica que en la fase móvil que contiene agua. De hecho, dado que el acetonitrilo no forma redes de

puentes hidrógeno con el agua (como el metanol), es muy posible que en este sistema la fase estacionaria estuviera conformada por las cadenas C18 sumergidas y solvatadas por una capa casi exclusivamente de acetonitrilo puro. Por otra parte, como ya se mencionó anteriormente, la retención de la cadena hidrocarbonada va acompañada de una reducción de entropía, pues al ser expulsada de la fase móvil por efectos hidrofóbicos pasa a un estado menos tensionado en la fase estacionaria y, al mismo tiempo, se reajustan y recomponen los enlaces entre moléculas de agua en la fase móvil. Así, para la cadena hidrocarbonada se tiene $\Delta H^\circ < 0$ y $\Delta S^\circ < 0$. En cambio, la cadena etoxilada es más soluble en la fase móvil, donde el acetonitrilo solvata a los grupos $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ y el agua (donador de protones) interacciona con los grupos éter (aceptores de protones); por el contrario, en la capa estacionaria rica en acetonitrilo (aceptor de protones) no hay interacción con los grupos éter, lo que ocasiona que el proceso de retención sea energéticamente desfavorable. En muchos trabajos se ha publicado que la transferencia de cadenas etoxiladas de una fase que contiene agua a una fase que no la contiene va acompañada de un aumento de entropía por la liberación del agua de solvatación de los grupos éter [29,35-37,40]; evidentemente, el aumento de entropía es mayor a medida que la cadena etoxilada es más larga. Por lo tanto, la retención de cadenas etoxiladas en un sistema de fase reversa con fase móvil acetonitrilo-agua se caracteriza por ser un proceso controlado por la entropía, en donde $\Delta H^\circ > 0$ y $\Delta S^\circ > 0$.

Con base en esta discusión se concluye lo siguiente respecto a los resultados experimentales obtenidos con el compuesto $\text{C}_{12}\text{n}_{10}$:

1) En una fase móvil de AcCN 100% no hay ninguna posibilidad de separación de oligómeros pues la dos fases, estacionaria y móvil, contienen el mismo disolvente y el proceso entrópico responsable de la transferencia diferenciada de cadenas etoxiladas no puede darse. La retención del tensoactivo es casi nula, lo que indica que las interacciones de su cadena alquílica con las cadenas C18 de la fase estacionaria son muy débiles. En estas condiciones resulta lógico que se obtenga un solo pico estrecho y simétrico.

2) Cuando la fase móvil contiene una pequeña fracción de agua (5%), no hay cambios muy significativos en la solubilidad de la cadena alquílica del tensoactivo en esta fase (el V_R del primer oligómero que eluye es sólo un poco mayor al caso anterior, Fig. IV.18 a-b) y, aparentemente, tampoco cambia la solubilidad de las cadenas etoxiladas, ya que un aumento de solubilidad iría en contra de la retención (lo que no ocurre, dados los altos V_R de los oligómeros que eluyen al final). No obstante, el ordenamiento de moléculas de agua a lo largo de las cadenas etoxiladas de los oligómeros, por interacción con el grupo éter, da lugar a una máxima expresión del fenómeno entrópico. En consecuencia, los oligómeros con cadena etoxilada larga son fuertemente retenidos, disminuyendo la retención a medida que el tamaño de esta cadena disminuye. Por lo tanto, en esta fase móvil el orden de elución de los oligómeros es directamente proporcional al número de etoxilos en su molécula.

3) Al continuar aumentando la fracción de agua en el eluyente hasta ~20%, la cadena alquílica no experimenta todavía un efecto hidrofóbico muy notable (el V_r del primer pico cambia muy poco, Fig. V.18 c-e). Por el contrario, el aumento de solubilidad de la cadena etoxilada en fase móvil es muy importante y, obviamente, tiene mayor impacto en los oligómeros de cadena etoxilada más larga. Así, el aumento en el contenido de agua en fase móvil se traduce en un aumento del ΔH° de retención para la cadena etoxilada (valor más positivo), el cual es mayor para los oligómeros de cadena más larga. Por lo tanto, en el intervalo de 5-20 % de H_2O en fase móvil, es de esperarse una pérdida gradual de resolución oligomérica debida a una disminución de retención desigual para los oligómeros. Por otra parte, se ha estimado que en un medio acuoso las cadenas etoxiladas se solvatan con 1-6 moléculas de agua por grupo etoxilo [40], lo que implica que todos los grupos éter de las cadenas etoxiladas se encuentran solvatados desde la fase móvil con 5% de agua. En este contexto, se puede decir que el número de moléculas de agua liberadas por un oligómero dado durante el proceso de retención debería ser el mismo en todas las composiciones de fase móvil. No obstante, estas moléculas ordenadas a lo largo de la cadena etoxilada serían liberadas a un medio cada vez más desordenado a medida que aumenta el contenido de agua; por ello, el ΔS° debería aumentar favoreciendo la retención. De acuerdo con nuestros resultados, y en concordancia con reportes de la literatura [29], el efecto entrópico desfavorable sobrepasa por mucho al efecto entrópico favorable, como lo ilustra la compactación de la ventana de elución de los oligómeros del $C_{12}n_{10}$ y finalmente su coelución en un solo pico ancho (ver Fig. V.18 c-e).

4) Cuando el contenido de agua aumenta por arriba del 20%, los efectos hidrofóbicos sobre la cadena alquílica del tensoactivo se vuelven preponderantes y la retención aumenta progresivamente (Fig. V.18 f-j). La forma cambiante del pico que agrupa a los oligómeros indica que dentro de éste se están produciendo reacomodos y en algún punto el orden de elución se invierte, quedando los compuestos de cadena etoxilada más larga al inicio del pico y los de cadena etoxilada menor al final del pico. De acuerdo con Jandera et al. [29], esta inversión se estaría dando cuando la fase móvil contiene entre 20 y 30% de agua. Probablemente, justo después de la inversión se tendrían las condiciones más favorables para lograr la separación de oligómeros con fines analíticos, ya que en este punto la retención y el ensanchamiento de picos no serían excesivos y la ventana de elución sería más o menos estrecha. Convendría experimentar con columnas más largas y con fases reversas de alto contenido de carbón para lograr este objetivo.

Cabe mencionar que este tipo de fenómenos no pueden producirse en fases móviles metanol-agua, con alto contenido de metanol (p. ej. 85-100 %). En efecto, el proceso entrópico que permite la separación de oligómeros difícilmente se llevaría a cabo pues el metanol es un excelente donador de protones y, a alta concentración, competiría fuertemente con el agua para solvatar a los grupos éter de la cadena etoxilada, tanto en la fase móvil como en la fase estacionaria. Por otra parte, en fases móviles con menor contenido de metanol, los efectos hidrofóbicos sobre la cadena alquílica del tensoactivo serían muy fuertes y dominarían la retención; además, el tiempo de análisis y el ensanchamiento de los picos serían excesivos.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los alcoholes etoxilados de las series C₁₄, C₁₆ y C₁₈ presentaron comportamientos similares en las fases móviles AcCN-H₂O, aunque por su mayor hidrofobicidad sólo se trabajó en el intervalo de 0-20% de agua. En la Tabla V.8 se reporta el número de picos detectados para los compuestos analizados en diferentes composiciones de fase móvil. Como puede constatar, para varios analitos se manifestó una separación, al menos parcial, de un buen número de oligómeros en algunas de las fases móviles ensayadas. A diferencia de los compuestos de la serie C₁₂, en el caso de las series más hidrofóbicas el volumen de retención promedio del conjunto de oligómeros constituyente de cada compuesto aumentó consistentemente al aumentar la cantidad de agua en el eluyente. Respecto a los oligómeros individuales, éstos se comportaron de manera variada, generalmente los primeros picos aumentaron su retención en mayor proporción que los últimos al incrementarse el contenido de agua. Esto condujo a una compactación progresiva de la ventana de elución y, finalmente, coelución de picos en la fase móvil más rica en agua. El compuesto C_{12n23} tuvo un comportamiento muy parecido al del C_{12n10}, una vez alcanzada la separación de sus oligómeros en AcCN 90%, éstos volvieron a traslaparse para coeluir en AcCN 85%, generando un pico ancho con un volumen de retención de 19.2 mL y posteriormente su retención decreció hasta 13.8 mL en AcCN 80%. Es obvio que el mayor tamaño de las cadenas etoxiladas de los oligómeros en este compuesto provocó que los fenómenos descritos en párrafos anteriores se intensificaran notablemente.

Tabla V.8. Número de oligómeros detectados para los alquil alcoholes polietoxilados de diferentes series, analizados en una columna de fase reversa con fases móviles AcCN- H₂O.

Serie	Analito	Número de picos observados*					Serie	Analito	Número de picos observados*				
		0%	5%	10%	15%	20%			0%	5%	10%	15%	20%
Serie C _{12nX}	C ₁₂ OH	-	-	-	-	-	Serie C _{14nX}	C ₁₄ OH	1	-	-	-	-
	C _{12n4}	1	12	12	10	5		C _{14n4}	1	2	4	4	3
	C _{12n10}	1	13	16	6	4		C _{14n8}	1	1	1	1	1
	C _{12n23}	1	-	13	1	1							
Serie C _{16nX}	C ₁₆ OH	1	1	-	-	-	Serie C _{18nX}	C ₁₈ OH	1	1	1	1	1
	C _{16n2}	2	6	7	5	3		C _{18n4}	1	1	1	1	1
	C _{16n10}	1	7	12	12	2		C _{18n10}	1	8	10	11	2
	C _{16n20}	1	-	-	-	-		C _{18n20}	1	-	-	-	-

*El porcentaje indica la cantidad de agua en la fase móvil. - no analizado.

En algunos casos los compuestos no fueron analizados porque no se alcanzaron a detectar. En particular, los alcoholes padres de cada serie representaron un gran

problema debido a su baja o nula señal, excepto el C₁₈OH. Como puede observarse en la Tabla V.8, para algunos derivados etoxilados no se detectó polidispersidad en ninguna de las composiciones AcCN-H₂O ensayadas, es decir, nunca presentaron desdoblamiento de su señal; tal fue el caso del C₁₄n₈ y el C₁₈n₄. Para el resto de los polímeros polietoxilados se observó que a medida que aumentaba la cantidad de agua aumentaba también el número de oligómeros que alcanzaban a separarse hasta llegar a un máximo, después del cual el número de picos volvía a disminuir. En general, las mejores separaciones de oligómeros se obtuvieron en fases móviles con un 10% de agua.

Un punto interesante a mencionar es que los analitos que presentaron un mayor número de oligómeros fueron los alcoholes con número de etoxilación nominal de 10 (valor promedio). Esto se observó para los alcoholes C₁₂n₁₀ con 16 picos y C₁₆n₁₀ con 12 picos en la fase móvil con 10% de agua, y para el C₁₈n₁₀ con 11 picos en la fase móvil con 15% de agua.

