



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

Separación enantiomérica de azoles quirales por cromatografía de fluidos supercríticos con columnas derivadas de polisacáridos

Autora: Irene Magdaleno de la Fuente

Tutora: Laura Toribio Recio

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	13
4. EXPERIMENTAL.....	14
4.1. Equipo Cromatográfico	14
4.2. Material y reactivos.....	15
4.3. Compuestos.....	15
4.4. Columnas cromatográficas.....	16
5. RESULTADOS.....	17
5.1. Influencia de la fase estacionaria	17
5.2. Efecto del modificador orgánico	19
5.3. Efecto de la temperatura	26
5.4. Condiciones seleccionadas.....	36
6. PERSPECTIVAS DE CONTINUACIÓN DEL TRABAJO	39
7. CONCLUSIONES	40
8. BIBLIOGRAFÍA	42
9. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS Y DE ACRÓNIMOS.....	46
9.1. LISTADO DE ABREVIATURAS.....	46
9.2. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS.....	47

1. RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado la separación enantiomérica de cuatro fungicidas quirales: sulconazol, bifonazol, triadimefon y triadimenol, utilizando la Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC). Para ello, se ha investigado la influencia de la fase estacionaria, el tipo y porcentaje de modificador orgánico y la temperatura. Los tres modificadores orgánicos empleados fueron metanol, etanol y 2-propanol. Con la columna Chiralcel OD no se logró la separación enantioselectiva de ninguno de ellos. Por el contrario, con la columna Lux Cellulose2 se consiguieron muy buenas separaciones, obteniéndose enantiorresoluciones hasta línea de base para todos los fungicidas, con diferentes modificadores orgánicos en diferentes condiciones de temperatura. Finalmente, se seleccionaron las mejores condiciones para llevar a cabo la separación enantiomérica de cada uno de los compuestos.

ABSTRACT

The enantiomeric separation of four chiral fungicides (sulconazole, bifonazole, triadimefon and triadimenol) using Supercritical Fluid Chromatography has been studied in this work. For this purpose, the effect of stationary phase, type and percentage of organic modifier (methanol, ethanol and 2-propanol) and temperature was investigated. The Chiralcel OD column did not provide good enantioresolutions for any of the compounds studied. On the other hand, using the LuxCellulose2 column, baseline separations were successfully achieved for all the compounds, with different organic modifiers and temperatures conditions. Finally, the best conditions for enantiomeric separation were established.

2. INTRODUCCIÓN

Cromatografía de fluidos supercríticos

La cromatografía de fluidos supercríticos se caracteriza por emplear como fase móvil un fluido supercrítico; este tipo de fluido se obtiene cuando la temperatura y la presión del sistema supera los valores críticos. La figura 1 corresponde al diagrama de fases del CO₂, que es la fase móvil más utilizada en este tipo de cromatografía. Esto se debe a que presenta numerosas ventajas frente a otras fases móviles: no es excesivamente caro, no es tóxico ni inflamable, es compatible con el medioambiente, y sus condiciones supercríticas ($T_c = 31,3\text{ °C}$, $P_c = 7,39\text{ MPa}$) son relativamente fáciles de alcanzar [1].

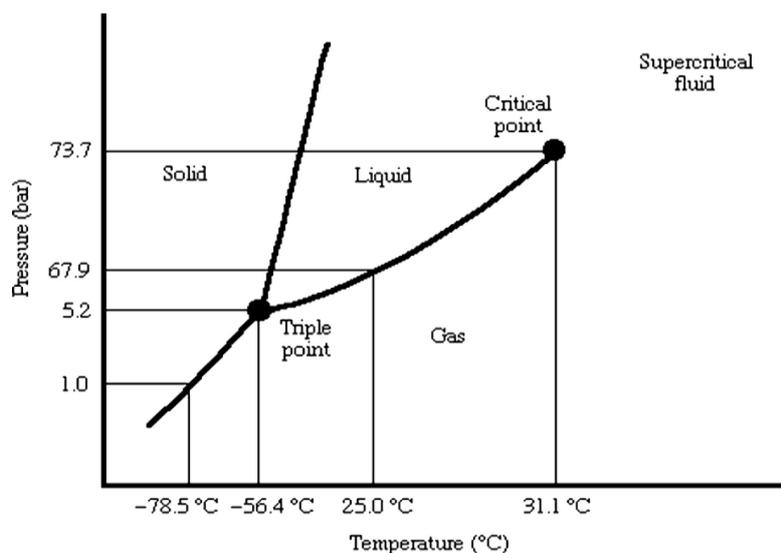


Figura 1. Diagrama de fases del CO₂

En condiciones supercríticas solamente existe una fase, cuyas propiedades son intermedias entre un líquido y un gas: en lo que se refiere a su semejanza con un líquido, posee una densidad mayor que un gas y que puede modificarse mediante variaciones de presión y temperatura; en su semejanza con un gas, posee baja viscosidad y es compresible. Además, el coeficiente de difusión de un soluto es de mayor orden que en líquidos, lo que supone una

ventaja para llevar a cabo la separación cromatográfica. Es habitual, al realizar este tipo de cromatografía, emplear temperaturas ligeramente inferiores y presiones ligeramente superiores a los valores críticos. En estas condiciones, el CO₂ se encuentra en estado subcrítico, pero mantiene las propiedades de fluido supercrítico deseadas [2].

Puesto que el CO₂ es apolar, no proporciona buenos resultados para la separación de compuestos polares. A menudo los compuestos quirales de interés son de este tipo, por lo que es necesario aumentar la fuerza de la fase móvil (hacerla más polar). Para ello, se añade una cantidad variable de un disolvente orgánico, conocido como modificador. Si bien esto altera las condiciones críticas del fluido y podría llegar a producirse una separación entre las fases líquida y gaseosa, en la práctica rara vez ocurre. Algunos de los modificadores más habituales son metanol y otros alcoholes, aunque también se utiliza acetonitrilo.

En caso de que, a pesar de añadir un modificador, la fase móvil no sea la bastante fuerte para separar adecuadamente los compuestos, se añade una pequeña cantidad (0,1 - 2%) de una sustancia muy polar, conocida como aditivo. Algunos ejemplos de aditivo son ácido trifluoroacético (TFA), trietilamina (TEA), y algunas aminas cíclicas [1].

Respecto a la instrumentación, la utilizada en SFC es muy similar a la de HPLC; las principales diferencias radican en las bombas y en la presencia un sistema de refrigeración de CO₂, previo al inyector, y de un regulador de presión a continuación del detector. Un esquema general de un equipo de SFC aparece representado en la Figura 2.

El sistema de enfriamiento de CO₂, específico de SFC, se sitúa justo antes del inyector para asegurar que todo el CO₂ que llega al equipo lo hace como líquido, a unos 4 – 5 °C. Esto es de gran importancia, pues cualquier variación en la presión o la temperatura puede ocasionar problemas con el flujo que se suministra a la columna.

En cuanto a las bombas de doble pistón, en general deben tener ratios de compresión (relación ente el volumen de la cámara con el pistón retraído y extendido) mayores que en HPLC, para poder soportar las temperaturas y presiones típicas de SFC.

El regulador de presión que se sitúa posterior a la columna, por su parte, se encarga de mantener la presión de trabajo (de hasta 300 bar) a lo largo del proceso de separación, para asegurar que el CO₂ permanezca en estado crítico o subcrítico durante el análisis [3]

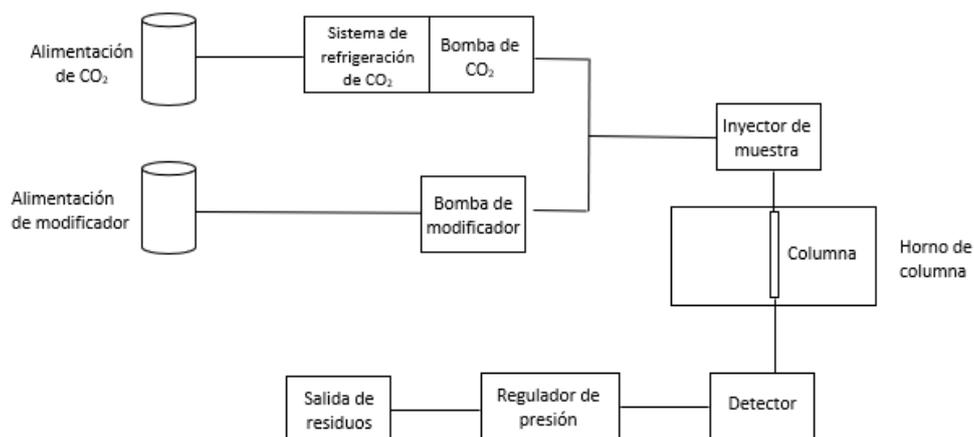


Figura 2. Esquema general de un equipo SFC

Separaciones quirales

En la actualidad, gran parte de las moléculas de interés presentan quiralidad. En el ámbito farmacéutico, por ejemplo, cada vez más compuestos se comercializan como un único enantiómero en lugar de como racemato, para obtener efectos óptimos; e incluso si se trata de una mezcla de enantiómeros, deben estudiarse extensamente las características de cada uno de ellos por separado para asegurar que no son perjudiciales para la salud, especialmente tras la crisis de la talidomida (1957-1961). Por este motivo, la separación cromatográfica de compuestos quirales ha cobrado, en los últimos años, gran relevancia en numerosos campos, como el análisis farmacéutico, forense, medioambiental y nutricional. Estas separaciones se realizan mediante HPLC, GC, o SFC. Esta última técnica ha experimentado, desde 1985, un notable crecimiento, convirtiéndose en la técnica elegida por cada vez más industrias. [1, 4]

El principal obstáculo a la hora de separar pares de enantiómeros es que ambos poseen las mismas propiedades en entornos no quirales. Para diferenciarlos y poder llevar a cabo la separación, es necesario un selector quiral, con el que uno de los enantiómeros forma un complejo diastereomérico lábil. El selector quiral es capaz de discriminar entre pares de enantiómeros, estableciendo con uno de ellos más puntos de interacción (tres,

concretamente) que con el otro (dos como máximo). Este “modelos de interacción de tres puntos” fue utilizado en el desarrollo de las primeras fases estacionarias quirales (CSPs, por sus siglas en inglés), y se utiliza para racionalizar los mecanismos de interacción.

El complejo diastereomérico mencionado anteriormente está implicado en todas las separaciones quirales. Las interacciones moleculares establecidas entre el enantiómero y el selector quiral pueden ser de numerosos tipos, como por ejemplo: fuerzas de Coulomb, enlaces de hidrógeno, interacciones estéricas, interacciones π - π , ion-dipolo, dipolo-dipolo, fuerzas de Van der Waals... Estas interacciones intermoleculares son responsables de pequeñas variaciones en las constantes de enlace entre el enantiómero y el selector quiral; por tanto, un conocimiento preciso de los mecanismos de reconocimiento permitiría predecir qué selector (fase estacionaria) es el más adecuado para cada compuesto quiral. Estos estudios son complejos, pues a veces no se conoce completamente la estructura de macromoléculas muy derivatizadas, y solamente se pueden explicar las interacciones enantiómero - fase estacionaria a posteriori, con lo que pierde su carácter predictivo.

Existen numerosos métodos para estudiar los mecanismos de interacción entre los enantiómeros y el selector quiral: desde espectroscópicos, como por ejemplo dicroísmo circular (que evalúa las propiedades del complejo selector-enantiómero), hasta computacionales, pasando por métodos de separación (cromatografía y electroforesis) [4].

Fases estacionarias quirales

Como se ha comentado anteriormente, para llevar a cabo las separaciones enantioméricas mediante cromatografía se utilizan fases estacionarias quirales (CSPs). Tanto en cromatografía de líquidos (LC) como en SFC se utilizan las mismas columnas, y a lo largo de los años se ha desarrollado una gran variedad de ellas, que pueden clasificarse en los siguientes tipos:

- Ciclodextrinas:

Las ciclodextrinas son polímeros de glucosa cíclicos. En función del número de unidades de glucosa que contienen, se clasifican en ciclodextrinas alfa (seis unidades de glucosa), beta (siete unidades) o gamma (8 unidades). Poseen en su estructura una

cavidad central hidrofóbica, rodeada por un anillo hidrofílico constituido por grupos hidroxilo [5].

En cromatografía de líquidos, se cree que el mecanismo de reconocimiento quiral implica la formación de un complejo entre el analito y la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina. No son muy utilizadas en SFC, y no se conoce el mecanismo de reconocimiento quiral que actúa en este caso [1].

- De tipo Pirkle o brush-type:

Este tipo de fases estacionarias está constituido por moléculas orgánicas pequeñas unidas covalentemente a un soporte inerte, y son ampliamente utilizadas en el estudio de los mecanismos de reconocimiento quiral (que en este caso consisten en una combinación de interacciones entre el selector quiral y los analitos, especialmente enlaces de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, fuerzas de Van der Waals e interacciones aromáticas [6, 7].