V.3.3 Espectrometría de masas y orden de elución

Para poder respaldar las hipótesis planteadas respecto al comportamiento cromatográfico de estos compuestos, se llevaron a cabo algunos estudios por espectrometría de masas. De cada serie de alcoholes etoxilados se eligió al compuesto con mayor polidispersidad, es decir, aquél que había presentado el mayor número de oligómeros resueltos. Los estándares seleccionados para el estudio de masas fueron: C₁₂n₁₀, C₁₄n₄, C₁₆n₁₀ y C₁₈n₁₀.

Para iniciar el análisis de masas, se probó la eficiencia de las diferentes matrices en la preparación de muestra (matriz A: α -CCA en TFA al 0.1% en AcCN-H₂O 50:50%, matriz B: DCBT en TFA al 0.1% en AcCN-H₂O 50:50% y matriz C: DCBT en AcCN) para todos los estándares. Se observó que la *matriz B* permitió una mayor ionización que repercutió directamente en la intensidad de la señal y la detectabilidad de un mayor número de oligómeros, en comparación con las *matrices A y C* (Fig.V.19). Para el caso de la matriz B, la *Intensidad relativa* de los picos mayoritarios correspondientes a la muestra superó el 90%, mientras que para las matrices A y C apenas sobrepasó el 40 y 50%, respectivamente. Es por ello que los análisis posteriores se realizaron utilizando únicamente la matriz B.

La siguiente parte del estudio consistió en analizar una muestra de cada estándar con la finalidad de conocer la identidad y distribución de los oligómeros constituyentes del producto comercial. La Fig. V.20 muestra los espectros obtenidos, observándose una curva de distribución normal típica de compuestos poliméricos. Es importante indicar que, en las condiciones de análisis, el fraccionamiento de las moléculas del tensoactivo en la fuente de ionización del espectrómetro es insignificante; por lo tanto, las señales observadas corresponden a los compuestos originalmente presentes en la muestra, o bien, a señales propias de la matriz utilizada para el análisis espectrométrico. Se registraron iones con ganancias de Na⁺ y también

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

con K^+ , esto es, se promovió la adición electrofílica de estos cationes a los oligómeros, generándose dos series representadas como $[MM+Na]^+$ y $[MM+K]^+$, donde MM es la masa molar del oligómero. Sin embargo, la serie de sodio fue la más abundante en todos los casos. Los picos consecutivos de cada serie mantuvieron entre sí una diferencia de 44 unidades en el valor de m/z , lo que corresponde a la ganancia de un grupo etoxilo ($-CH_2-CH_2-O-$). Esta ganancia sucesiva en masa es característica de mezclas poliméricas y facilita la identificación de los componentes.

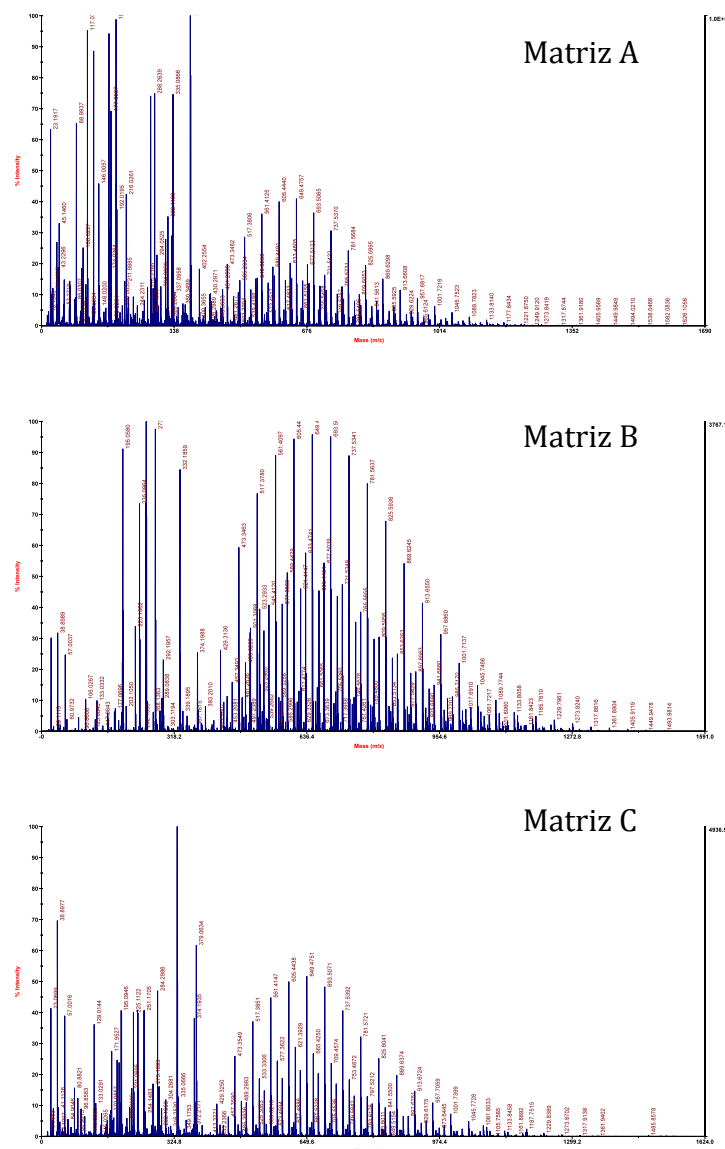


Figura. V.19. Espectros de masas por MALDI-TOF para el alcohol polietoxilado $C_{12}n_{10}$ obtenidos utilizando diferentes matrices.

La intensidad relativa de los picos asociados a los oligómeros está relacionada con la abundancia de cada uno de ellos en la muestra total. Esto se estipula con

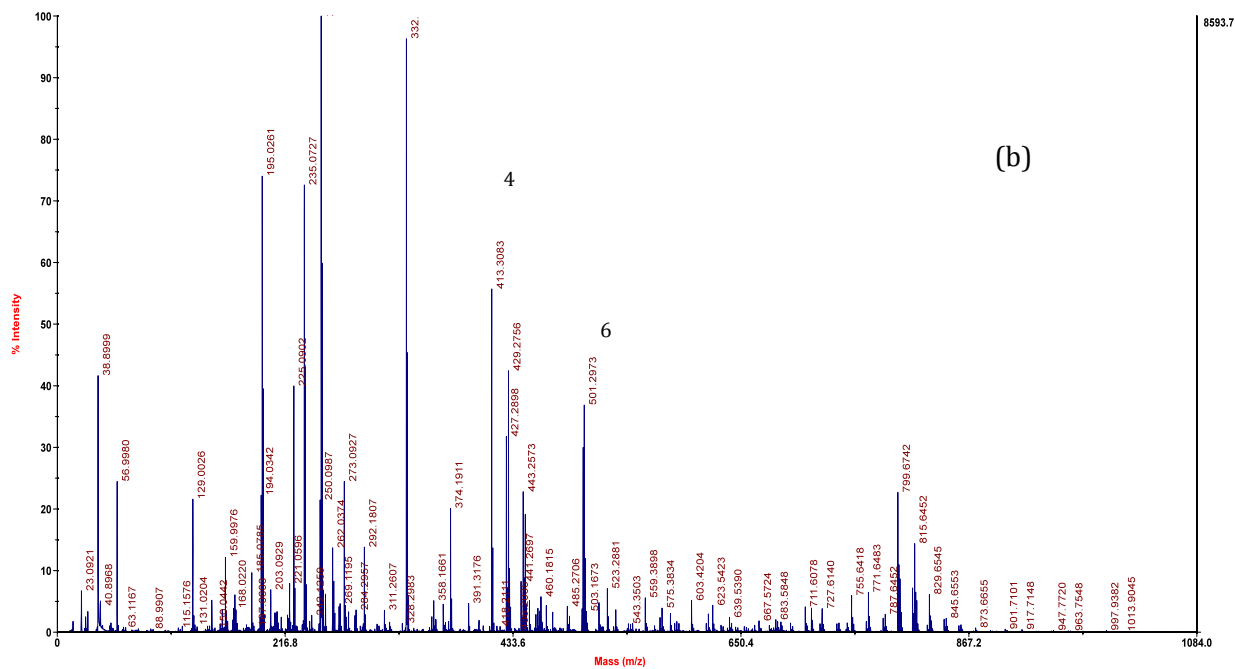
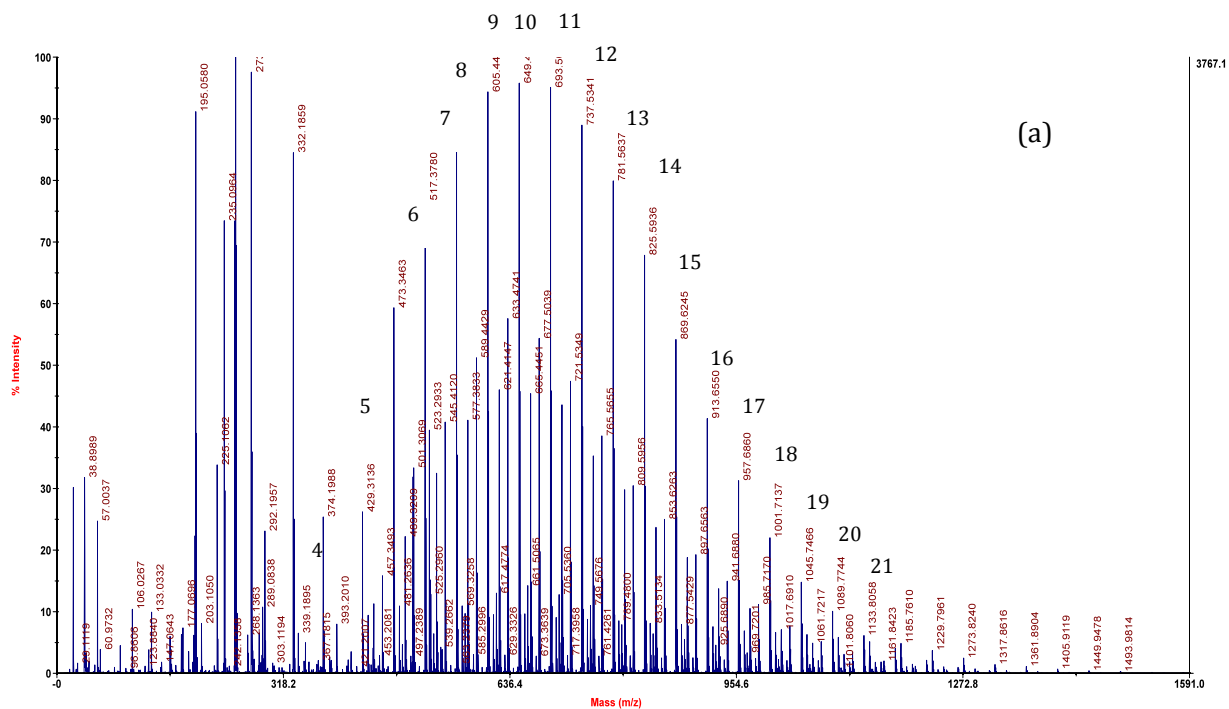
algunas reservas debido a que no todos los iones pueden detectarse con la misma sensibilidad. Sin embargo, el espectro de masas da una idea bastante aproximada de la composición cualitativa y cuantitativa de los estándares analizados. En el caso del estándar $C_{12n_{10}}$ (Fig. V.20 a) se identificaron oligómeros desde C_{12n_4} hasta $C_{12n_{21}}$; a pesar de la gran polidispersidad, los picos de mayor abundancia en el espectro correspondieron al compuesto con 10 etoxilos y a sus homólogos contiguos C_{12n_9} y $C_{12n_{11}}$, coincidiendo con el número de etoxilación nominal del producto comercial. Lo mismo ocurrió en el análisis de los estándares $C_{16n_{10}}$ y $C_{18n_{10}}$ donde los picos correspondientes a los oligómeros con número de etoxilación cercano a 10 fueron los más abundantes en los espectros (Fig. IV.20 c y d). Para ambos estándares se observó también una gran polidispersidad; en el caso del producto $C_{16n_{10}}$ se registraron oligómeros desde C_{16n_4} hasta $C_{16n_{25}}$ mientras que para el alcohol $C_{18n_{10}}$ el intervalo detectado fue desde C_{18n_2} hasta $C_{18n_{24}}$.

Uno caso especial fue el del alcohol C_{14n_4} debido a que no se observó una distribución de oligómeros como en los casos precedentes (Fig. V.20 b). Sin embargo el pico predominante fue el del compuesto con 4 unidades EO, coincidiendo con el número de etoxilación nominal marcado en la etiqueta del estándar. Se podría decir que este estándar es prácticamente monodisperso puesto que, además del C_{14n_4} , sólo se identificó otra señal más pequeña con un valor de m/z que podría asignarse al oligómero C_{14n_6} .

La exactitud en las determinaciones de masa no fue completamente satisfactoria pues las diferencias entre los valores de m/z medidos experimentalmente para las señales asignadas a los oligómeros y los valores teóricos fueron mayores a lo esperado para espectros de alta resolución. Esto se atribuye a un error de calibración del aparato. No obstante, se considera que este desfase no representa un problema mayor para los fines del estudio ya que el error fue de tipo sistemático y se mantuvo en todas las mediciones. En el Apéndice III se reportan los valores experimentales y teóricos correspondientes a las señales de interés en los espectros de la Fig. V.20.

El último paso del estudio de masas consistió en analizar cada uno de los picos separados por cromatografía de líquidos utilizando una fase móvil AcCN- H_2O 90:10 (v/v). En la Figura V.21 se muestran los cromatogramas obtenidos al inyectar las soluciones de los alcoholes $C_{12n_{10}}$, $C_{16n_{10}}$ y $C_{18n_{10}}$ en esta fase móvil, indicando los números asignados y los puntos de corte para cada fracción colectada. Las fracciones fueron tratadas como se describió en la parte experimental (sección IV.3.4) y analizadas en el espectrómetro de masas para su identificación. El compuesto $C_{14n_{10}}$ no se fraccionó debido a su baja polidispersidad.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

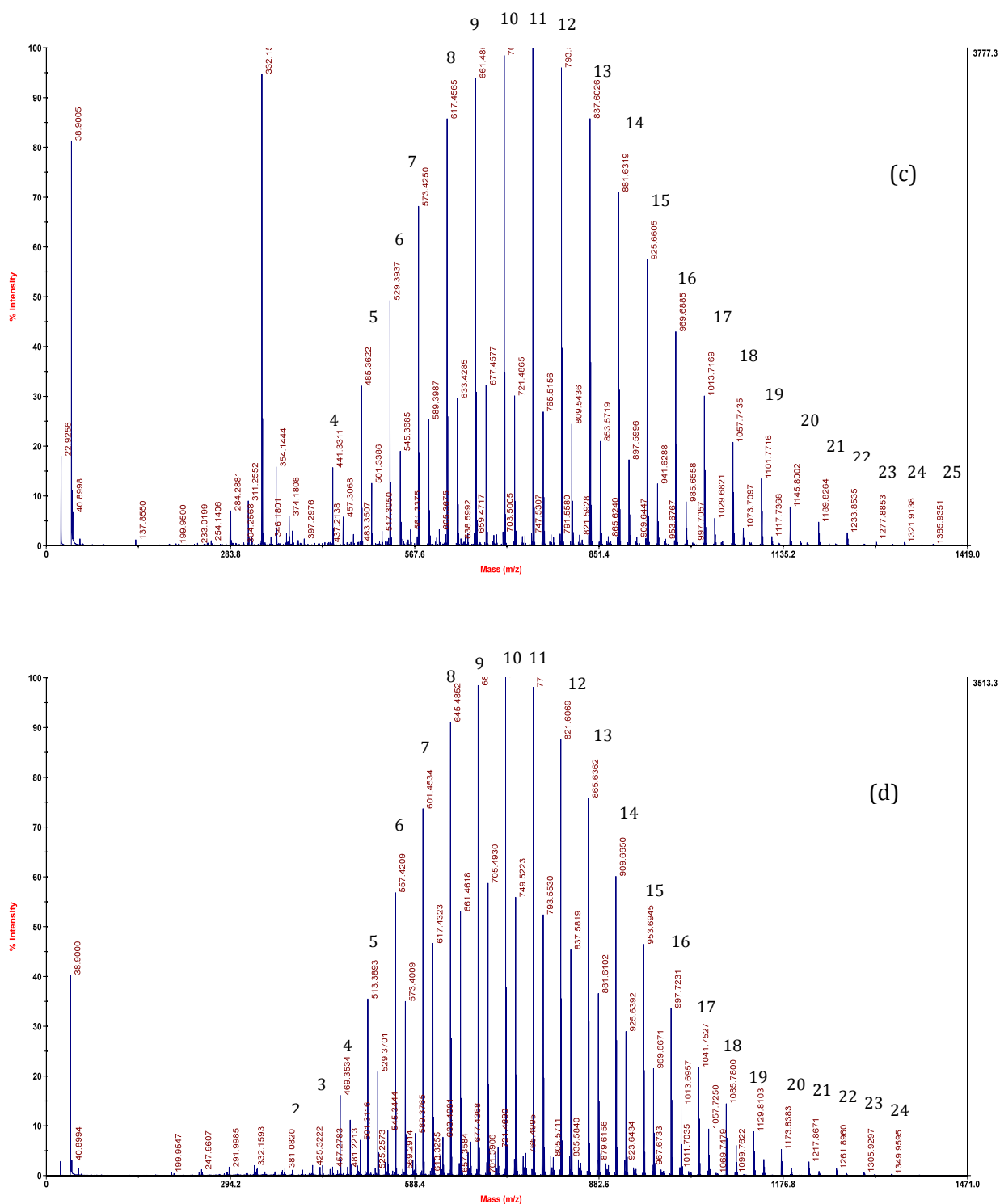


Figura V.20. Espectros de masas por MALDI-TOF de los alcoholes polietoxilados: (a) $C_{12}n_{10}$, (b) $C_{14}n_4$, (c) $C_{16}n_{10}$ y (d) $C_{18}n_{10}$. Los números indican las unidades etoxilo presentes en la cadena de cada oligómero identificado.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