Se utilizan tanto para separaciones por LC (generalmente, en fase normal) como por SFC (su número ha aumentado en los últimos años). Diferentes estudios revelaron que la enantioselectividad obtenida al llevar a cabo la separación por LC o por SFC era similar, pero la resolución en este último caso fue mayor [1, 8].

- Antibióticos macrocíclicos:

Es un tipo de fase estacionaria bastante reciente, que permite trabajar en condiciones orgánicas polares, de fase normal o de fase inversa. Se caracterizan por poseer numerosos grupos funcionales que pueden interactuar con el analito. Al utilizar este tipo de columnas en separaciones mediante SFC, se ha observado una elevada retención, siendo necesario utilizar porcentajes elevados (del 40%) de modificador orgánico. Algunas fases estacionarias de este tipo proporcionan muy buenos resultados en las separaciones de aminoácidos [4].

- Polisacáridos:

Las columnas utilizadas en este trabajo pertenecen a este grupo. Se desarrollaron a finales de los años 80, y actualmente son las fases estacionarias más utilizadas en separaciones por SFC (concretamente, los fenilcarbamatos de celulosa y amilosa, que presentan una mejor selectividad respecto a los polisacáridos no sustituidos). El estudio de los mecanismos de reconocimiento quiral es mucho más complejo que en las fases estacionarias constituidas por moléculas pequeñas, debido a la gran variedad de sitios activos capaces de interactuar con los analitos. Se cree que las interacciones π - π entre los analitos y los grupos fenilcarbamato juegan un papel importante en el mecanismo de reconocimiento quiral [4].

La hipótesis acerca del mecanismo responsable de la selectividad quiral es que los analitos establecen enlaces de hidrógeno con los grupos carbamato, situados en las cadenas laterales y en la base del polisacárido. Por lo tanto, esta interacción se produce tanto en el interior de la estructura helicoidal como en las cadenas laterales que rodean esta estructura central. La selectividad depende del número de enlaces de hidrógeno que se establecen y del impedimento estérico para formarlos, y cualquier alteración en la estructura helicoidal del polisacárido modificará las interacciones y, con ello, la selectividad. Puesto que la celulosa y la amilosa pueden adoptar diferentes estructuras helicoidales, los sustituyentes en las cadenas laterales pueden alterar la conformación de la hélice, y el modificador orgánico, a su vez, puede cambiar la orientación de las cadenas laterales, las diferentes combinaciones de estos factores hacen que este tipo de fases estacionarias tengan un campo de aplicación muy amplio. Entre las más versátiles, cabe destacar la columna Chiralpack AD (constituida por amilosa tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) depositada sobre sílice), seguida por la columna Chiralcel OD (una de las utilizadas en este trabajo, que se comentará más adelante) [1].

Compuestos estudiados

En este trabajo se estudiarán las condiciones óptimas de separación por SFC de una serie de compuestos quirales.

Los compuestos seleccionados (sulconazol, bifonazol, triadimefon y triadimenol) son antifúngicos con uno o más centros quirales, y comparten un mismo mecanismo de actuación: inhiben la síntesis de ergosterol vía citocromo P450. El ergosterol es un componente fundamental de la membrana de los hongos, por lo que su deficiencia altera la permeabilidad de la membrana y el crecimiento celular, así como su capacidad de reproducción. Por otra parte, al no llevarse a cabo la síntesis de ergosterol, se produce una acumulación de compuestos que resultan tóxicos para la célula, y pueden conducir a la muerte celular [9].

Todos ellos son derivados de azol, y se utilizan como antifúngicos de uso médico (sulconazol y bifonazol), o como pesticidas (triadimefon y triadimenol); los dos primeros son derivados de imidazol, y los segundos incluyen en su estructura un anillo de triazol. A continuación, se comenta brevemente cada uno de ellos:

SULCONAZOL

Este derivado de imidazol se utiliza en el tratamiento de infecciones tópicas producidas por una amplia variedad de hongos. Se comercializa en forma de nitrato, como crema o solución de uso tópico [10, 11]. Tiene un único centro quiral.

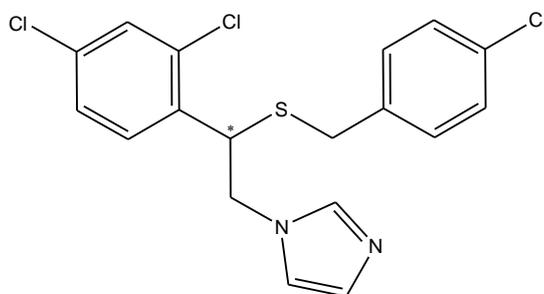


Figura 3. Estructura del Sulconazol

BIFONAZOL

Se trata de un antifúngico de uso cutáneo de amplio espectro, con actividad frente a una gran variedad de microorganismos como dermatofitos, mohos o levaduras [12, 13]. Como en el caso anterior, es un derivado de imidazol con solamente un centro quiral, tal y como puede verse en la figura 4 [13].

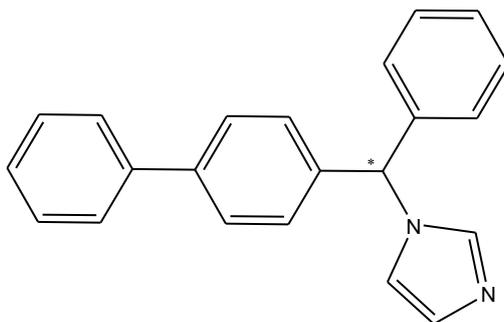


Figura 4. Estructura del Bifonazol

TRIADIMEFON

Los derivados de triazol, como el triadimefon, son ampliamente utilizados en la industria agroquímica como pesticidas, puesto que son activos frente a una gran variedad de hongos. La estructura de este compuesto (figura 5) incluye un único centro quiral [15, 16].

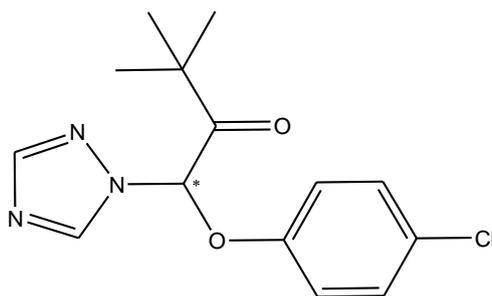


Figura 5. Estructura del Triadimefon

TRIADIMENOL

Se trata del producto de degradación del triadimefon, cuyo grupo cetona se reduce generando un nuevo estereocentro; posee, por lo tanto, dos centros quirales, según puede verse en la figura 6 [17]. Sus cuatro enantiómeros (diastereoisómeros dos a dos) presentan diferente grado de toxicidad frente a los hongos: los enantiómeros (1R, 2S) y (1S, 2R) son más activos que los (1R, 2R) y (1S, 2S) [18]. Concretamente, el isómero (1S, 2R) puede llegar a ser 1000 veces más activo que los otros tres [19]. Normalmente se comercializa como una mezcla de los 4 diastereoisómeros en diferentes proporciones [20].

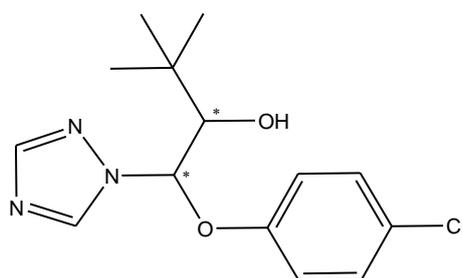


Figura 6. Estructura del Triadimenol

La separación enantioselectiva de estos fungicidas ha sido estudiada anteriormente, en muchos casos por HPLC, utilizando diferentes columnas quirales y con diferentes modificadores orgánicos [21-23]. Los estudios acerca de la separación de los compuestos mediante SFC son menos numerosos, aunque existen algunos; en la mayoría, la columna quiral utilizada es la Chiralpak AD (que, como se ha comentado antes, es la más versátil), y la fase móvil y las condiciones del análisis varían de unos casos a otros.

Para el sulconazol, existe un estudio [24] sobre la separación enantiomérica por SFC utilizando la columna quiral Chiralpak AD (3, 5-dimetilfenilcarbamato derivado de amilosa) a 35 °C y 200 bar, con diferentes porcentajes de los modificadores orgánicos metanol, etanol, 2-propanol y acetonitrilo. El flujo de fase móvil utilizado fue de 2 mL/min. Los mejores resultados se obtuvieron para el metanol (los tiempos de retención, en función del porcentaje utilizado, oscilaban entre los 13 y los 3 minutos, con buena resolución). Con acetonitrilo no se obtuvieron buenos resultados (la resolución obtenida era muy baja).

En otro trabajo [25], se estudió la separación enantiomérica del bifonazol por SFC con la misma columna, Chiralpak AD, a 40°C, utilizando como fase móvil 20% de EtOH con un 0,1% de DEA, y un flujo de 5 mL/min. El tiempo del análisis para la elución de los dos picos fue inferior a 6 minutos, y la resolución obtenida fue elevada (de 3,24).

También se ha estudiado la separación enantiomérica por SFC del triadimenol con la columna quiral P-CAP (un polímero de trans-1, 2-ciclohexanodiol-bis-acrilamida), a 31°C y 100 bar. La fase móvil utilizada fue 10% iPrOH (con un 0,2% de TFA como aditivo), con un flujo de 4 mL/min. El primer pico eluyó a los 3,94 minutos de análisis [26].

En otro estudio sobre la separación de triadimenol [19], se empleó la columna Chiralpak IA-3 (amilosa tris-(3, 5-dimetilfenilcarbamato), y los mejores resultados se obtuvieron a 30°C, con un flujo de fase móvil (14% de una mezcla 20/20/60 de MeOH/Acetonitrilo/iPrOH) de 2 mL/min).

La separación enantiomérica de triadimenol y triadimefon ha sido ampliamente estudiada, debido a su interés en el agricultura; puesto que el primero es el producto de reducción del segundo, en muchos casos se ha estudiado al separación conjunta. Un ejemplo de separación enantiomérica por SFC es [27]. Como fase estacionaria se utilizó de nuevo la columna Chiralpak AD, a 35°C y 200 bar. Como fase móvil se empleó un gradiente de etanol (que comenzaba con un 5% los dos primeros minutos, y a continuación una rampa de 1,8%/min hasta alcanzar un 25% de modificador), con un flujo de 2 mL/min). El tiempo total del análisis fue de 15,5 minutos, con resoluciones hasta línea de base (> 1,5).

3. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo de este trabajo es estudiar la separación enantiomérica mediante SFC de cuatro compuestos quirales: sulconazol, bifonazol, triadimefon y triadimenol.

Para ello, se estudiará el comportamiento de diferentes fases estacionarias quirales y el efecto que el tipo y porcentaje de modificador y la temperatura tienen sobre la separación enantiomérica de los compuestos antes mencionados. Finalmente, se seleccionarán las condiciones cromatográficas que proporcionen los mejores resultados.

4. EXPERIMENTAL

4.1. Equipo Cromatográfico

Tabla 1. Equipo cromatográfico

Soporte de botellas
Bottle Stand; BS-2000-04; Jasco, Japan
Bomba de suministro de modificador
Pu-2080 plus; Intelligent HPLC Pump; Serial No. C070860962; Jasco, Japan
Regulador de presión (Back Pressure Regulator)
BP-2080 plus: Automatic Back Pressure Regulator; Serial No. C070860962; Jasco, Japan
Restrictor
BP-1580-81; Back Pressure Regulator; Serial No. A001760773; Jasco, Japan
Bomba de suministro de CO₂
PU-2080-CO ₂ ; CO ₂ Delivery Pump; Serial No. A012161162; Jasco, Japan
Interfaz
LC-NetII/ADC; MAC Adress 00:CO;28:00:18:4f; Serial No. B212761095; Jasco, Japan
Horno de la columna
CO-2060 plus; Intelligent Column Thermostat; Serial No. B096660879; Jasco, Japan
Detector UV – VIS
md-2010plus; Multiwavelength Detector; Serial NO. D073160870; Jasco, Japan
Inyector de muestra
AS-2059-SF plus; Autosampler for SFC; Serial No. B00461061; Jasco, Japan

4.2. Material y reactivos

Tabla 2. Reactivos

METANOL (MeOH)
HiPerSoly CHROMANORM; Reag. Ph. Eur. For Gradiente Grade;, Francia
ETANOL (EtOH)
Panreac Applichem; Ethanol Absolute (UV-IR-HPLC); Barcelona, España
ISOPROPANOL (iPrOH)
Lab-Scan Analytical Science, 2,5L, HPLC; Gliwice, Poland
ÁCIDO TRIFLUOROACÉTICO (TFA)
Sigma Aldrich, calidad para análisis; Madrid, España
TRIETILAMINA (TEA)
Sigma Aldrich, calidad para análisis; Madrid, España
DIÓXIDO DE CARBONO
Carburos Metálicos premier X505; Líquido; Aranjuez, España