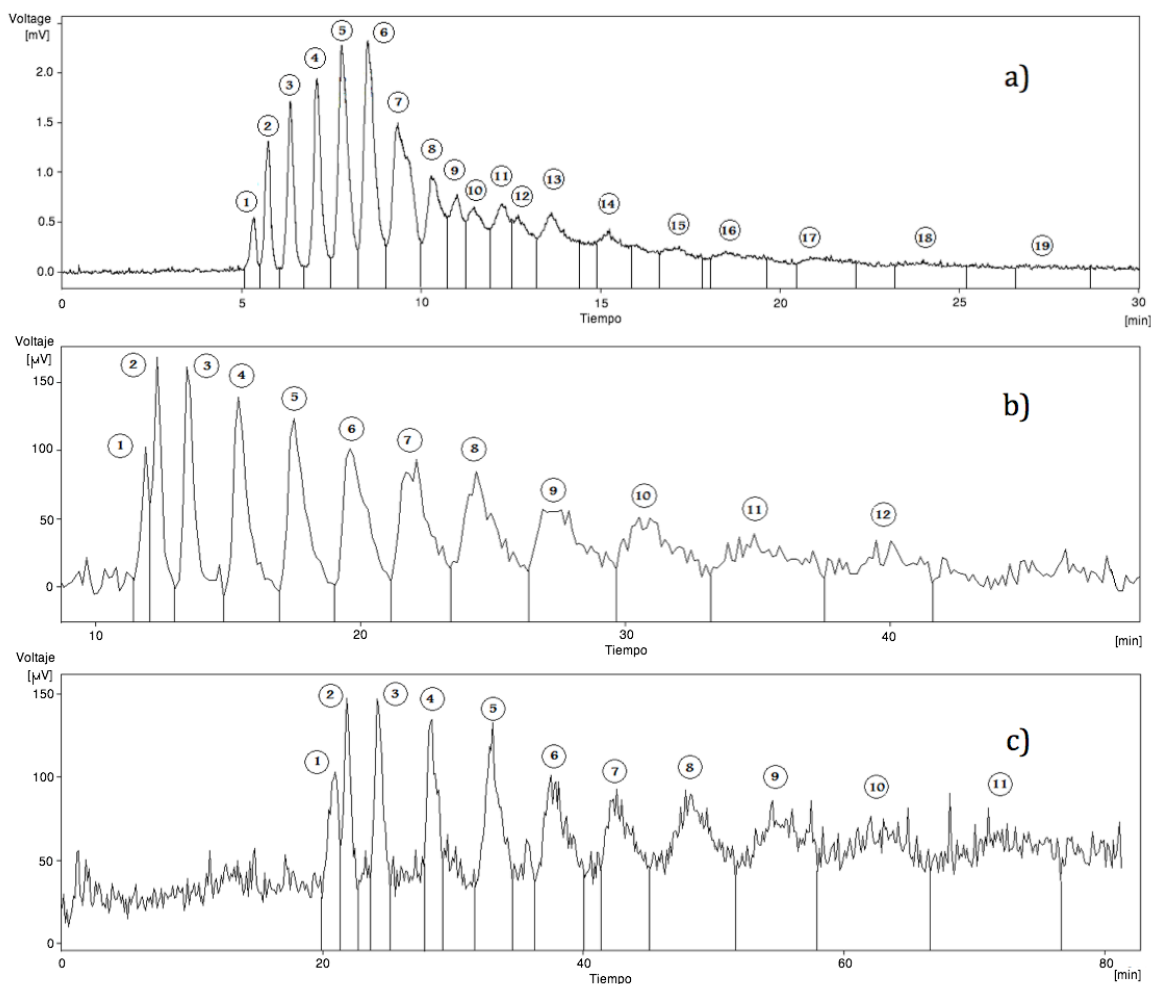
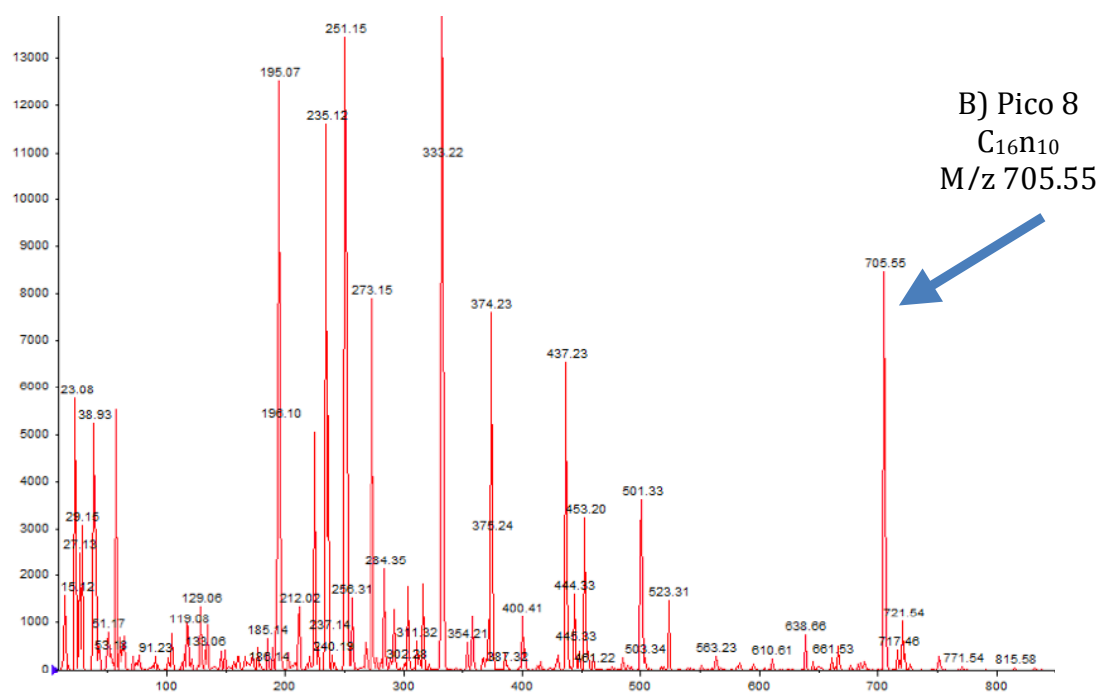
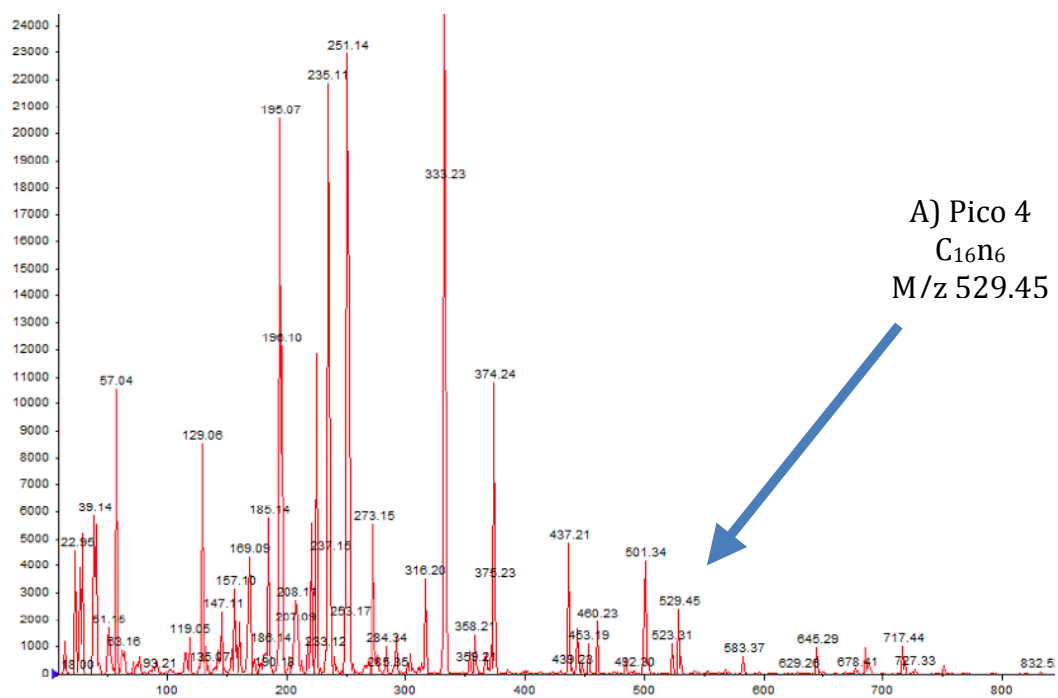


Figura V. 21. Cromatogramas de las muestras de alcoholes fraccionados. El número indica el pico individual colectado para el análisis de masas: a) $C_{12}n_{10}$, b) $C_{16}n_{10}$ y c) $C_{16}n_{10}$.

En la tabla V.9 se reportan los valores de masa medidos ($M+Na^+$) para cada fracción, comparándolos con los valores teóricos. También se indica el volumen de elución correspondiente al punto central de la fracción colectada. En la Figura V.22 se muestran los espectros de masas de tres de las fracciones colectadas para el alcohol polietoxilado $C_{16}n_{10}$ y la identificación de los respectivos oligómeros.

Los datos de la Tabla V.9 se ilustran de manera más clara en la Figura V.23, donde se grafica el volumen de elución medio de la fracción colectada en función del número de etoxilos del oligómero identificado en dicha fracción. Para los tres compuestos analizados se observa un aumento en el volumen de elución de los oligómeros al aumentar el número de etoxilos en sus cadenas. Como puede también apreciarse, la pendiente de las curvas es mayor a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica del compuesto.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



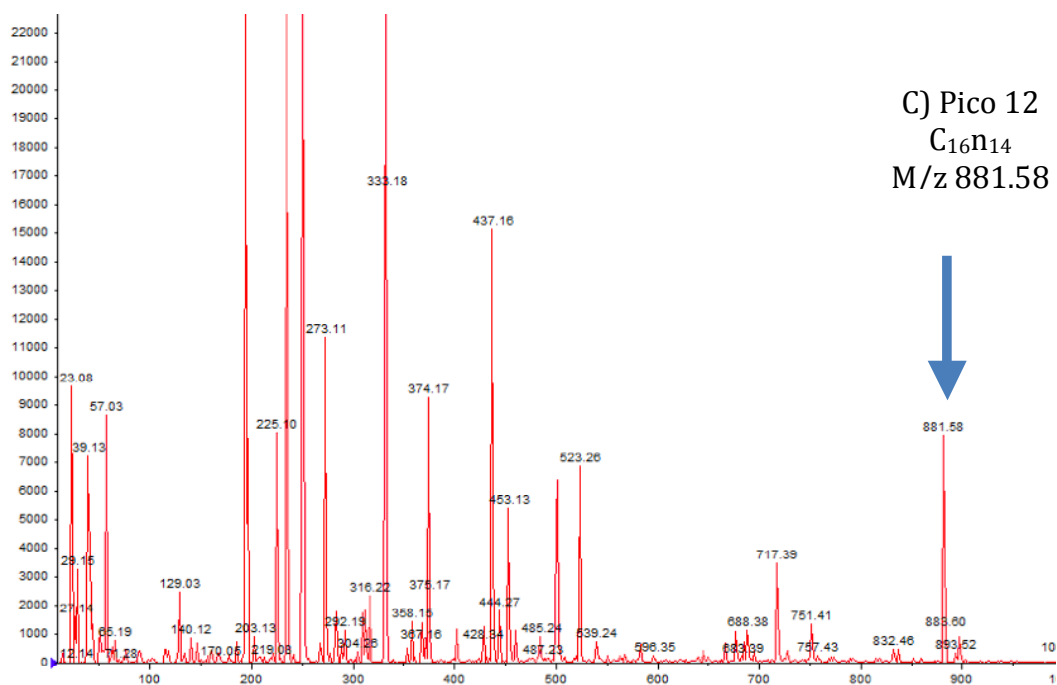


Figura V.22. Espectros de masa de los picos fraccionados 4, 8 y 12 del alcohol polietoxilado C₁₆n₁₀. Los analitos corresponden a los oligómeros A) C₁₆n₆, B) C₁₆n₁₀ y C) C₁₆n₁₄.

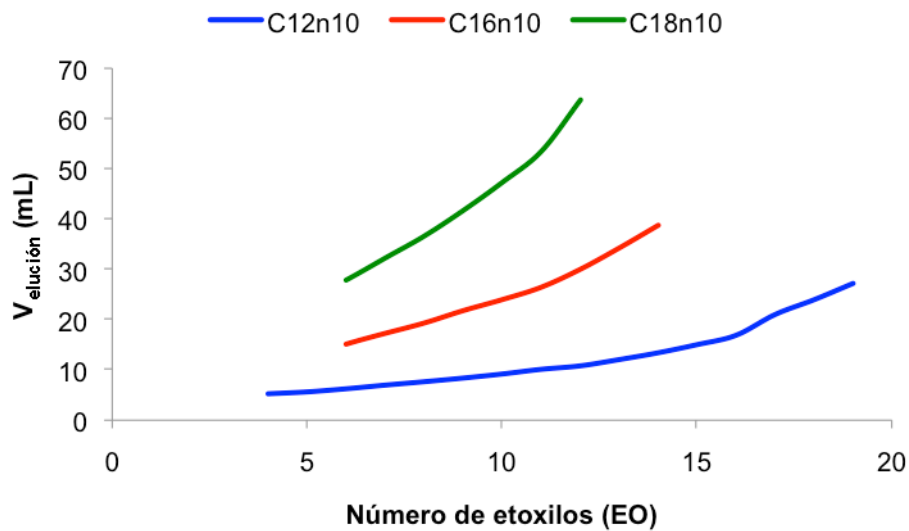


Figura V.23. Variación del Volumen de elución de los oligómeros en función del número de etoxilos determinado por espectrometría de masas. Fase móvil AcCN-H₂O 90:10 (v/v)

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla V.9. Identificación de los oligómeros en las muestras fraccionadas.

C _{12n10}					
No. Fracción	V _{elución} (mL)	Núm. EO	m/z [M+Na]	MM Teo	Diferencia
1	5.3	4	385.27	385.48	-0.208
2	5.7	5	429.29	429.53	-0.235
3	6.4	6	473.33	473.57	-0.242
4	7.1	7	517.35	517.62	-0.269
5	7.8	8	561.38	561.67	-0.286
6	8.5	9	605.41	605.71	-0.303
7	9.4	10	649.45	649.76	-0.31
8	10.3	11	693.49	693.81	-0.317
9 y 10	11	12	737.51	737.85	-0.344
11 y 12	12.3	13	781.55	781.90	-0.351
13	13.6	14	825.59	825.95	-0.358
14	15.3	15	869.62	870.00	-0.375
15 y 16	18.5	16	913.65	914.04	-0.392
17	21.4	17	957.68	958.09	-0.409
18	24.4	18	1001.7	1002.14	-0.436
19	27.7	19	1045.73	1046.18	-0.453
C _{16n10}					
1	11.55	-	-	-	-
2	12.1	-	-	-	-
3	13.34	5	485.39	485.621	-0.231
4	15.13	6	529.41	529.668	-0.258
5	17.19	7	573.45	573.715	-0.265
6	19.25	8	617.48	617.762	-0.282
7	21.73	9	661.51	661.809	-0.299
8	23.93	10	705.54	705.856	-0.316
9	26.4	11	749.57	749.903	-0.333
10	29.98	12	793.6	793.95	-0.35
11	34.24	13	837.63	837.997	-0.367
12	38.78	14	881.66	882.044	-0.384
C _{18n10}					
1	20.967	-	-	-	-
2	21.83	-	-	-	-
3	24.173	-	-	-	-
4	28.367	6	557.42	557.716	-0.296
5	32.93	7	601.45	601.763	-0.313
6	37.37	8	645.48	645.81	-0.33
7	42.55	9	689.51	689.857	-0.347
8	48.223	10	733.54	733.904	-0.364
9	54.513	11	777.57	777.951	-0.381
10	64.873	12	821.6	821.998	-0.398
11	68.08	-	-	-	-

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio permiten asegurar que, en la fase móvil AcCN-H₂O 90:10 (v/v), **el orden de elución de los oligómeros constituyentes de los estándares es directamente proporcional al número de etoxilos presentes en sus cadenas**, siendo en todos los casos el primer pico identificado atribuido al oligómero más pequeño. Por ejemplo, para el caso del compuesto C₁₂n₁₀, el primer pico identificado corresponde al oligómero C₁₂n₄ mientras que el último alcanzado a fraccionar corresponde al C₁₂n₁₉. Para el caso del estándar C₁₆n₁₀ el primer pico identificado se atribuye al oligómero C₁₆n₅ mientras que el último corresponde al C₁₆n₁₄. Por su parte, para el alcohol C₁₈n₁₀ el primer pico identificado se atribuye al oligómero C₁₈n₆ y el último al C₁₈n₁₂.

La composición porcentual de los oligómeros en las muestras se estimó por normalización de áreas. Este método presupone que todos los componentes del estándar analizado tienen un coeficiente de respuesta idéntico en el detector ELSD, lo que no es forzosamente cierto. No obstante, esta aproximación permite tener una idea del orden de abundancia relativo. En la Tabla V.10 se muestran los resultados obtenidos. De acuerdo con esta estimación, los oligómeros predominantes fueron aquellos con un número de etoxilos igual al valor nominal del producto, o bien, los oligómeros contiguos a éstos. Por lo tanto, el estudio de fracciones corrobora lo observado en los espectros de las muestras totales (Fig. V.20) respecto a la coincidencia entre lo determinado experimentalmente y lo indicado en la etiqueta de los estándares comerciales.

Conocido ya el orden de elución y la abundancia de los oligómeros en un estándar dado, es posible visualizar cómo varía la retención de cada uno de ellos al variar la composición de la fase móvil. En la Figura V.24 se esquematiza el comportamiento de los oligómeros del alcohol C₁₂n₁₀ utilizando los datos de los cromatogramas obtenidos en cuatro fases móviles (0, 5, 10 y 15% de H₂O).

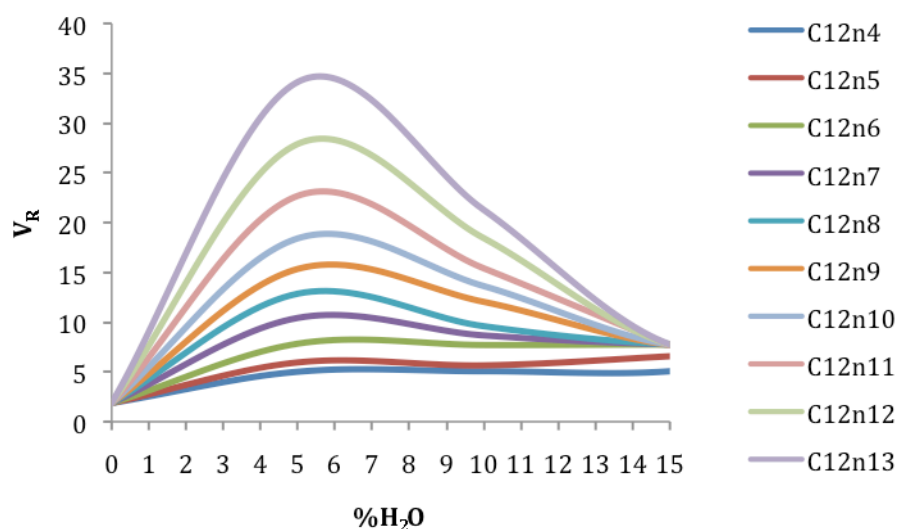


Figura V.24. Variación del V_R con la proporción de agua en fase móvil para los oligómeros del compuesto C₁₂n₁₀.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla V.10. Distribución porcentual oligomérica para los estándares estudiados.

C ₁₂ n ₁₀					C ₁₆ n ₁₀				
Fracción	Oligómero	Área	% Área	Orden de abundancia	Fracción	Oligómero	Área	% Área	Orden de abundancia
1	C ₁₂ n ₄	5.799	1.3	16	1	-	1.771	2.3	12
2	C ₁₂ n ₅	14.645	3.3	13	2	C ₁₆ n ₄	4.246	5.5	11
3	C ₁₂ n ₆	22.126	4.9	10	3	C ₁₆ n ₅	5.26	6.8	10
4	C ₁₂ n ₇	28.637	6.4	8	4	C ₁₆ n ₆	5.81	7.5	9
5	C ₁₂ n ₈	43.732	9.8	3	5	C ₁₆ n ₇	6.504	8.4	7
6	C ₁₂ n ₉	50.611	11.3	2	6	C ₁₆ n ₈	7.022	9	6
7	C ₁₂ n ₁₀	51.924	11.6	1	7	C ₁₆ n ₉	7.668	9.9	4
8	C ₁₂ n ₁₁	27.063	6	9	8	C ₁₆ n ₁₀	8.397	10.8	2
9	C ₁₂ n ₁₂	41.009	9.1	4	9	C ₁₆ n ₁₁	8.709	11.2	1
10	C ₁₂ n ₁₃	38.196	8.5	5	10	C ₁₆ n ₁₂	8.184	10.5	3
11	C ₁₂ n ₁₄	30.348	6.8	6	11	C ₁₆ n ₁₃	7.651	9.9	5
12	C ₁₂ n ₁₅	29.232	6.5	7	12	C ₁₆ n ₁₄	6.406	8.3	8
13	C ₁₂ n ₁₆	17.049	3.8	12	C ₁₈ n ₁₀				
14	C ₁₂ n ₁₇	18.9	4.2	11	Fracción	Oligómero	Área	% Área	Orden de abundancia
15	C ₁₂ n ₁₈	13.615	3	14	1	-	3.42	3.3	10
16	C ₁₂ n ₁₉	10.693	2.4	15	2	-	4.697	4.5	9
					3	-	6.25	6	8
					4	C ₁₈ n ₆	9.321	8.9	6
					5	C ₁₈ n ₇	8.519	8.1	7
					6	C ₁₈ n ₈	9.852	9.4	5
					7	C ₁₈ n ₉	10.64	10.2	4
					8	C ₁₈ n ₁₀	12.94	12.4	2
					9	C ₁₈ n ₁₁	15.326	14.6	1
					10	C ₁₈ n ₁₂	11.974	11.4	3

Aunque para todos los picos se observa una tendencia similar, es evidente que la composición de la fase móvil tiene mayor impacto en los oligómeros con mayor número de etoxilos. Así, el compuesto con 13 unidades EO muestra una enorme variación en su volumen de retención al cambiar el contenido de agua de la fase móvil; por el contrario, en las mismas condiciones, el cambio en el volumen de retención de los oligómeros con cadena etoxilada muy corta es apenas perceptible.

V.3.4. Estudio de otras variables

Debido a que en fases móviles ACN-H₂O la mayoría de los estándares de los alcoholes etoxilados presentaron un desdoblamiento de picos seguido por una compactación al aumentar el contenido de agua, no fue posible realizar un estudio multivariable para describir el efecto de otros factores experimentales sobre el V_R . No obstante, se decidió hacer un estudio somero de la influencia de dos factores sobre el *volumen de retención* de los alcoholes C₁₂n₁₀ y C₁₆n₁₀. Los factores analizados fueron: *Temperatura* (T⁻ = 25°C y T⁺ = 40°C) y *Velocidad de flujo* (F⁻ = 0.5 mL/min y F⁺ = 1 mL/min); sin embargo, indirectamente también se analiza otro factor que es el *Largo de la cadena hidrocarbonada* (L⁻ = 12 y L⁺ = 16). La composición de la fase móvil se mantuvo constante (ACN-H₂O 90-10, v/v). Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura V.25.

El *Largo de cadena hidrocarbonada* (L) es por mucho el factor que más afecta a la retención; así, para esta composición de fase móvil, el V_R se multiplica prácticamente por dos con un aumento de 4 metilenos en la cadena alquílica. Por lo tanto, como en todo sistema de fase reversa, la hidrofobicidad es el factor determinante en la retención.