4.3. Compuestos

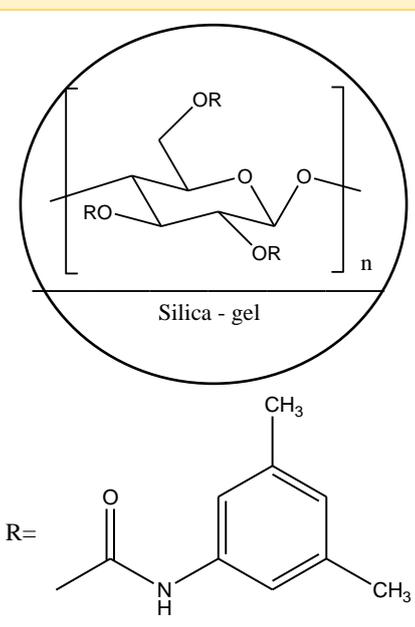
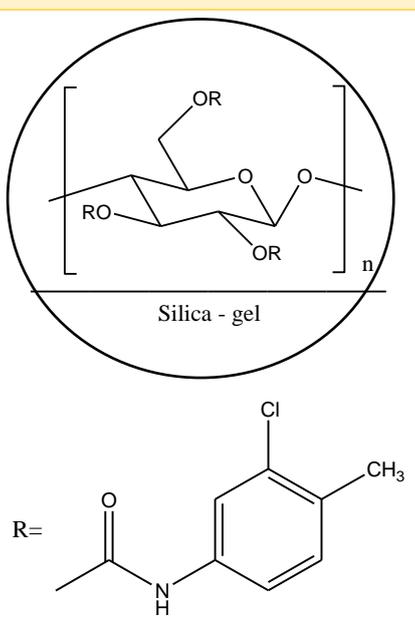
Tabla 3. Compuestos

SULCONAZOL
Sigma Aldrich, patrón en forma racémica; (Madrid, España)
BIFONAZOL
Sigma Aldrich, patrón en forma racémica; (Madrid, España)
TRIADIMEFON
Dr. Ehrenstorfer, patrón en forma racémica, (Augsburg, Germany)
TRIADIMENOL
Dr. Ehrenstorfer, patrón con predominancia del diastereoisómero threo, (Augsburg, Germany)

A partir de los patrones sólidos, se prepararon disoluciones con un nivel de concentración de 1,0 mg/mL.

4.4. Columnas cromatográficas

Tabla 4. Fases estacionarias

COLUMNA CHIRALCELL OD	
	ESTRUCTURA
<p>Casa comercial: Chiral Technologies</p> <p>Celulosa tris (3, 5 - dimetilfenilcarbamato) depositada sobre sílice</p> <p>Tamaño de partícula: 5 μm</p> <p>Dimensiones de la columna: 150 x 4,6mm</p>	 <p>Silica - gel</p>
COLUMNA LUX CELLULOSE 2	
	ESTRUCTURA
<p>Casa comercial: Phenomenex</p> <p>Celulosa tris (3 - cloro, 4 - metilfenilcarbamato) depositada sobre sílice</p> <p>Tamaño de partícula: 5 μm</p> <p>Dimensiones de la columna: 150 x 4,6 mm</p>	 <p>Silica - gel</p>

5. RESULTADOS

5.1. Influencia de la fase estacionaria

Como se ha comentado anteriormente, en este trabajo se han utilizado dos columnas con fases estacionarias diferentes: Chiralcel OD y Lux Cellulose 2. De acuerdo con la experiencia previa del grupo de investigación, inicialmente la temperatura de la columna se fijó en 35 °C, y la presión en 150 bar. El flujo de fase móvil establecido fue de 2 mL/min, y el volumen de muestra inyectado, 10 µL.

Los resultados obtenidos con las dos columnas fueron muy diferentes: mientras que con la columna Chiralcel OD no se logró la separación enantioselectiva de ninguno de los compuestos, con LuxCellulose 2 todos los compuestos se separaron, utilizando diferentes modificadores orgánicos en distintos porcentajes.

- **Columna Chiralcel OD**

Se analizaron los compuestos sulconazol, bifonazol y triadimenol en régimen isocrático de 20% de MeOH, pero en todos los casos se obtuvieron picos anchos con hombros.

El triadimenol fue analizado también en régimen de gradiente (5% durante 5 minutos, y a los 10 minutos 30% MeOH), pero se obtuvieron los mismos resultados.

Posteriormente, se estudió si la presencia de aditivos mejoraba la separación enantiomérica de los analitos. Se preparó una disolución de MeOH con un 0,1% TFA y 0,1% TEA, y se analizaron los compuestos sulconazol y bifonazol en régimen isocrático al 20%. La separación de los enantiómeros fue algo mayor (se apreciaban con mayor claridad los dos picos), pero la resolución entre ellos estaba muy alejada de la línea de base.

Se concluyó, por lo tanto, que la columna Chiralcel OD no era adecuada para la separación enantiomérica de los analitos estudiados, por lo que no se continuó trabajando con ella, y en el resto del trabajo solamente se comentarán los resultados obtenidos para la columna LuxCellulose 2.

- **Columna LuxCellulose 2**

Como ya se ha comentado anteriormente, los resultados para esta columna fueron muy satisfactorios, lográndose la separación enantiomérica de todos los compuestos.

El primer modificador orgánico utilizado fue metanol. Se analizaron todos los compuestos (sulconazol, bifonazol, triadimefon y triadimenol) en régimen de gradiente (5% hasta los 5 minutos, y una rampa de gradiente de 1,67 %/min hasta alcanzar un 30% de modificador a los 20 minutos) en las condiciones de temperatura, presión y flujo de fase móvil antes mencionadas; de este modo, pudo obtenerse una estimación del porcentaje de modificador necesario para la elución de cada compuesto, así como de su retención. A continuación, se seleccionó el rango de porcentaje de modificador que podría proporcionar los mejores resultados, y se analizó cada uno de los analitos con dichos porcentajes en régimen isocrático, con el fin de encontrar el porcentaje óptimo para cada separación.

Posteriormente, se estudió la separación de los compuestos con etanol y con isopropanol. En estos casos no se hizo un gradiente para estimar los tiempos de retención, sino que seleccionó directamente el intervalo de porcentajes de modificador a estudiar teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el metanol, y que la retención de estos modificadores sería mayor al ser menos polares (por lo tanto, podrían ser necesarios porcentajes mayores que para el metanol).

A continuación se comentarán los resultados obtenidos en el estudio con esta columna.

Hay que señalar que en la discusión de resultados se está suponiendo que el orden de elución del par enantiomérico no se modifica con el tipo de modificador, pero es algo que no se ha podido comprobar ya que no dio tiempo a utilizar el detector de dicroísmo circular debido a la emergencia sanitaria. Solo en el caso del triadimenol se pudo constatar un cambio en el orden de elución, debido a que los cuatro diastereoisómeros no se encontraban en la misma proporción en el patrón utilizado (en el que predominaba del diastereoisómero threo).

5.2. Efecto del modificador orgánico

En la columna LuxCellulose 2, los tres modificadores orgánicos utilizados son, como se ha comentado anteriormente, metanol, etanol e isopropanol. Estos tres alcoholes tienen polaridad decreciente según el orden (MeOH > EtOH > iPrOH), por lo que la retención de los compuestos será diferente (en principio, cuanto mayor sea la polaridad de la fase móvil, menor será el tiempo de retención de los analitos). Otra diferencia importante entre los tres modificadores orgánicos utilizados es la viscosidad, que aunque no influye directamente en la interacción del analito con la fase estacionaria sí que afecta al análisis, ya que cuanto más viscosa sea la fase móvil, mayor será la caída de presión en la columna; como trabajar con caídas de presión elevadas (superiores a unos 300 bar) puede dañar las válvulas y la columna, la viscosidad de la fase móvil limita el porcentaje de modificador orgánico que puede utilizarse (al aumentar el porcentaje de modificador, se incrementa la caída de presión). Por lo tanto, con isopropanol no se podrán alcanzar porcentajes de modificador orgánico tan elevados como con metanol, y los tiempos de retención serán mayores.

El estudio inicial se realizó a 35°C y 150 bar, con un flujo de fase móvil de 2 mL/min. El volumen de inyección fue de 10 µL.

En el caso del sulconazol, cuando se utilizó metanol los dos enantiómeros eluían juntos (se producía retención pero esta no es enantioselectiva). En la Tabla 5 se recogen los tiempos de retención y la resolución (R_s) obtenida para cada uno de los modificadores orgánicos y porcentajes utilizados.

Con el isopropanol solamente se realizó el estudio para un porcentaje del 30%, debido a que la caída de presión con este modificador fue mayor, y utilizar mayores porcentajes supondría una caída de presión demasiado elevada que dañaría la columna.

Como puede observarse, los mejores resultados para el sulconazol se obtuvieron utilizando etanol, con el que se obtuvieron enantiorresoluciones superiores a línea de base ($R_s > 1,5$). Con isopropanol también se logró resolver los enantiómeros, pero los tiempos de retención eran mucho más altos.

Tabla 5. Efecto del modificador orgánico en la separación enantiomérica de sulconazol. Condiciones cromatográficas: Temperatura 35 °C, presión 150 bar, flujo 2 mL/min

(*) Condiciones no estudiadas.

SULCONAZOL									
% Modificador	MeOH			EtOH			iPrOH		
	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)	Rs	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)	Rs	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)	Rs
20	(*)	(*)	(*)	31,77	34,88	1,89	(*)	(*)	(*)
30	15,20	15,20	0	14,23	15,63	1,73	20,92	27,55	4,74
35	(*)	(*)	(*)	11,09	12,09	1,64	(*)	(*)	(*)
40	9,05	9,05	0	9,04	9,84	1,58	(*)	(*)	(*)

Para analizar cómo varía el tiempo de retención de cada uno de los enantiómeros con el porcentaje de modificador orgánico, se representó dicho porcentaje frente al tiempo de retención (Gráfico 1).

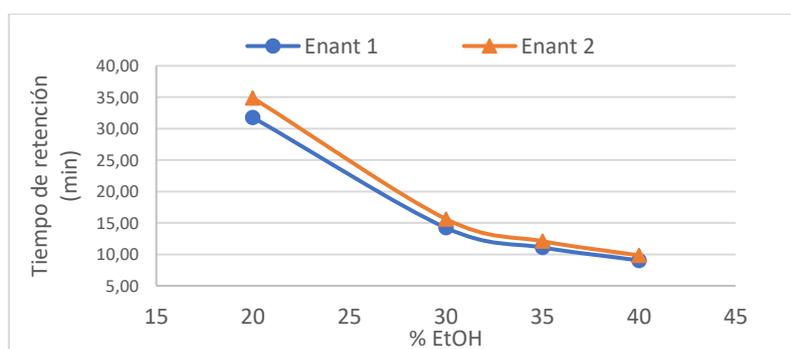


Gráfico 1. Variación de la retención de sulconazol con el porcentaje de EtOH

A la vista de la gráfica obtenida, la retención disminuyó de forma exponencial al aumentar el porcentaje de modificador orgánico, como consecuencia del aumento de la polaridad y la densidad de la fase móvil. La tendencia en la retención de ambos enantiómeros del sulconazol fue prácticamente la misma, y conforme se aumentó el porcentaje de modificador orgánico utilizado, la diferencia entre la retención de los enantiómeros disminuyó. Esto coincide con los datos de la tabla 5, donde la resolución entre los picos también disminuyó al aumentar el porcentaje de etanol, si bien hay que señalar que la disminución en la resolución fue menos marcada que la del tiempo de retención.

En el caso del bifonazol, se logró la separación enantiomérica con los tres modificadores orgánicos (Tabla 6) obteniéndose enantiorresoluciones bastante altas en todos los casos. Las mayores retenciones se obtuvieron con isopropanol. Hay que señalar que cuando el porcentaje era igual o inferior a 20%, el metanol proporcionó retenciones más bajas que el etanol, pero este orden se invirtió cuando se utilizaron porcentajes mayores del 20%. También hay que decir que el metanol proporcionó mejores formas de pico (con etanol, y sobre todo con isopropanol, la simetría de los picos empeoraba), y considerando un mismo porcentaje, las mayores resoluciones.

Tabla 6. Efecto del modificador orgánico en la separación enantiomérica de bifonazol. Condiciones cromatográficas: Temperatura 35 °C, presión 150 bar, flujo 2 mL/min

(*) Condiciones no estudiadas.

BIFONAZOL									
% Modificador	MeOH			EtOH			iPrOH		
	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)	Rs	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)	Rs	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)	Rs
15	15,08	22,03	8,87	21,79	31,07	4,82	(*)	(*)	(*)
20	12,16	16,45	5,45	13,17	18,21	4,52	18,84	26,44	5,19
25	9,07	12,00	5,18	8,69	11,72	4,26	(*)	(*)	(*)
30	7,13	9,25	5,29	6,69	8,91	4,43	8,85	11,89	4,43
35	(*)	(*)	(*)	5,27	6,79	4,19	(*)	(*)	(*)

Las siguientes gráficas muestran cómo varía el tiempo de retención de los enantiómeros de bifonazol al modificar los porcentajes de modificador orgánico (puesto que para el isopropanol solamente se estudiaron dos porcentajes de modificador, no pudo analizarse la variación del tiempo de retención).