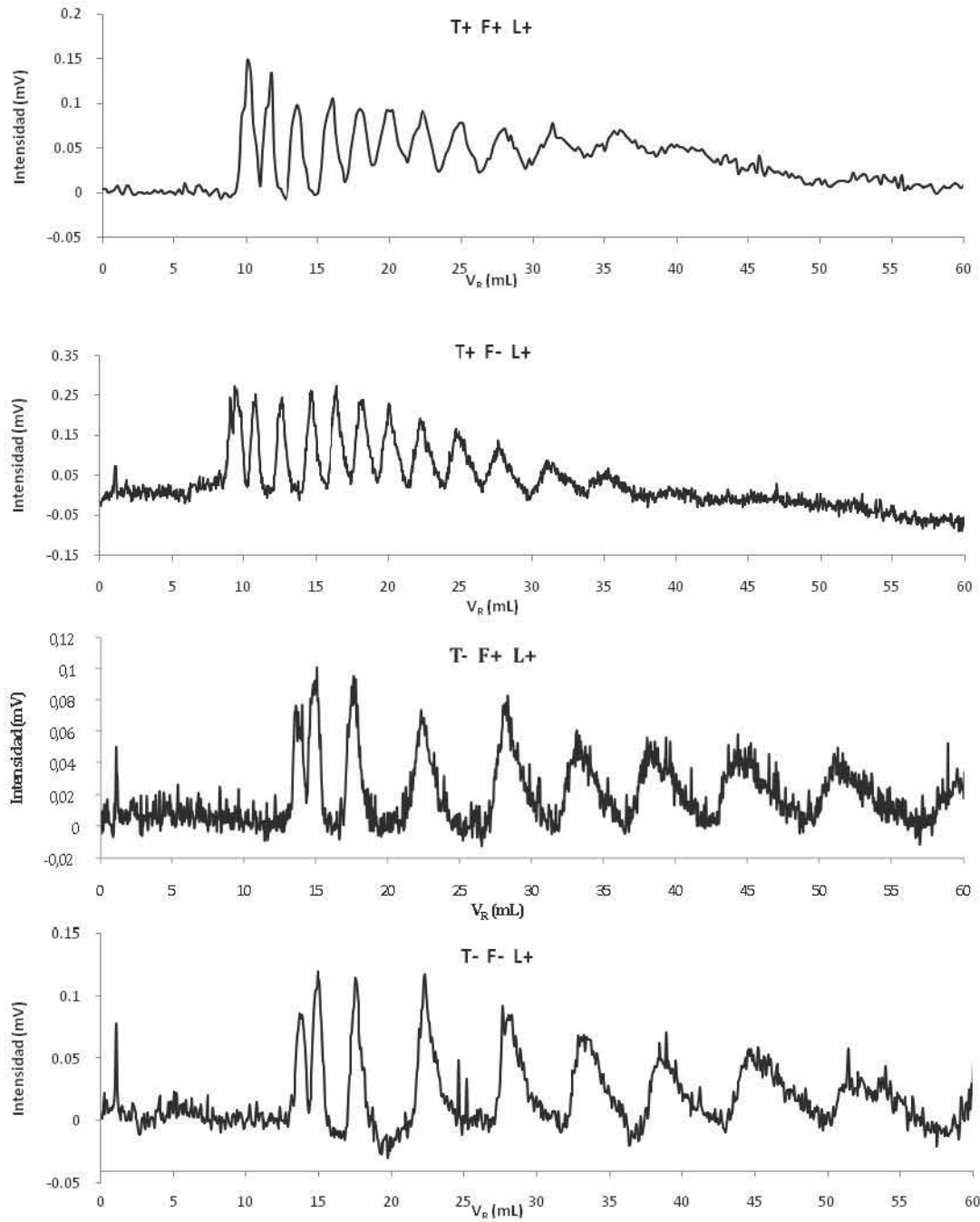
El segundo factor en importancia es la *Temperatura* y su efecto relativo es mayor para el alcohol de cadena alquílica más corta. El análisis detallado de los cromatogramas muestra que una disminución de 15°C en la temperatura provoca, en promedio, un aumento de aproximadamente 50% en la retención de los oligómeros del alcohol C₁₆, mientras que el aumento promedio es de casi 100% para los oligómeros del alcohol C₁₂. Adicionalmente se observa que, para un mismo largo de cadena alquílica, el efecto de la temperatura es mayor para los últimos picos, es decir, para los oligómeros con mayor número de unidades EO. Por una parte, este comportamiento corrobora que el proceso de retención de todos los oligómeros de los dos alcoholes en la columna de fase reversa con fase móvil AcCN-H₂O 90-10 (v/v) es globalmente exotérmico, confirmando así la predominancia de la cadena alquílica en la retención (recordemos que para la cadena alquílica el proceso de retención se caracteriza por $\Delta H^\circ < 0$ y $\Delta S^\circ < 0$). Por otra parte, como ya se comentó en una sección anterior (sección V.3.2), el efecto entrópico, que hace que los oligómeros con cadena etoxilada más grandes se retengan más, también está jugando un papel importante en esta condición de fase móvil. Sin embargo, si se asume que la entropía es la responsable de la retención de la cadena etoxilada (recordando que para ésta $\Delta H^\circ > 0$ y $\Delta S^\circ > 0$), resulta contradictorio que una disminución de la temperatura provoque un aumento más significativo en la retención de los oligómeros con mayor número de etoxilos. De hecho, en la literatura se ha reportado lo contrario, es decir, un aumento en la retención de los oligómeros con cadena etoxilada más larga al aumentar la temperatura [40]; no obstante, ese

comportamiento se observó en una fase móvil con 30% de agua, condición en la cual ya se había producido la inversión en el orden de elución de los oligómeros (los de cadena etoxilada más larga eluían primero). La única manera de explicar el comportamiento observado en el presente trabajo es aceptando que los parámetros termodinámicos de los alquil alcoholes etoxilados no son constantes en el intervalo de temperaturas estudiado (en esta fase móvil) y que su variación depende del tamaño de la cadena etoxilada. Este postulado tiene sustento en trabajos reportados en la literatura donde se demuestra que: 1) las gráficas de Van't Hoff para polietilenglicoles ($\ln k'$ vs $1/T$) tienen una pendiente mayor a medida que el número de unidades EO en el compuesto aumenta [36], y 2) estas gráficas no son completamente lineales para los alquil alcoholes polietoxilados y la desviación a la linealidad es más pronunciada para los oligómeros con cadena etoxilada más larga [37]. Bajo estos supuestos, se concluye que, en las condiciones de nuestro estudio, el ΔH° de retención para la cadena etoxilada debió de ser menos positivo (menos desfavorable) a temperaturas más bajas y aunque es posible que también ΔS° disminuyera con la temperatura, el cambio entálpico tuvo que ser mayor de modo que globalmente la retención de la cadena etoxilada aumentó al disminuir la temperatura. Puesto que la entalpía está relacionada con la solubilidad, la propuesta anterior implica que la solubilidad de la cadena etoxilada en una fase móvil que contiene 90% de acetonitrilo y 10% de agua aumenta al aumentar la temperatura ocasionando una disminución en la retención.

Es importante recalcar que en fases móviles con mayor contenido de agua ocurre lo contrario, la solubilidad de la cadena etoxilada en fase móvil disminuye al aumentar la temperatura y por ello la retención de los oligómeros de cadena etoxilada más larga es mayor a mayor temperatura. Estas reflexiones ponen en evidencia el complejísimo comportamiento de los AAP en los sistemas de cromatografía en fase reversa con fases móviles acetonitrilo-agua.

Finalmente, en lo que se refiere a la *Velocidad de flujo* de la fase móvil, la comparación de cromatogramas en la Fig. V.25 muestra que su efecto es insignificante a baja temperatura (25°C) pero alcanza a percibirse un ligero aumento en la retención al aumentar el flujo a alta temperatura (40°C). Independientemente de su pequeño efecto en la retención, lo más interesante de este parámetro desde el punto de vista práctico es su efecto en la definición y forma de los picos. A medida que el flujo disminuye, los picos son más definidos y la resolución de oligómeros es más nítida. Desafortunadamente, este benéfico efecto sólo se observa a temperaturas altas.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



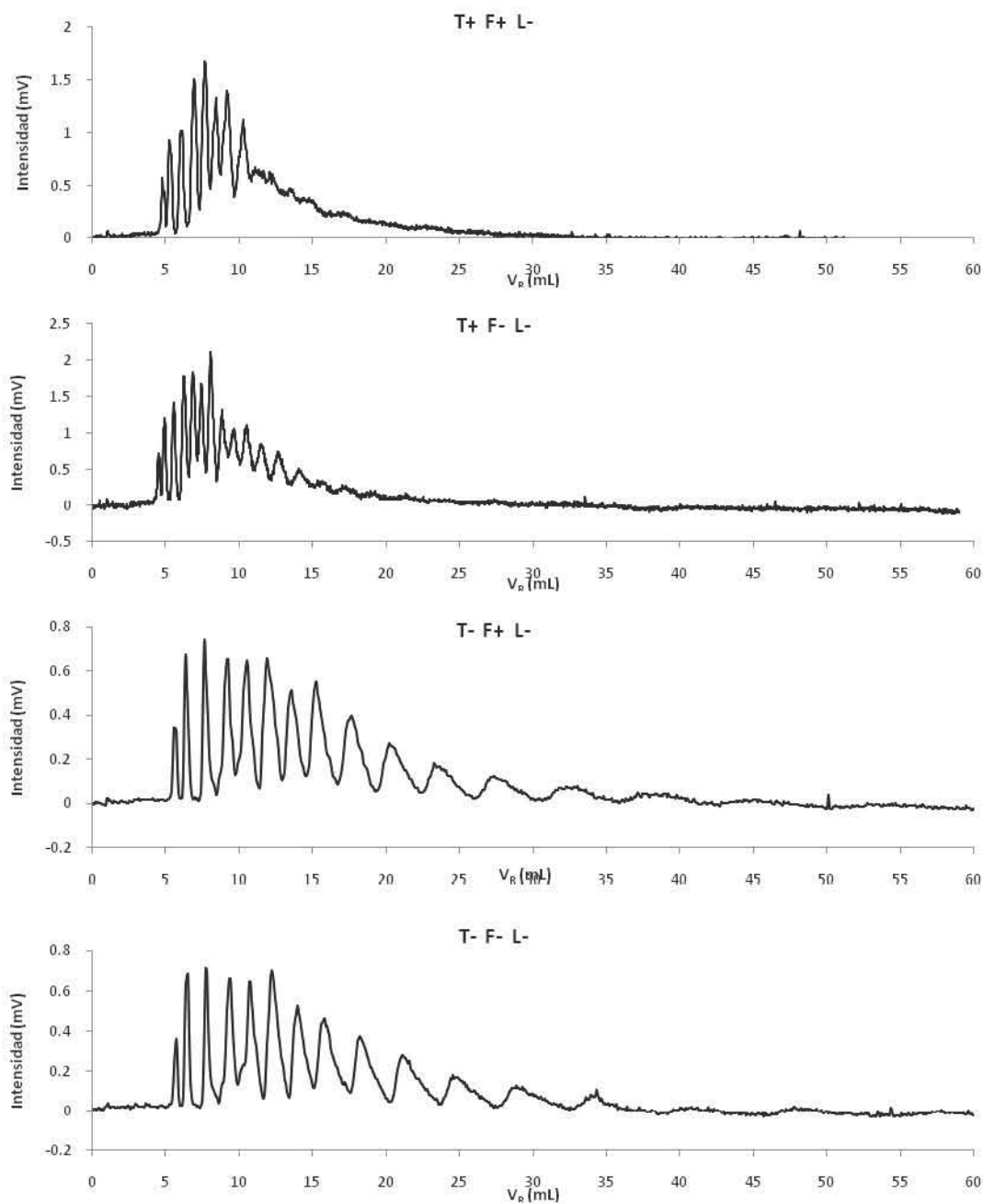


Figura. V.25. Cromatogramas obtenidos a diferentes condiciones de análisis: a) $T=40^{\circ}\text{C}$, $F=1\text{ mL/min}$, $L=16$, b) $T=40^{\circ}\text{C}$, $F=0.5\text{ mL/min}$, $L=16$, c) $T=25^{\circ}\text{C}$, $F=1\text{ mL/min}$, $L=16$, d) $T=25^{\circ}\text{C}$, $F=0.5\text{ mL/min}$, $L=16$, e) $T=40^{\circ}\text{C}$, $F=1\text{ mL/min}$, $L=12$, f) $T=40^{\circ}\text{C}$, $F=0.5\text{ mL/min}$, $L=12$, g) $T=25^{\circ}\text{C}$, $F=1\text{ mL/min}$, $L=12$, h) $T=25^{\circ}\text{C}$, $F=0.5\text{ mL/min}$, $L=12$

VI. CONCLUSIONES

En este trabajo se realizó un estudio detallado del comportamiento cromatográfico de los alquil alcoholes etoxilados (AAP) en una columna convencional de fase reversa con fases móviles metanol-agua y acetonitrilo-agua. Este estudio demostró que el comportamiento de los AAP era completamente diferente al cambiar el componente orgánico de la fase móvil. Dada la alta hidrofobicidad de los compuestos de interés, cuya cadena alquílica consta de 12 o más átomos de carbono, solo se analizaron fases móviles ricas en disolvente orgánico (generalmente $\geq 80\%$, v/v) para mantener los tiempos de retención y el ensanchamiento de los picos dentro de límites razonables.

En el caso de las fases móviles metanol-agua se observó un comportamiento típico de fase reversa, en donde la cadena alquílica del alcohol graso etoxilado domina la retención y la cadena etoxilada es prácticamente transparente. Esto significa que todos los compuestos de una misma serie, es decir, con cadena alquílica del mismo tamaño, coeluyen en un solo pico. Por lo tanto, estas fases móviles no son aptas para la separación de un compuesto dado en sus oligómeros constituyentes. Por el contrario, las fases móviles metanol-agua son la mejor opción para separar mezclas de AAP de diferentes series en formulaciones comerciales de productos tensoactivos.

Como en todo sistema de fase reversa, la retención de los AAP en fases móviles metanol-agua es mayor cuando los efectos hidrofóbicos son más intensos, lo cual sucede al incrementar la proporción de agua en el eluyente o al aumentar el largo de la cadena alquílica del compuesto. Además de estas variables principales, también se estudió el efecto de las variables secundarias, temperatura y flujo. Los volúmenes de retención de los AAP disminuyen significativamente al aumentar la temperatura (intervalo: 25-40°C) y este efecto es más notable en las fases móviles con mayor contenido de agua. Por eso, es indispensable regular la temperatura de la columna para tener resultados reproducibles, especialmente cuando se trabaja con gradientes de elución. Por otra parte, la velocidad de flujo tiene un efecto positivo pero pequeño en la retención, el cual está relacionado con los cambios en la caída de presión de la columna, estos cambios son más importantes en las fases móviles con mayor contenido de agua (mayor viscosidad) y es por ello que el efecto del flujo en el volumen de retención es más perceptible en estas fases.

El comportamiento de los AAP en las fases móviles acetonitrilo-agua se caracterizó por el desdoblamiento de su señal en múltiples picos correspondientes a sus oligómeros constituyentes. Esta separación de oligómeros se observó en la mayoría de los compuestos estudiados, independientemente del largo de su cadena alquílica. Por lo tanto, estas fases

VI. CONCLUSIONES

son apropiadas para analizar la polidispersidad de estos compuestos, ya sea con fines de control de calidad o para identificar la presencia de un compuesto particular en un producto formulado.

El comportamiento de retención de los AAP en estas fases es sumamente complejo. Por una parte se observa una importante componente hidrofóbica ya que la retención promedio del conjunto de oligómeros aumenta al aumentar el tamaño de la cadena alquílica. Sin embargo, el comportamiento al aumentar la cantidad de agua en fase móvil es poco predecible ya que la retención promedio puede aumentar o disminuir dependiendo del compuesto y del propio contenido de agua del eluyente. Adicionalmente, los oligómeros individuales se comportan de diferente manera dependiendo del largo de su cadena etoxilada. Los de cadena etoxilada más larga aumentan considerablemente su retención al añadir una pequeña fracción de agua a la fase móvil (5%) y luego tienden a disminuirla, en algunos casos de manera muy importante, al continuar aumentando la proporción de agua; por el contrario, los de cadena etoxilada corta cambian poco su retención al aumentar el contenido de agua en la fase móvil hasta, aproximadamente, 20%. Este comportamiento diferente origina primero una amplia separación y luego un colapso de oligómeros y su coelución en un pico ancho y asimétrico. En todo caso, mediante un estudio por espectrometría de masas se demostró que en las fases móviles con contenidos de agua $\leq 20\%$ (v/v), el orden de elución de los oligómeros es directamente proporcional al número de etoxilos de su cadena polar.

La temperatura tiene también un efecto importante en la retención y separación de los oligómeros en estas fases móviles. A medida que la temperatura disminuye la retención aumenta y este efecto es más notable en los oligómeros con cadena etoxilada más larga.

El complejo comportamiento en fases móviles acetonitrilo-agua está relacionado con factores entálpicos y entrópicos opuestos para la cadena hidrocarbonada y la cadena etoxilada durante el proceso de retención. Para la primera tanto el cambio de entalpía como el cambio en entropía son negativos, mientras que para la segunda son positivos.

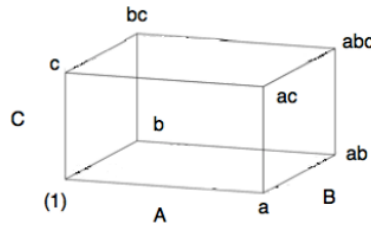
VII. ANEXOS

Apéndice I. Ecuaciones estadísticas empleadas

Estadístico	Símbolo	Ecuación	VARIABLES
Media aritmética muestral	\bar{x}	$\bar{x} = \frac{\sum_i^n x_i}{n}$	x_i : datos n : número de datos totales
Desviación estándar	s	$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}}$	\bar{x} : media x_i : datos n : número de datos totales
Varianza	s^2	$s^2 = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)}$	*Cuadrado de la desviación estándar
Coficiente de variación	CV	$CV = 100 \frac{s}{\bar{x}}$	\bar{x} : media s : desviación estándar
Intervalo de confianza	IC	$\pm t_{n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$	t : valor de tablas con $n-1$ grados de libertad (v) y probabilidad α .
Contraste F	F	$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$	S_1^2, S_2^2 varianza 1 y 2 respectivamente.

Apéndice II. Ecuaciones empleadas en el Modelo Factorial 2^k

Un modelo factorial 2^k puede representarse gráficamente por un cubo cuando $K=3$. Los vértices de este paralelepípedo son formados por los niveles de cada factor tal como se muestra en la siguiente figura:



Para este caso, los factores principales son representados por las letras mayúsculas **A**, **B** y **C**, mientras que los niveles corresponden a las letras minúsculas **a**, **b** y **c**. El vértice (1) corresponde al origen. Para el factor A por ejemplo, su nivel inferior correspondería al vértice (1) mientras que para el superior sería al vértice **a**. Con esta figura se puede calcular la estimación de los efectos al evaluar los incrementos o decrementos entre las caras para el nivel superior e inferior de un factor. Por lo tanto, los efectos de los factores se calculan según las siguientes ecuaciones:

Efectos Principales

$$A = \frac{1}{4n} [a + ab + ac + abc - (1) - b - c - bc]$$

$$B = \frac{1}{4n} [b + ab + bc + abc - (1) - a - c - ac]$$

$$C = \frac{1}{4n} [c + ac + bc + abc - (1) - a - b - ab]$$

Con: **a-1**, **b-1** y **c-1** grados de libertad.

Las interacciones pueden calcularse según las siguientes ecuaciones:

Interacciones dobles

$$AB = \frac{1}{4n} [(1) - a - b + ab + c - ac - bc + abc]$$

$$AC = \frac{1}{4n} [(1) - a + b - ab - c + ac - bc + abc]$$

$$BC = \frac{1}{4n} [(1) + a - b - ab - c - ac + bc + abc]$$

Interacción triple

$$ABC = \frac{1}{4n} [abc - bc - ac + c - ab + b + a - (1)]$$

Para calcular la suma de cuadrados de cualquier efecto, se considera el número de réplicas realizadas n :

$$SS = \frac{(Contraste)^2}{8n}$$

Donde el contraste corresponde al resultado de los valores entre corchetes en las ecuaciones de los efectos, por ejemplo, para el factor **C** sería $[c+ac+bc+abc-(1)-a-b-ab]$.

La conjunción de estos valores nos aporta un modelo de regresión polinomial con fórmula general:

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x_1 + \hat{\beta}_2 x_2 + \hat{\beta}_3 x_3 + \hat{\beta}_{12} x_1 x_2$$

Donde las β representan los coeficientes obtenidos para los factores (1, 2 y 3) mientras que las x corresponden a las variables codificadas. La β_0 corresponde al error aleatorio.

Apéndice III. Identificación de picos en los espectros de masas de la muestra C_{12n10} obtenidos por MALDI-TOF

Núm. Oligómero	Fórmula	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₀ -OH (C _{12n10})				
		Masa Molar				
		Nom.	Teórica	Teórica Na	Observada	Diferencia
0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -OH	186	186.301	209.29	-	-
1	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂)-OH	230	230.348	253.337	-	-
2	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂ -OH	274	274.395	297.384	-	-
3	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₃ -OH	318	318.442	341.431	-	-
4	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₄ -OH	362	362.489	385.478	385.2809	-0.1971
5	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₅ -OH	406	406.536	429.525	429.3136	-0.2114
6	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₆ -OH	450	450.583	473.572	473.3463	-0.2257
7	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₇ -OH	494	494.63	517.619	517.378	-0.241
8	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₈ -OH	538	538.677	561.666	561.4097	-0.2563
9	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₉ -OH	582	582.724	605.713	605.4428	-0.2702
10	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₀ -OH	626	626.771	649.76	649.4732	-0.2868
11	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₁ -OH	670	670.818	693.807	693.5039	-0.3031
12	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₂ -OH	714	714.865	737.854	737.5341	-0.3199
13	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₃ -OH	758	758.912	781.901	781.5637	-0.3373
14	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₄ -OH	802	802.959	825.948	825.5936	-0.3544
15	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₅ -OH	846	847.006	869.995	869.3245	-0.6705
16	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₆ -OH	890	891.053	914.042	913.655	-0.387
17	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₇ -OH	934	935.1	958.089	957.686	-0.403
18	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₈ -OH	978	979.147	1002.136	1001.714	-0.4223
19	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₉ -OH	1022	1023.194	1046.183	1045.747	-0.4364
20	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₀ -OH	1066	1067.241	1090.23	1089.774	-0.4556
21	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₁ -OH	1110	1111.288	1134.277	1133.806	-0.4712
22	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₂ -OH	1154	1155.335	1178.324	-	-
23	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₃ -OH	1198	1199.382	1222.371	-	-
24	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₄ -OH	1242	1243.429	1266.418	-	-
25	CH ₃ -(CH ₂) ₁₁ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₅ -OH	1286	1287.476	1310.465	-	-

Apéndice III. Identificación de picos en los espectros de masas de la muestra C_{16n10} obtenidos por MALDI-TOF (Continuación)

Núm. Oligómero	Fórmula	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₀ -OH (C _{16n10})				
		Teórica	Teórica Na	Observada	Diferencia	
0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -OH	242	242.397	265.386	-	-
1	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂)-OH	286	286.444	309.433	-	-
2	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂ -OH	330	330.491	353.48	354.1737	0.6937
3	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₃ -OH	374	374.538	397.527	-	-
4	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₄ -OH	418	418.585	441.574	441.3503	-0.2237
5	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₅ -OH	462	462.632	485.621	-	-
6	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₆ -OH	506	506.679	529.668	529.4178	-0.2502
7	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₇ -OH	550	550.726	573.715	573.4504	-0.2646
8	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₈ -OH	594	594.773	617.762	617.4835	-0.2785
9	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₉ -OH	638	638.82	661.809	661.5152	-0.2938
10	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₀ -OH	682	682.867	705.856	705.5461	-0.3099
11	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₁ -OH	726	726.914	749.903	749.5766	-0.3264
12	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₂ -OH	770	770.961	793.95	793.6084	-0.3416
13	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₃ -OH	814	815.008	837.997	837.6385	-0.3585
14	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₄ -OH	858	859.055	882.044	881.668	-0.376
15	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₅ -OH	902	903.102	926.091	925.6982	-0.3928
16	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₆ -OH	946	947.149	970.138	969.727	-0.411
17	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₇ -OH	990	991.196	1014.185	1013.756	-0.4294
18	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₈ -OH	1034	1035.243	1058.232	1057.787	-0.445
19	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₉ -OH	1078	1079.29	1102.279	1101.818	-0.461
20	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₀ -OH	1122	1123.337	1146.326	1145.847	-0.4793
21	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₁ -OH	1166	1167.384	1190.373	1189.878	-0.4952
22	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₂ -OH	1210	1211.431	1234.42	1233.905	-0.5152
23	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₃ -OH	1254	1255.478	1278.467	1277.935	-0.5322
24	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₄ -OH	1298	1299.525	1322.514	1321.964	-0.5498
25	CH ₃ -(CH ₂) ₁₅ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₅ -OH	1342	1343.572	1366.561	1365.996	-0.5655