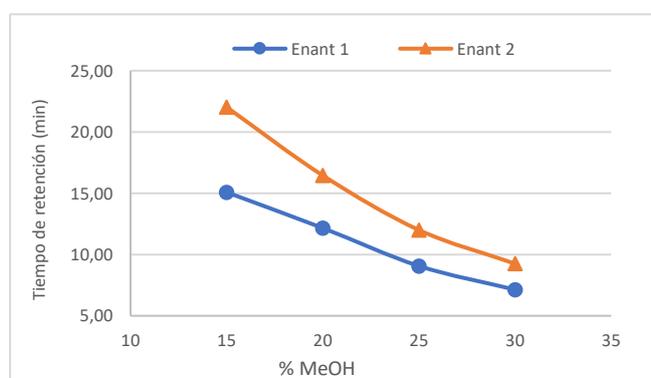


Gráfico 3. Variación de la retención de bifonazol con el porcentaje de MeOH

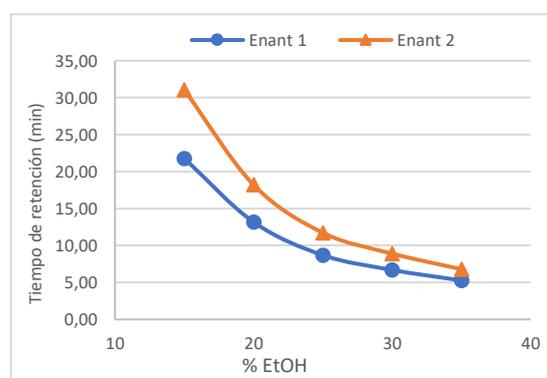


Gráfico 2. Variación de la retención de bifonazol con el porcentaje de EtOH

Al utilizar metanol, la variación de la retención parece más lineal que al utilizar etanol, donde la disminución en la retención parece seguir una tendencia más exponencial.

Al aumentar el porcentaje de modificador, la enantiorresolución disminuyó ligeramente.

Para triadimefon y triadimenol, por su relación analito - producto de degradación, se estudió el mismo rango de porcentajes de modificador orgánico. La separación del triadimenol fue más compleja, debido a que son cuatro los enantiómeros a separar.

El triadimefon mostró una baja retención en la columna Lux Cellulose 2, pero esto no impidió obtener enantiorresoluciones superiores a la línea de base. Para todos los modificadores orgánicos se obtuvieron buenas enantiorresoluciones en cortos tiempos de análisis, en muchos casos inferiores a 4 minutos, como puede observarse en la Tabla 7.

Tabla 7. Efecto del modificador orgánico en la separación enantiomérica de triadimefon. Condiciones cromatográficas: Temperatura 35 °C, presión 150 bar, flujo 2 mL/min

(*) Condiciones no estudiadas.

TRIADIMEFON									
	MeOH			EtOH			iPrOH		
% Modificador	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)	Rs	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)	Rs	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)	Rs
5	5,25	6,12	3,61	5,49	6,60	3,89	(*)	(*)	(*)
8	3,93	4,41	2,91	3,72	4,17	2,88	4,29	4,85	2,80
10	3,25	3,63	2,71	3,23	3,60	2,69	3,59	3,99	2,69
15	3,33	3,68	1,60	2,64	2,88	2,21	2,69	2,91	2,03
20	2,40	2,57	1,92	2,45	2,61	1,63	2,31	2,44	1,45
25	2,24	2,37	1,60	2,20	2,32	1,28	(*)	(*)	(*)

Como en los casos anteriores, a medida que aumentó el porcentaje de modificador se produjo un descenso marcado en la retención, con una tendencia exponencial, mientras que la disminución de la enantiorresolución fue más pequeña.

Por último, en la tabla 8 se recogen los resultados correspondientes al triadimenol.

En los analitos anteriores, los picos proporcionados por cada uno de los enantiómeros eran de tamaños similares puesto que eran mezclas racémicas, por lo que no podía determinarse si al cambiar de modificador orgánico, el orden de elución variaba (de ahí el interés de repetir los análisis con un detector de dicroísmo circular, como se planeaba realizar en un principio); sin embargo, en los cromatogramas del triadimenol existen diferencias en los tamaños de los picos: hay dos picos más pequeños y dos más grandes, debido a que en el patrón disponible predominaba el diastereoisómero threo. Esto ha permitido observar que, al cambiar el modificador orgánico, el orden de elución de los diastereoisómeros ha cambiado, tal y como se aprecia en los cromatogramas de las figuras 7 y 8, si bien dentro de cada diastereoisómero no se puede saber cuál es el orden de elución de los enantiómeros. En las figuras se han incluido los nombres dados a cada uno de los picos (1G, 2G, 1P y 2P) para identificarlos por su tamaño y orden de elución (se ha supuesto que cada uno de ellos corresponde a un mismo enantiómero con todos los modificadores orgánicos; por ejemplo, el enantiómero que proporciona el pico 2G es el mismo en todos los casos).

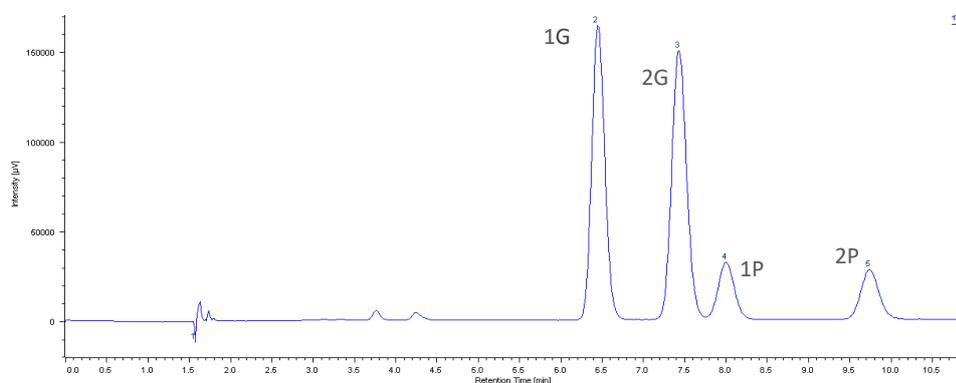


Figura 7. Cromatograma de la separación de triadimenol. Condiciones: 8% MeOH, 35 °C, 150 bar, 2mL/min

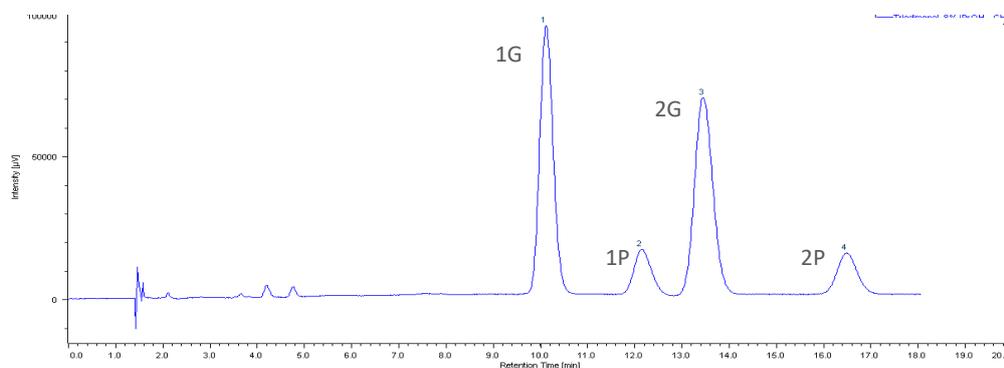


Figura 8. Cromatograma de la separación de triadimenol. Condiciones: 8% iPrOH, 35 °C, 150 bar, 2mL/min

Como se observa en la tabla 8, los peores resultados se obtuvieron con etanol, ya que no se logró resolver los cuatro enantiómeros: a porcentajes bajos los enantiómeros 2 y 3 coelúan, mientras que a porcentajes más altos los enantiómeros 3 y 4 no llegan a resolverse hasta línea de base. En cambio, utilizando metanol o isopropanol fue posible separar los cuatro enantiómeros con resoluciones superiores a la línea de base ($R_s > 1,5$).

Tabla 8. Efecto del modificador orgánico en la separación enantiomérica de triadimenol.

Condiciones cromatográficas: Temperatura 35 °C, presión 150 bar, flujo 2 mL/min

TRIADIMENOL							
MeOH							
% Modificador	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)	tr ₃ (min)	tr ₄ (min)	Rs ₁₋₂	Rs ₂₋₃	Rs ₃₋₄
5,00	12,61	15,29	16,81	21,35	4,21	2,08	5,28
8,00	6,44	7,43	8,00	9,73	3,16	1,67	4,62
10,00	4,79	5,43	5,73	7,00	2,74	1,26	4,50
15,00	4,11	4,44	4,44	4,99	1,94	0,00	3,23
20,00	2,81	3,05	3,05	3,49	1,90	0,00	3,14
25,00	2,45	2,63	2,63	2,91	1,68	0,00	2,48
EtOH							
% Modificador	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)	tr ₃ (min)	tr ₄ (min)	Rs ₁₋₂	Rs ₂₋₃	Rs ₃₋₄
5,00	13,05	19,29	19,29	24,83	7,41	0,00	5,00
8,00	6,69	8,56	8,56	10,45	6,21	0,00	4,97
10,00	4,88	6,39	6,39	7,84	5,46	0,00	4,19
15,00	3,32	3,81	3,93	4,49	4,16	0,92	3,29
20,00	2,72	3,00	3,13	3,43	2,62	1,21	2,33
25,00	2,32	2,48	2,59	2,77	1,75	1,13	1,71
30,00	2,09	2,21	2,32	2,45	1,44	1,30	1,40
iPrOH							
% Modificador	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)	tr ₃ (min)	tr ₄ (min)	Rs ₁₋₂	Rs ₂₋₃	Rs ₃₋₄
8,00	10,11	12,13	13,44	16,47	3,37	1,87	4,06
10,00	7,16	8,32	8,97	10,80	3,04	1,55	3,85
15,00	4,17	4,59	4,99	5,72	2,23	1,98	3,22
20,00	3,05	3,24	3,55	3,91	1,32	2,01	2,09

Como en los casos anteriores, se ha representado gráficamente la variación del tiempo de retención con el porcentaje de modificador.

La tendencia entre metanol y etanol fue muy similar: una disminución muy pronunciada en los tiempos de retención al aumentar el porcentaje de modificador cuando se trabajó a

porcentajes bajos, que se suavizó conforme la proporción de modificador en la fase móvil aumentó.

Con isopropanol, tal y como ocurría en el triadimefón, la disminución no fue tan pronunciada.

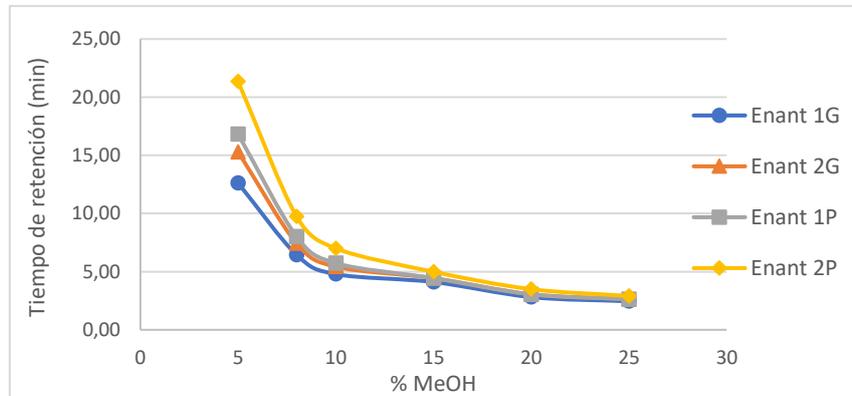


Gráfico 4. Variación de la retención de triadimenol con el porcentaje de MeOH

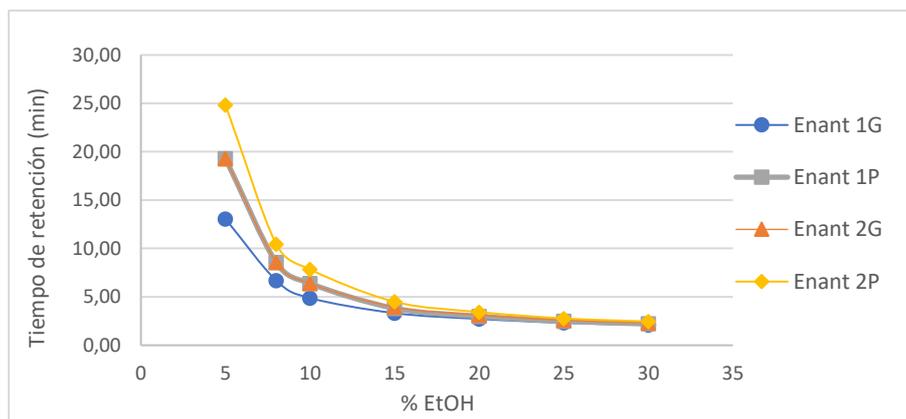


Gráfico 5. Variación de la retención de triadimenol con el porcentaje de EtOH

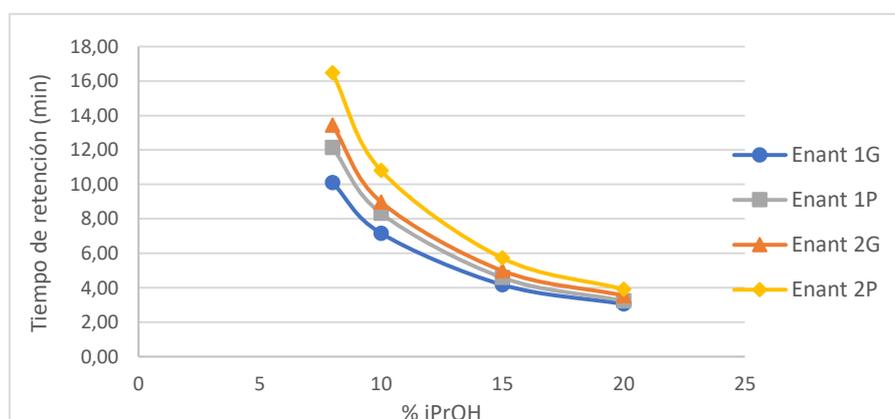


Gráfico 6. Variación de la retención de triadimenol con el porcentaje de iPrOH

5.3. Efecto de la temperatura

La temperatura es un parámetro muy importante en el control de las separaciones quirales, ya que un cambio en la misma puede afectar tanto a la retención como a la selectividad, por lo que también se verá afectada la enantiorresolución [1, 24].

Cuando se trabaja a presión constante, un aumento en la temperatura de un fluido binario produce una disminución en la densidad, pero su efecto en la retención es controvertido en SFC, de forma que no siempre se traduce en un aumento o una disminución de la retención: en algunos casos, un aumento de la temperatura produce una disminución de la retención, pero en otros conduce a un aumento, o incluso no tiene un efecto muy significativo sobre la retención [2, 24].

Por este motivo, es muy importante seleccionar la temperatura más adecuada para realizar las separaciones cromatográficas, alcanzando un compromiso entre tiempo del análisis y selectividad.

La selectividad (α) de una separación cromatográfica se determina como:

Ecuación 1. Selectividad

$$\alpha = \frac{t_{r2} - t_0}{t_{r1} - t_0}$$

Donde t_{r1} y t_{r2} son los tiempos de retención de dos picos consecutivos, y t_0 el tiempo muerto (que se define como el tiempo transcurrido entre la inyección y la elución del pico correspondiente a un compuesto no retenido).

Esta selectividad puede relacionarse con la temperatura del análisis (T) a través de la ecuación de Van't Hoff:

Ecuación 2. Ecuación de Van't Hoff en función de la selectividad

$$\ln \alpha = -\frac{1}{T} \left(\frac{\Delta\Delta H^\circ}{R} \right) + \left(\frac{\Delta\Delta S^\circ}{R} \right)$$

Donde R es la constante de los gases ideales (que tiene un valor de 8,31 J/Kelvin·mol), y $\Delta\Delta H^\circ$ y $\Delta\Delta S^\circ$ son las diferencias entre las variaciones de entalpía y de entropía de interacción de los enantiómeros con la fase estacionaria y la fase móvil.

Otra forma de expresar esta ecuación es a través del logaritmo neperiano del factor de retención k, que viene dado por:

Ecuación 3. Factor de retención

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

Donde t_r es el tiempo de retención, y t_0 es el tiempo muerto.

La ecuación de Van't Hoff en función del neperiano de k es:

Ecuación 4. Ecuación de Van't Hoff en función del factor de retención

$$\ln k = -\frac{1}{T} \left(\frac{\Delta\Delta H^\circ}{R} \right) + \left(\frac{\Delta\Delta S^\circ}{R} \right) + \ln \Phi$$

Donde Φ es la relación de fases, que en este caso es igual a 1.

Así, la retención y la selectividad de la separación cromatográfica están afectadas por dos términos diferentes: el término entálpico, que disminuye conforme aumenta la temperatura, y el entrópico, que es independiente de la misma. La representación gráfica del logaritmo neperiano de la selectividad α frente al inverso de la temperatura $1/T$ es lineal cuando $\Delta\Delta H^\circ$ y $\Delta\Delta S^\circ$ son independientes de la temperatura.

Mediante la ecuación de Van't Hoff puede determinarse también la temperatura de isoelución, que es la temperatura para la cual la selectividad α es igual a 1 (o el logaritmo neperiano es 0). Por lo tanto, coincide con el punto de corte de la recta con el eje x (en realidad, el inverso de dicho punto). Se define como la temperatura a la cual el par de enantiómeros coeluyen; sobrepasada esta temperatura volvería a haber separación entre los enantiómeros, pero se produciría una inversión en el orden de elución, es decir, en la selectividad.

La presión, por su parte, tiene menor efecto en la separación [1, 24, 28], por lo que en este trabajo todos los análisis se han llevado a cabo a 150 bar, cuidando que la caída de presión se mantuviera en unos valores razonables (entre 170 y 190 bar en todos los casos.)

Para cada uno de los compuestos, con cada modificador orgánico, se seleccionó el porcentaje de modificador que proporcionaba los mejores resultados (teniendo en cuenta el tiempo de retención, la resolución y el consumo de disolvente), y se repitió el análisis a diferentes temperaturas: 20, 25, 30 y 35°C (los datos correspondientes a esta última temperatura son los obtenidos en los análisis anteriores). El flujo de fase móvil se mantuvo en 2 mL/min, y el volumen de inyección en 10 µL. Las tablas 9 a 12 recogen los resultados obtenidos con cada modificador orgánico.

Con sulconazol, tal y como se había comentado en el apartado anterior, no fue posible la separación enantiomérica con metanol, y con isopropanol no dio tiempo a completar los análisis para toda la serie de temperaturas. A la vista de los datos de la Tabla 9, la retención tiene tendencia a disminuir conforme aumenta la temperatura.

En su caso, solamente la representación de $\ln k$ frente a $1/T$ pudo ajustarse a una recta (Gráfico 8), y sólo con los resultados obtenidos utilizando etanol. De la intersección se obtuvo una temperatura de isoelución que resultó ser -149,2°C. Puesto que la temperatura de isoelución se encuentra por debajo de las temperaturas de trabajo, el mecanismo de separación es de control entrópico, y a medida que aumente la temperatura la selectividad aumentaría. En los resultados mostrados en la tabla 9 realmente no se observa el aumento de la selectividad, es más bien constante, lo cual puede ser debido a que el intervalo de temperaturas de trabajo se encuentra muy alejado del punto de isoelución; en esta zona de trabajo ambas líneas son casi paralelas, y por lo tanto la variación en la selectividad es muy pequeña, prácticamente nula.

Tabla 9. Influencia de la temperatura en la separación enantiomérica de sulconazol. Condiciones cromatográficas: presión 150 bar, flujo 2 mL/min

(*) Condiciones no estudiadas.

SULCONAZOL					
	Temperatura (°C)	k ₁	k ₂	α	Rs
EtOH 40%	20	6,264	6,901	1,10	1,41
	25	6,185	6,806	1,10	1,51
	30	5,727	6,325	1,10	1,50
	35	5,518	6,094	1,10	1,58
iPrOH 30%	20	(*)	(*)	(*)	(*)
	25	(*)	(*)	(*)	(*)
	30	14,48	19,99	1,38	4,20
	35	14,38	19,26	1,34	4,74

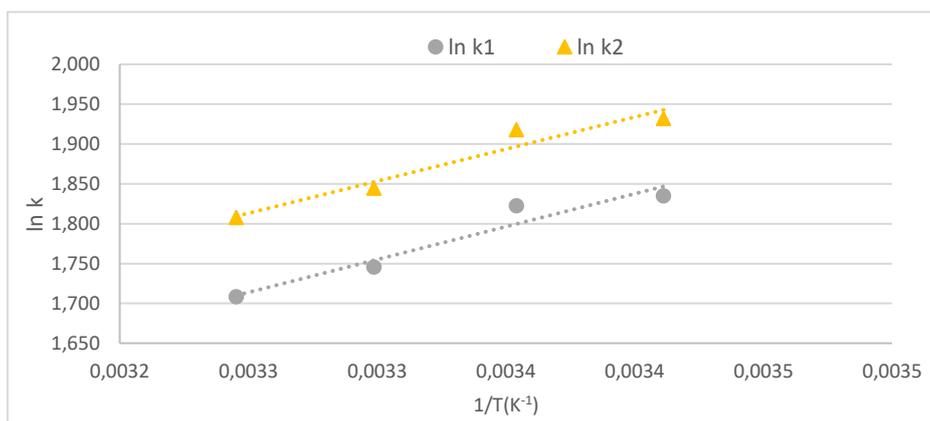


Gráfico 7. Representación de ln k - Sulconazol - 40% EtOH

Tabla 10. Parámetros termodinámicos y temperatura de isoelución para el sulconazol

$\Delta\Delta H^\circ$ (J/mol)	$\Delta\Delta S^\circ$ (J/K·mol)	T isoelución (°C)
-171,1	1,4	-149,2

En el caso del bifonazol (Tabla 11) tampoco fue posible completar la secuencia de temperaturas con el isopropanol. Con el metanol, la simetría de los picos mejoró al disminuir la temperatura. Como puede observarse en los datos mostrados, para todos los modificadores estudiados la retención disminuyó al aumentar la temperatura, pero ni el factor de selectividad ni la resolución mostraron una tendencia clara. Las representaciones del $\ln \alpha$ y $\ln k$ frente al inverso de la temperatura no fueron lineales en ningún caso, lo que puede ser explicado porque se produzcan variaciones en el mecanismo de retención al modificar la temperatura de trabajo.

Tabla 11. Influencia de la temperatura en la separación enantiomérica de bifonazol. Condiciones cromatográficas: presión 150 bar, flujo 2 mL/min

(*) Condiciones no estudiadas.

BIFONAZOL					
	Temperatura (°C)	k ₁	k ₂	α	Rs
MeOH 30%	20	4,23	6,13	1,45	4,92
	25	4,04	5,59	1,38	5,17
	30	3,87	5,36	1,39	5,12
	35	4,10	5,61	1,37	5,29
EtOH 35%	20	3,22	4,41	1,37	4,43
	25	3,03	4,38	1,45	4,89
	30	2,02	2,85	1,41	4,68
	35	2,53	3,55	1,40	4,19
iPrOH 30%	20	(*)	(*)	(*)	(*)
	25	5,33	7,44	1,40	3,53
	30	5,51	6,98	1,27	3,52
	35	5,51	7,74	1,41	4,43

Con el triadimefon (que es el compuesto que presentó la menor retención de todos los estudiados), se realizaron dos estudios paralelos: por una parte, se utilizaron los mejores porcentajes para cada modificador orgánico (8% MeOH, 8% EtOH Y 15% iPrOH), y por otra, se estudió el efecto de la temperatura utilizando un mismo porcentaje (8%) con todos los modificadores, para comprobar si el cambio en el modificador orgánico daba lugar a comportamientos diferente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12.

Como puede apreciarse, cuando se mantuvo fijo el porcentaje de modificador en un valor bajo (8%), al aumentar la temperatura la retención aumentó para cualquiera de los modificadores utilizados. La selectividad disminuyó a medida que se incrementó la temperatura, especialmente cuando se empleó metanol o etanol; en cambio, con isopropanol no se obtuvo una tendencia clara. Cuando se obtuvieron las representaciones de $\ln \alpha$ con estos datos, sólo hubo un comportamiento lineal en el caso de utilizar metanol y etanol (Gráficos 9 y 10). Con isopropanol, fue la representación de $\ln k$ la que proporcionó buen ajuste lineal. En todos los casos se pudo calcular la temperatura de isoelución, obteniendo valores por encima de las temperaturas de trabajo al utilizar metanol y etanol, lo que indica que en estos casos la enantioseparación es de control entálpico y la selectividad disminuirá al aumentar la temperatura. La temperatura de isoelución obtenida en el caso de utilizar isopropanol estaba por debajo del rango de trabajo, de modo que el mecanismo en este caso es de control entrópico, y la selectividad aumentará al incrementar la temperatura.