Apéndice III. Identificación de picos en los espectros de masas de la muestra C_{18n10} obtenidos por MALDI-TOF (Continuación)

Núm. Oligómero	Fórmula	Masa Molar				
		Teórica	Teórica Na	Observada	Diferencia	
	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₀ -OH (C _{18n10})					
0	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -OH	270	270.445	293.434	-	-
1	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂)-OH	314	314.492	337.481	-	-
2	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂ -OH	358	358.539	381.528	-	-
3	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₃ -OH	402	402.586	425.575	-	-
4	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₄ -OH	446	446.633	469.622	-	-
5	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₅ -OH	490	490.68	513.669	513.3893	-0.2797
6	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₆ -OH	534	534.727	557.716	557.4209	-0.2951
7	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₇ -OH	578	578.774	601.763	601.4534	-0.3096
8	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₈ -OH	622	622.821	645.81	645.4852	-0.3248
9	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₉ -OH	666	666.868	689.857	689.5163	-0.3407
10	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₀ -OH	710	710.915	733.904	733.5464	-0.3576
11	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₁ -OH	754	754.962	777.951	777.5769	-0.3741
12	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₂ -OH	798	799.009	821.998	821.6069	-0.3911
13	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₃ -OH	842	843.056	866.045	865.6362	-0.4088
14	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₄ -OH	886	887.103	910.092	909.665	-0.427
15	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₅ -OH	930	931.15	954.139	953.6945	-0.4445
16	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₆ -OH	974	975.197	998.186	997.7231	-0.4629
17	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₇ -OH	1018	1019.244	1042.233	1041.753	-0.4803
18	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₈ -OH	1062	1063.291	1086.28	1085.78	-0.5
19	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₁₉ -OH	1106	1107.338	1130.327	1129.81	-0.5167
20	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₀ -OH	1150	1151.385	1174.374	1173.838	-0.5357
21	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₁ -OH	1194	1195.432	1218.421	1217.867	-0.5539
22	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₂ -OH	1238	1239.479	1262.468	1261.896	-0.572
23	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₃ -OH	1282	1283.526	1306.515	1305.93	-0.5853
24	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₄ -OH	1326	1327.573	1350.562	1349.96	-0.6025
25	CH ₃ -(CH ₂) ₁₇ -(O-CH ₂ -CH ₂) ₂₅ -OH	1370	1371.62	1394.609	-	-

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **What are polymers?** [en línea, disponible en <http://www.iupac.org/polyedu/page33/page33.html>; Internet; acceso el 20 de octubre del 2009].
2. Jenkins A.D., Kratochvil P., Stepto R.F.T., Suter W., **Glossary of basic terms in polymer science**, Pure and Applied Chemistry **68**: 2287–2311, 1996.
3. Cowie J.M., **Polymers: Chemistry and physics of modern materials**, Blackie Glasgow & London, USA, 79-290, 1991.
4. Challa G., Polymer chemistry. **An introduction, Series in Polymer Science**. Ellis Horwood, UK, 1-192, 1993.
5. Morrison R.T., Boyd R.N., **Química orgánica**, Addison Wesley Longman, 5ª edición, México, 950-1095, 1998.
6. Apuntes del curso “**Técnicas de caracterización de polímeros**”, Herrera M. y Herrera R., Facultad de Química, UNAM, 2009.
7. Hunt B.J., James M.I., **Polymer Characterization**, Blackie Academic & Professional, UK, 1-200, 1993.
8. Montaudo G., Lattimer R., **Mass Spectrometry of Polymers**, CRC Press, USA, 2-36, 41-103, 419-500, 2002
9. Skoog D., Holler J., Nieman T., **Principios de análisis instrumental**, 5ª ed., McGraw Hill, España, 729-830, 2001.
10. Neue U. D., **HPLC Columns: Theory, Technology and Practice**, Wiley-VCH, USA, 140-162, 1997.
11. Kohler M., Haerdi W., Christen P., Veuthey J.-L., **The evaporative light scattering detector: some applications in pharmaceutical analysis**, Trends in Analytical Chemistry, 16: 475-484, 1997.
12. Hummel D., **Handbook of surfactants analysis: Chemical, physic-chemical and physical methods**, John Wiley & Sons LTD, USA, 1-10, 81-170, 2000.
13. **Anuario estadístico de la industria petroquímica**, 1ª edición, Secretaria de Energía, México, 2005.
14. Cross J., **Nonionic Surfactants Chemical Analysis**, Surfactants Series, Vol. 19, USA, 1987.
15. Schick M., **Nonionic surfactants**, Surfactants Science Series, Vol. 1, USA, 1966.

16. Kroschwitz J. I., **Concise encyclopedia of polymer science and engineering**, John Wiley & Sons, USA, 337-349, 830, 1990.
17. Lee Y.H., Jeong E.S., Cho H.E., Moon D.-C., **Separation and determination of polyethylene glycol fatty acid esters in cosmetics by a reversed-phase HPLC/ELSD**, *Talanta*, 74: 1615-1620, 2008.
18. Kibbey T.C.G., Yavaraski T.P., Hayes K.F., **High-performance liquid chromatographic analysis of polydisperse ethoxylated non-ionic surfactants in aqueous samples**, *Journal of Chromatography A*, 752: 155-165, 1996.
19. Park H.S., Rhee C.K., **Simultaneous determination of nonionic and anionic industrial surfactants by liquid chromatography combined with evaporative light-scattering detection**, *Journal of Chromatography A*, 1046: 289-291, 2004.
20. Kiewiet A.T., van der Steen J.M.D., Parsons J.R., **Trace analysis of ethoxylated nonionic surfactants in samples of influent and effluent of sewage treatment plants by high-performance liquid chromatography**, *Analytical Chemistry*, 67: 4409-4415, 1995.
21. Balcan M., Anghel D.F., **Thermodynamic properties of polyethoxylated nonylphenols by reversed-phase high-performance liquid chromatography**, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 221: 1-8, 2003.
22. Eadsforth C.V., Sherren A.J., Selby M.A., Toy R., Eckhoff W.S., McAvoy D.C., Matthijs E., **Monitoring of environmental fingerprints of alcohol ethoxylates in Europe and Canada**, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 14-29, 2006.
23. Portet F.I., Treiner C., Desbène P.L., **Simultaneous quantitative trace analysis of anionic and nonionic surfactant mixtures by reversed-phase liquid chromatography**, *Journal of Chromatography A*, 878: 99-113, 2000.
24. Arand R., Burk R.C., **Determination of a non-ionic surfactant by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography and on-line derivatization**, *Journal of Chromatography A*, 828: 401-406, 1998.
25. Levine L.H., Garland J.L., Johnson J.V., **Simultaneous quantification of poly-dispersed anionic, amphoteric and nonionic surfactants in simulated wastewater-quadrupole ion-trap mass spectrometry**, *Journal of Chromatography A*, 1062: 217-225, 2005.
26. Takino M., Daishima S., Yamaguchi K., **Determination of nonylphenol ethoxilate oligomers by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry in river water and non-ionic surfactants**, *Journal of Chromatography A*, 904: 65-72, 2000.
27. Sparham C.J., Bromilow I.D., Dean J.R., **SPE/LC/ESI/MS with phthalic anhydride derivatization for the determination of alcohol ethoxylate surfactants in sewage influent and effluent samples**, *Journal of Chromatography A*, 1062: 39-47, 2005.

-
28. Kamiyuki T., Monde T., Nemoto F., Konakahara T., Takahashi Y., **Separation and characterization of octylphenol ethoxylate surfactants used by reversed-phase high-performance liquid chromatography on branched fluorinated silica gel columns**, Journal of Chromatography A, 852: 475-485, 1999.
 29. Jandera P., Holčapek M., Theodoridis G., **Investigation of chromatographic behavior of ethoxylated alcohol surfactants in normal-phase and reversed-phase systems using high-performance liquid chromatography - mass spectrometry**, Journal of Chromatography A, 813: 299-311, 1998.
 30. Lemr K., Ševčík J., Hlaváč J., **Retention of 3,5-dinitrobenzoyl derivatives of linear alcohol polyethoxylates in reversed-phase liquid chromatographic system with acetonitrile-water mobile phase**, Journal of Chromatography A, 1021: 19-24, 2003.
 31. Morrall S.W., Dunphy J.C., Cano M.L., Evans A., McAvoy D.C., Price B.P., Eckhoff W.S., **Removal and environmental exposure of alcohol ethoxylates in US sewage treatment**, Ecotoxicology and Environmental Safety, 64: 3-13, 2006.
 32. Héberger K., **Quantitative structure-(chromatographic) retention relationships**, Journal of Chromatography A, 1158: 273-305, 2007.
 33. Montgomery D., **Diseño y análisis de experimentos**, Limusa Wiley, 2ª edición, México, 1-125, 170-286, 2008.
 34. Gritti F., Guiochon G., **Critical contribution of nonlinear chromatography to the understanding of retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography**, Journal of Chromatography A, 1099: 1-42, 2005.
 35. Thrathnigg B., Veronik M., **A thermodynamic study of retention of poly (ethylene glycol)s in liquid adsorption chromatography on reversed phases**, Journal of Chromatography A, 1091: 110-117, 2005.
 36. Cho D., Park S., Hong J., Chang T., **Retention mechanism of poly(ethylene oxide) in reversed-phase and normal-phase liquid chromatography**, Journal of Chromatography A, 986: 191-198, 2003.
 37. Cho D., Hong J., Park S., Chang T., **Retention mechanism of fatty alcohol ethoxylates in reversed-phase liquid chromatography**, Journal of Chromatography A, 986: 199-206, 2003.
 38. Gritti F., Guiochon G., **Effect of the flowrate on the measurement of adsorption data by dynamic frontal analysis**, Journal of Chromatography A, 1069: 31-42, 2005.
 39. Guiochon G., Sepaniak M.J., **Influence of pressure on solute retention in liquid chromatography**, Journal of Chromatography A, 606: 248-250, 1992.
-

40. Spitzer M., Sabadini E., Loh W., **Entropically driven partition of ethylene oxide oligomers and polymers in aqueous/organic biphasic systems**, Journal of Physical Chemistry B, 106: 12448-12452, 2002.