Cuando se utilizaron porcentajes más altos de modificador (20% de etanol o 15% de isopropanol), la retención también aumentó con la temperatura, pero la selectividad no siguió una tendencia clara. Se obtuvieron representaciones lineales al representar $\ln k$ frente a $1/T$ (Gráfico 11 y Gráfico 13), y partir de ellas se calculó la temperatura de isoelución; el caso del 20% de etanol, se obtuvo un valor por encima del intervalo de trabajo (149,7 °C); por lo tanto, también en este caso el mecanismo es de control entálpico y la selectividad disminuirá al aumentar la temperatura. La temperatura de isoelución obtenida cuando se utilizó 15% isopropanol de nuevo resultaron muy por debajo del intervalo de trabajo, por lo que con este modificador el mecanismo de separación es de control entrópico.

Tabla 12. Influencia de la temperatura en la separación enantiomérica de triadimefon. Condiciones cromatográficas: presión 150 bar, flujo 2 mL/min

TRIADIMEFON					
	Temperatura (°C)	k ₁	k ₂	α	Rs
MeOH 8%	20	1,16	1,46	1,26	3,02
	25	1,25	1,55	1,24	3,09
	30	1,26	1,54	1,22	3,01
	35	1,31	1,60	1,21	2,91
EtOH 8%	20	1,09	1,35	1,25	3,01
	25	1,14	1,41	1,24	3,22
	30	1,18	1,44	1,23	3,06
	35	1,27	1,54	1,22	2,88
EtOH 20%	20	0,50	0,61	1,21	1,61
	25	0,53	0,63	1,19	1,53
	30	0,55	0,66	1,19	1,67
	35	0,61	0,72	1,17	1,63
iPrOH 8%	20	1,43	1,70	1,19	2,40
	25	1,42	1,75	1,23	3,10
	30	1,84	2,21	1,20	2,68
	35	2,07	2,47	1,19	2,80
iPrOH 15%	20	0,77	0,89	1,16	1,50
	25	0,80	0,94	1,18	1,65
	30	0,88	1,03	1,16	1,77
	35	0,96	1,12	1,16	2,03

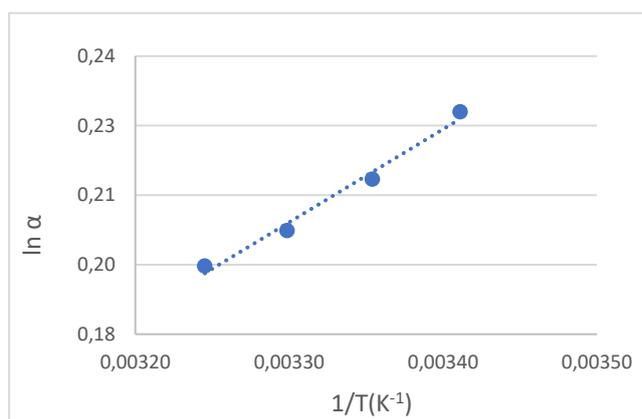


Gráfico 8. Representación de $\ln \alpha$ – Triadimefon - 8% MeOH

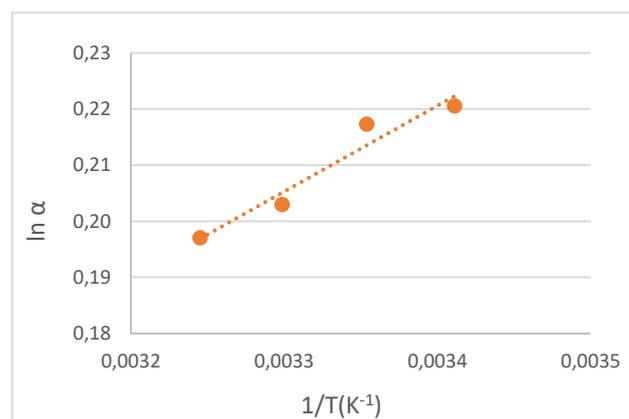


Gráfico 9. Representación de $\ln \alpha$ – Triadimefon - 8% EtOH

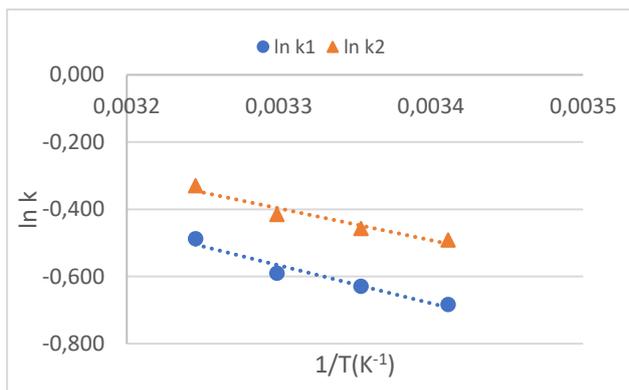


Gráfico 10. Representación de $\ln k$ - Triadimefon - 20% EtOH

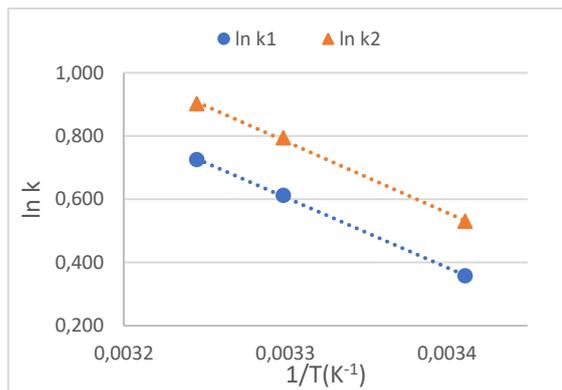


Gráfico 11. Representación de $\ln k$ - Triadimefon - 8% iPrOH

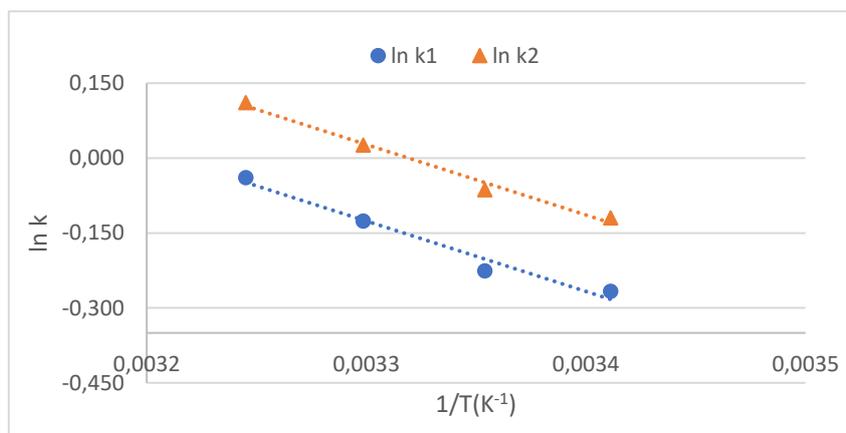


Gráfico 12. Representación de $\ln k$ - Triadimefon - 15% iPrOH

Tabla 13. Parámetros termodinámicos y temperaturas de isoelución para el triadimefon

TRIADIMEFON			
	$\Delta\Delta H^\circ$ (J/mol)	$\Delta\Delta S^\circ$ (J/K·mol)	T isoelución (°C)
MeOH 8%	1667,5	-3,8	165,1
EtOH 8%	1290,9	-2,6	232,9
EtOH 20%	1507,6	-3,6	149,7
iPrOH 8%	-329,1	2,6	-144,5
iPrOH 15%	27,9	-25,1	-271,9

Con triadimenol (Tabla 14), se había comentado que con ninguno de los porcentajes de etanol estudiados se logró la separación de todos los enantiómeros; dentro de los porcentajes en cuyos cromatogramas se observaban los 4 picos, aunque no hubiese separación hasta línea de base, se eligió estudiar la influencia de la temperatura con el porcentaje que suponía menor consumo de disolvente (20% de etanol). Tampoco se logró la separación hasta línea de base de todos los diastereoisómeros al modificar la temperatura de trabajo.

Tabla 14. Influencia de la temperatura en la separación enantiomérica de triadimenol. Condiciones cromatográficas: presión 150 bar, flujo 2 mL/min

TRIADIMENOL										
	Temperatura (°C)	k1 (1G)	k2 (2G)	k3 (1P)	k4 (2P)	α (1G-2G)	α (1P-2P)	Rs (1-2)	Rs (2-3)	Rs (3-4)
MeOH 8%	20	2,37	3,22	3,60	4,87	1,36	1,35	3,05	1,81	5,33
	25	2,70	3,26	3,60	4,74	1,21	1,32	2,98	1,68	4,92
	30	2,83	3,37	3,70	4,77	1,19	1,29	3,04	1,66	4,89
	35	3,10	3,73	4,10	5,20	1,20	1,27	3,16	1,67	4,62
	Temperatura (°C)	k1 (1G)	k2 (2G)	k3 (1P)	k4 (2P)	α (1G-2G)	α (1P-2P)	Rs (1-2)	Rs (2-3)	Rs (3-4)
EtOH 20%	20	0,67	0,86	0,96	1,22	1,43	1,42	2,48	1,22	2,74
	25	0,69	0,85	0,94	1,16	1,37	1,37	2,41	1,23	2,65
	30	0,76	0,96	1,04	1,28	1,37	1,34	2,74	1,15	2,62
	35	0,79	0,97	1,06	1,25	1,34	1,29	2,62	1,21	2,33
iPrOH 15%	20	1,39	1,72	2,29	2,68	1,65	1,55	2,70	3,66	2,02
	25	1,21	1,55	1,95	2,38	1,61	1,54	2,87	2,87	2,56
	30	1,74	2,15	2,77	3,13	1,60	1,45	2,88	3,57	1,79
	35	2,04	2,34	2,63	3,17	1,29	1,35	2,23	1,98	3,22

Con todos los modificadores se apreció un aumento de la retención con el incremento la temperatura. La selectividad, que se calculó para cada par de enantiómeros (por una parte 1P y 2P, y por otra 1G y 2G), disminuyó conforme se aumentó la temperatura, especialmente cuando se utilizó isopropanol. Las representaciones de $\ln \alpha$ y $\ln k$ se llevaron a cabo para cada pareja (Gráficos 13– 16). Tanto al utilizar metanol como etanol, la pareja (1P y 2P) proporcionó buen ajuste lineal al representar $\ln \alpha$ frente al inverso de la temperatura, mientras que la pareja (1G, 2G) mostró un comportamiento lineal cuando se representó $\ln k$. A partir de estas representaciones, se calculó la temperatura de isoelución para uno de los pares enantioméricos con cada modificador (Tabla 15). Todas ellas resultaron por encima de las

temperaturas de trabajo, por lo que el mecanismo de separación es de control entálpico, y la selectividad disminuirá con la temperatura.

Con isopropanol, las representaciones de $\ln \alpha$ y $\ln k$ no fueron lineales para ninguna de las parejas enantioméricas; esto puede explicarse porque el mecanismo de retención al utilizar este modificador varíe con la temperatura de trabajo.

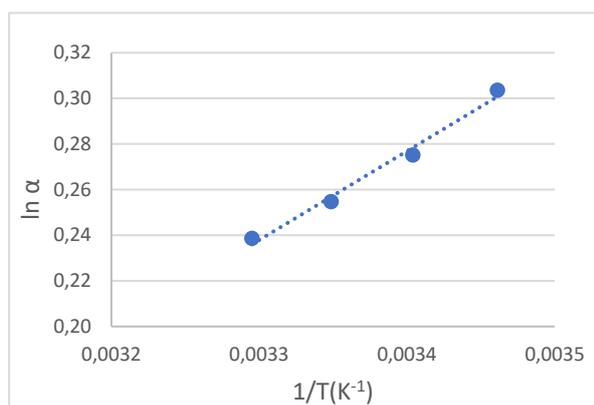


Gráfico 13. Representación de $\ln \alpha$ - Triadimenol (picos 1P y 2P)- 8% MeOH

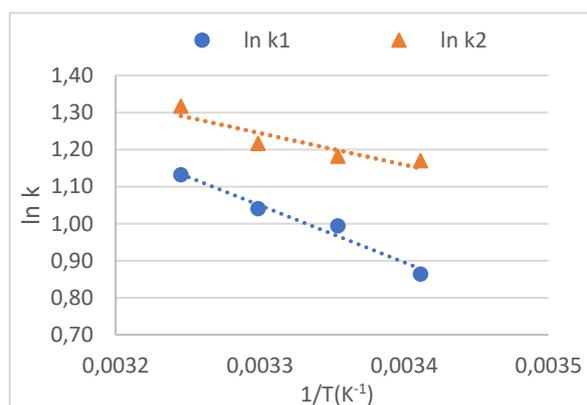


Gráfico 14. Representación de $\ln k$ - Triadimenol (picos 1G y 2G) - 8% MeOH

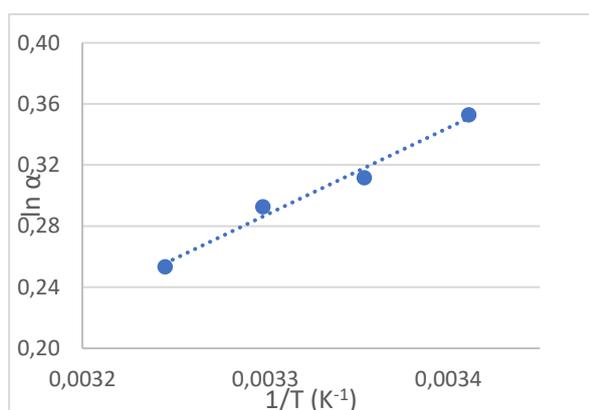


Gráfico 16. Representación de $\ln \alpha$ - Triadimenol (picos 1P y 2P)- 20% EtOH

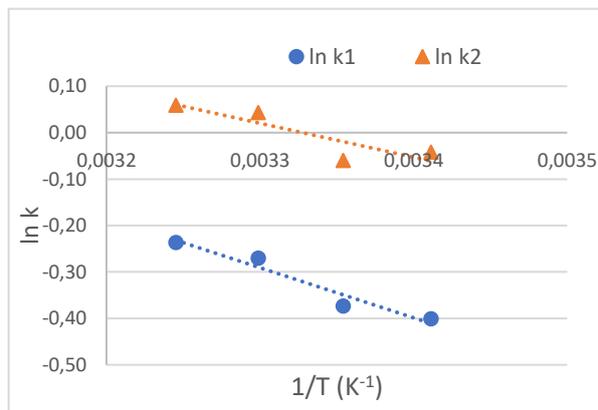


Gráfico 15. Representación de $\ln k$ - Triadimenol (picos 1G y 2G) - 20% EtOH

Tabla 15. Parámetros termodinámicos y temperaturas de isoelución para el triadimenol

TRIADIMENOL				
		$\Delta\Delta H^\circ$ (J/mol)	$\Delta\Delta S^\circ$ (J/K·mol)	T isoelución (°C)
MeOH 8%	1P, 2P	3239,0	-8,5	105,8
	1G, 2G	5696,4	-17,2	58,6
EtOH 20%	1P, 2P	4765,2	-13,3	84,2
	1G, 2G	2884,4	-6,9	143,0

5.4. Condiciones seleccionadas

En la Tabla 16, se indican las mejores condiciones en términos de retención y resolución para la separación enantiomérica por SFC de cada uno de los compuestos. En todos los casos, el flujo de fase móvil es de 2 mL/min, y el volumen de inyección de 10 μ L.

Tabla 16. Mejores condiciones para la separación de los compuestos analizados en la columna LuxCellulose2

COLUMNA LUX CELLULOSE 2				
CONDICIONES	MODIFICADOR	PORCENTAJE (%)	TEMPERATURA (°C)	PRESIÓN (bar)
SULCONAZOL	EtOH	40%	35 °C	150
BIFONAZOL	EtOH	35%	35 °C	150
TRIADIMEFON	MeOH	8%	20 °C	150
TRIADIMENOL	iPrOH	15%	25 °C	150

En bifonazol, el consumo de disolvente fue menor al utilizar 35% de etanol que con 30 % metanol, por lo que se consideró mejor opción utilizar dicho porcentaje de etanol.

Las condiciones incluidas en la tabla son las mejores para la separación individual de cada uno de los compuestos, teniendo en cuenta el tiempo de retención, la resolución y el consumo de disolvente; sin embargo, en el caso de triadimefon y triadimenol puede ser interesante su separación conjunta. En este caso, las condiciones más adecuadas, por resolución y consumo de disolvente, serían 8% MeOH a 20°C.

A continuación se adjuntan los cromatogramas obtenidos para cada uno de los compuestos en las condiciones óptimas:

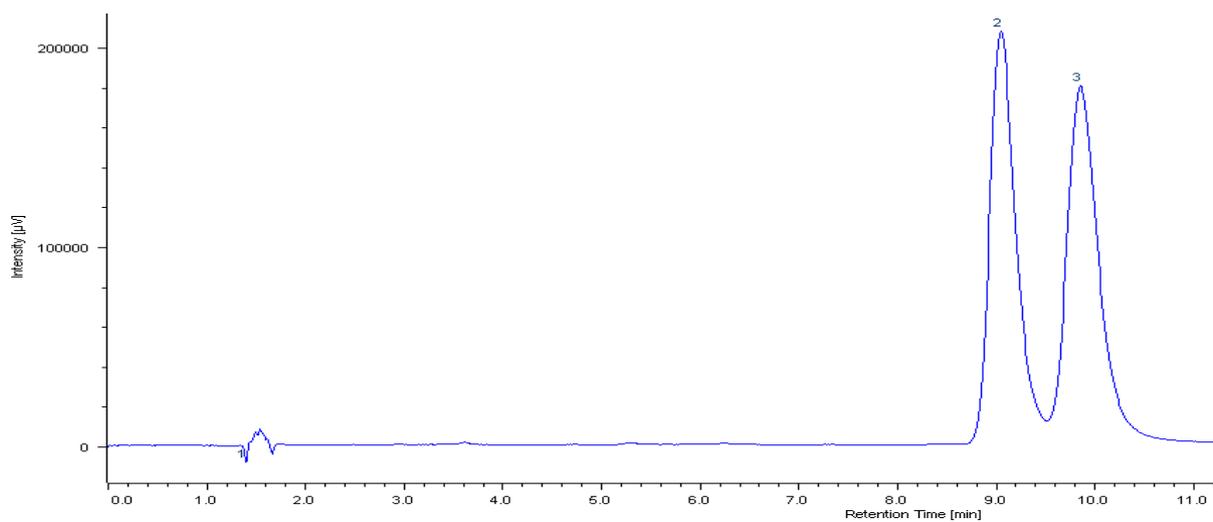


Figura 9. Cromatograma de la separación de sulconazol. Condiciones: 40% EtOH, 35 °C, 150 bar, 2mL/min

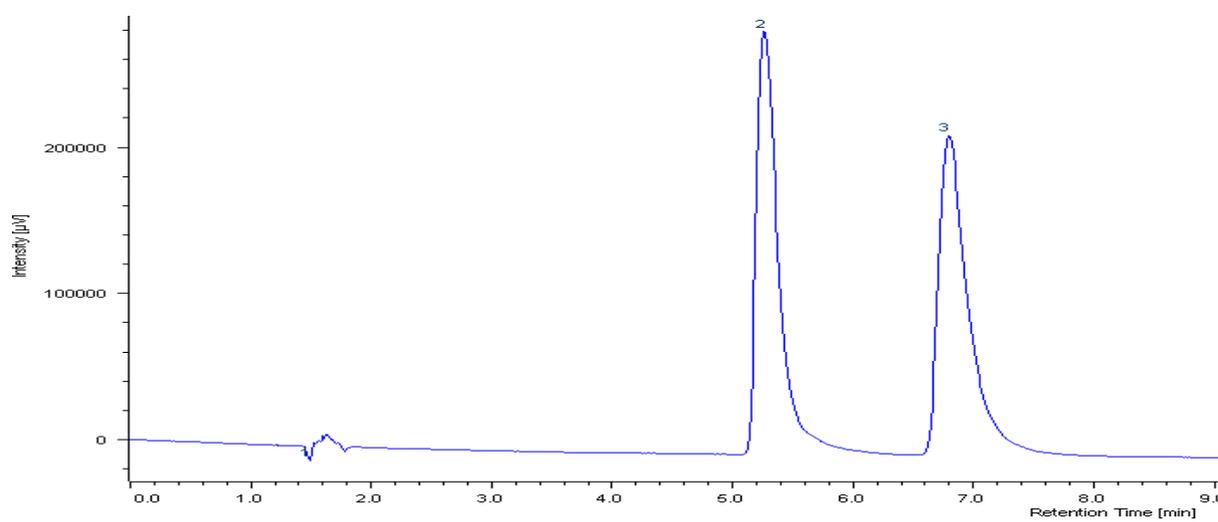


Figura 10. Cromatograma de la separación de bifonazol. Condiciones: 35% EtOH, 35 °C, 150 bar, 2mL/min

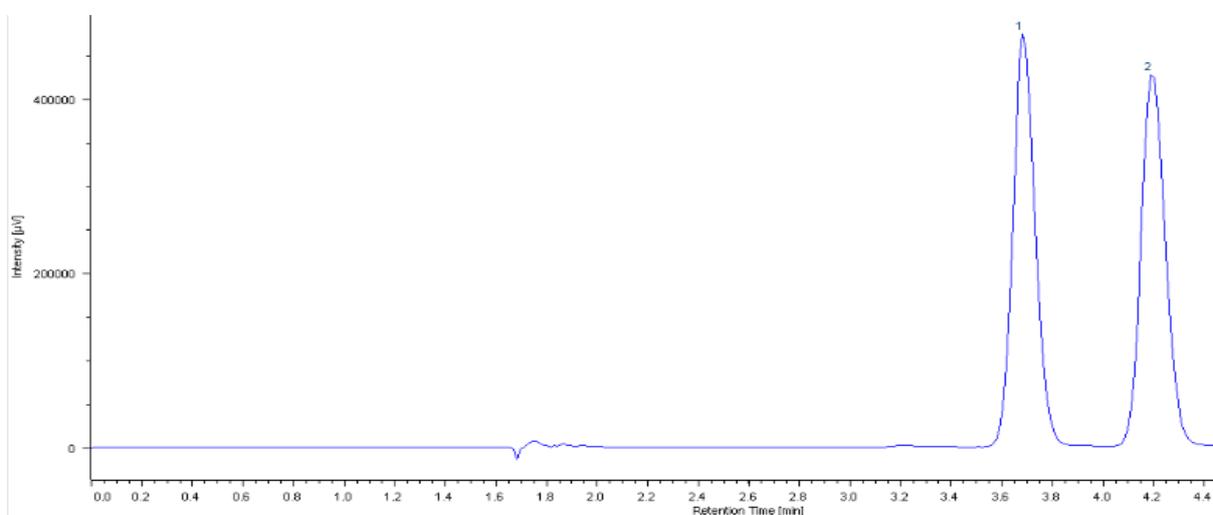


Figura 11. Cromatograma de la separación de triadimefon. Condiciones: 8% MeOH, 20 °C, 150 bar, 2 mL/min

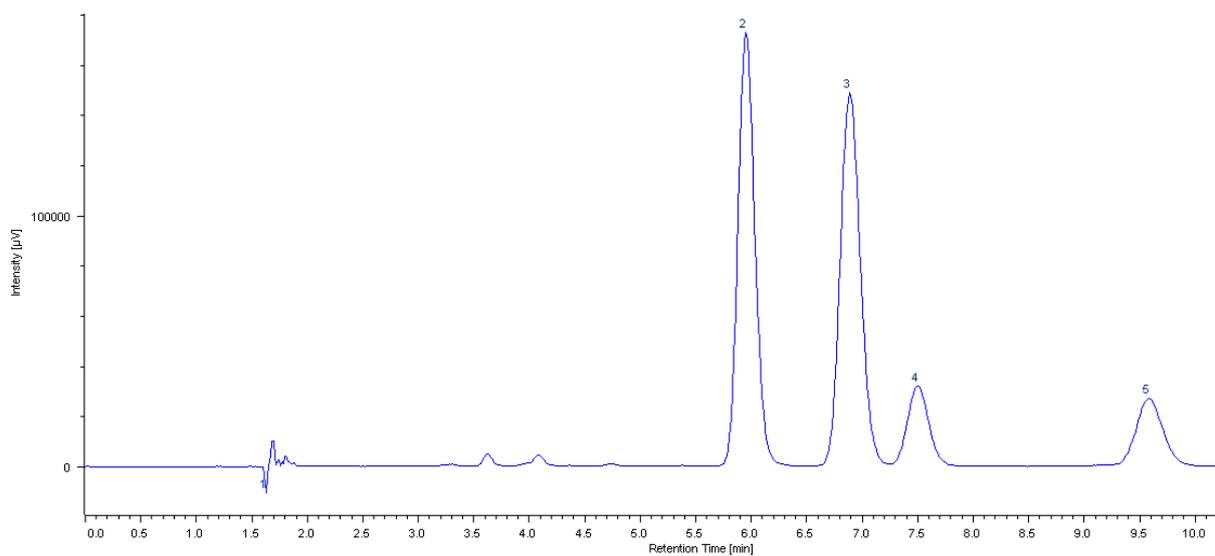


Figura 12. . Cromatograma de la separación de triadimenol. Condiciones: 8% MeOH, 20 °C, 150 bar, 2 mL/min

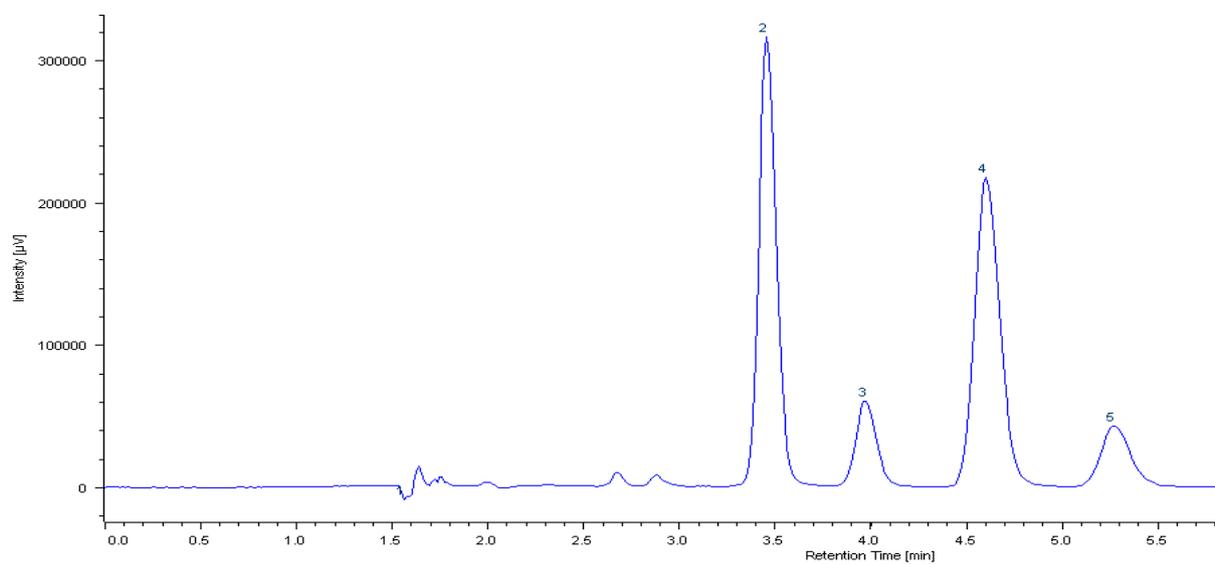


Figura 13. Cromatograma de la separación de triadimenol. Condiciones: 15% iPrOH, 25 °C, 150 bar, 2 mL/min

6. PERSPECTIVAS DE CONTINUACIÓN DEL TRABAJO

Como se ha comentado a lo largo del trabajo, algunos puntos no han podido ser completados por falta de tiempo debido al decreto del estado de alarma por la situación del COVID-19. A continuación se comentarán un poco más a fondo, con el fin de dar una idea más precisa del alcance original del trabajo, y como posible ampliación del mismo en un futuro.

Lo primero sería completar las secuencias de temperaturas del sulconazol y el bifonazol utilizando como modificador orgánico 30% de isopropanol, que quedaron incompletas (solamente pudieron hacerse 3 de las 4 temperaturas a estudiar). Con ellas, se tendrían datos suficientes para comparar el efecto de la temperatura en la separación enantiomérica con todos los modificadores orgánicos.

El siguiente paso sería estudiar la separación de una mezcla de triadimefon y triadimenol, con un 8% de MeOH a 20 °C (presión 150 bar, y flujo de fase móvil 2 mL/min, las condiciones seleccionadas), para comprobar si la separación hasta línea de base de todos los enantiómeros es posible.

Posteriormente, se repetiría todo el estudio que se ha llevado a cabo con la columna Lux Cellulose 2 (efecto del tipo y porcentaje de modificador orgánico y de la temperatura) con una columna quiral polimérica derivada de amilosa (Lux Amillose 2).

Además, para determinar si existe variación en el orden de elución de los enantiómeros al cambiar de modificador orgánico, se llevaría a cabo el análisis con un detector de dicroísmo circular. Con esto también podría identificarse cada uno de los enantiómeros, saber cuál es el dextrógiro y cuál el levógiro.

7. CONCLUSIONES

- La columna Chiralcel OD no ha proporcionado buenos resultados en la separación enantiomérica de los compuestos estudiados, puesto que se produce retención de los compuestos (los analitos establecen interacciones con la fase estacionaria) pero esta no es enantioselectiva.
- La columna Lux Cellulose 2 ha permitido buenas separaciones de todos los compuestos, en diferentes condiciones de modificador orgánico y temperatura.
- En general, la retención de los compuestos depende del tipo de modificador orgánico utilizado, y disminuye en el sentido en el que aumenta la polaridad de este; es decir, las mayores retenciones se obtuvieron cuando se utilizó como modificador orgánico isopropanol, y las menores cuando se utilizó metanol. Esta misma variación se observa cuando para un mismo modificador orgánico se aumenta su porcentaje: la retención disminuye como consecuencia del aumento de la polaridad de la fase móvil.
- Las enantiorresoluciones se ven más afectadas por el tipo de modificador orgánico que por su porcentaje. Para la mayoría de los compuestos estudiados se lograron resoluciones superiores a la línea de base ($R_s > 1,5$) con cualquiera de los tres modificadores empleados excepto para el sulconazol, para el que no se logró la resolución de los enantiómeros con metanol, y para triadimenol, para el cual no se lograron resolver los cuatro diastereoisómeros cuando se utilizó etanol. También hay que señalar que para triadimefon y triadimenol, las variaciones en la enantiorresolución con el tipo de modificador orgánico fueron menos marcadas que para los otros compuestos, a la vez que fueron los menos retenidos en la columna LuxCellulose 2. Por el contrario, las mayores resoluciones se obtuvieron con metanol en el caso del bifonazol y con isopropanol en el caso del sulconazol.
- Es posible que el orden de elución de los enantiómeros sea diferente según el tipo de modificador orgánico empleado. Esto sólo pudo observarse en el caso del triadimenol, ya que la proporción en la que se encontraba la pareja de diastereoisómeros en el patrón era diferente. En este caso, se pudo comprobar un cambio en el orden de elución de los enantiómeros cuando se utilizó metanol con respecto a cuando se utilizó etanol o isopropanol, pero no se pudo constatar si también se producía un cambio en

la elución de los isómeros correspondientes al mismo diastereoisómero. Para poder observar ese posible cambio en el orden de elución de los enantiómeros hubiese sido necesario emplear un detector de dicroísmo circular, como se había planificado al comienzo del trabajo.

- Con respecto a la influencia de la temperatura en la separación enantiomérica, hay que señalar que en el caso del sulconazol y el bifonazol la retención disminuyó al aumentar la temperatura. Por el contrario, para triadimefon y triadimenol, cuando se utilizó un porcentaje bajo de modificador orgánico (8%) la retención aumentó al aumentar la temperatura. Cuando se hicieron las representaciones de Van't Hoff, sólo se obtuvieron comportamientos lineales en el caso del sulconazol con un 40% de etanol, encontrándose que el mecanismo de separación enantiomérica era de control entrópico, ya que la temperatura de isoelución estaba por debajo del intervalo de temperaturas de trabajo. Para el triadimefon se obtuvieron representaciones lineales en todos los casos; cuando se utilizó etanol al 8% y al 20% y metanol al 8%, la temperatura de isoelución se encontró por encima del intervalo de temperaturas de trabajo, por lo que el mecanismo de separación era de control entálpico. Sin embargo, al utilizar isopropanol al 8% y 15%, la temperatura de isoelución resultó por debajo del intervalo de trabajo, de manera que, en estos casos, el mecanismo de separación era de control entrópico. En el caso del triadimenol, las parejas de enantiómeros (1P, 2P) y (1G, 2G) proporcionaron buenos ajustes lineales tanto al utilizar 8% de metanol como 20% de etanol. Las temperaturas de isoelución que se obtuvieron estaban por encima de las temperaturas de trabajo, lo que indica que el mecanismo era de control entálpico. Al utilizar 15% de isopropanol no se logró ajuste lineal de ninguna de las parejas.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Phinney, K. W., & Stringham, R. W. (2007). Chiral Separations Using Supercritical Fluid Chromatography. *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach, Third Edition*, 135–154. <https://doi.org/10.1002/9783527611737.ch4>
- [2] Dai, J., Zhang, Y., Wang-Iverson, D. and Tymiar, A. (2012). Supercritical Fluid Chromatography. In D. Zhang & S. Surapaneni (Eds.), *ADME-Enabling Technologies In Drug Design And Development*. <https://doi.org/10.1021/ac00211a021>
- [3] Berger, T. A. (2015). Instrumentation for analytical scale supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1421, 171–183. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.062>
- [4] Berthod, A. (Ed.). (2010). *Chiral Recognition in Separation Methods*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-12445-7>
- [5] Grigera, J. R., Ca, E. R., & Rosa, S. De. (1998). *Computer simulation of the cyclodextrin ± phenylalanine complex*. 310, 253–259. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(98\)00147-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(98)00147-5)
- [6] Fernandes, C., Tiritan, M. E., & Pinto, M. (2013). Small molecules as chromatographic tools for HPLC enantiomeric resolution: Pirkle-type chiral stationary phases evolution. *Chromatographia*, 76, 871–897. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2469-8>
- [7] Knežević, A., Novak, J., & Vinković, V. (2019). New brush-type chiral stationary phases for enantioseparation of pharmaceutical drugs. *Molecules*, 24(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules24040823>
- [8] Blum, A. M., Lynam, K. G., & Nicolas, E. C. (1994). Use of a new Pirkle-type chiral stationary phase in analytical and preparative subcritical fluid chromatography of pharmaceutical compounds. *Chirality*, 6(4), 302–313. <https://doi.org/10.1002/chir.530060414>
- [9] Smith, E. B. (1990). History of antifungals. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 23(4), 776–778. [https://doi.org/10.1016/0190-9622\(90\)70286-Q](https://doi.org/10.1016/0190-9622(90)70286-Q)

- [10] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Sulconazole, CID=5318, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulconazole> (accessed on Jan. 30, 2020)
- [11] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Sulconazole nitrate, CID=65495, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulconazole-nitrate> (accessed on Jan. 30, 2020)
- [12] Vidal Vademecum Spain, 2020, Bifonazol. [online] Vademecum.es. Available at: <<https://www.vademecum.es/principios-activos-bifonazol-D01AC10>> (accessed on 7 February 2020)
- [13] Fromtling, R. A. (1988). Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clinical Microbiology Reviews*, 1(2), 187–217. <https://doi.org/10.1128/CMR.1.2.187>
- [14] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Bifonazole, CID=2378, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bifonazole> (accessed on Jan. 30, 2020)
- [15] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Triadimefon, CID=39385, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triadimefon> (accessed on Feb. 11, 2020)
- [16] Hertfordshire, U., 2020. *Triadimefon*. [online] Sitem.herts.ac.uk. Available at: <<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/648.htm>> [Accessed 30 January 2020].
- [17] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Triadimenol, CID=41368, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Triadimenol> (accessed on Jan. 30, 2020)
- [18] Deas, A. H. B., Carter, G. A., Clark, T., Clifford, D. R., & James, C. S. (1986). The enantiomeric composition of triadimenol produced during metabolism of triadimefon by fungi. III. Relationship with sensitivity to triadimefon. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 26(1), 10–21. [https://doi.org/10.1016/0048-3575\(86\)90057-X](https://doi.org/10.1016/0048-3575(86)90057-X)

- [19] Yao, Z., Li, X., Miao, Y., Lin, M., Xu, M., Wang, Q., & Zhang, H. (2015). Simultaneous enantioselective determination of triadimefon and its metabolite triadimenol in edible vegetable oil by gel permeation chromatography and ultraperformance convergence chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(29), 8849–8859. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9046-y>
- [20] Hertfordshire, U., 2020. *Triadimenol*. [online] Sitem.herts.ac.uk. Available at: <<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/649.htm>> [Accessed 30 January 2020].
- [21] Aboul-Enein, H. Y., & Ali, I. (2002). Comparative study of the enantiomeric resolution of chiral antifungal drugs econazole, miconazole and sulconazole by HPLC on various cellulose chiral columns in normal phase mode. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27(3–4), 441–446. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00575-1](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00575-1)
- [22] Aboul-Enein, H. Y., & Ali, I. (2001). Comparison of the chiral resolution of econazole, miconazole, and sulconazole by HPLC using normal-phase amylose CSPs. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 370(7), 951–955. <https://doi.org/10.1007/s002160100884>
- [23] Nelander, H., Andersson, S., & Öhlén, K. (2011). Evaluation of the chiral recognition properties as well as the column performance of four chiral stationary phases based on cellulose (3,5-dimethylphenylcarbamate) by parallel HPLC and SFC. *Journal of Chromatography A*, 1218(52), 9397–9405. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.10.082>
- [24] Toribio, L., del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Alonso, C., & Jiménez, J. J. (2007). Enantiomeric separation of several antimycotic azole drugs using supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.047>
- [25] Wu, H., Yu, S., & Zeng, L. (2016). Effects of Hexane in Supercritical Fluid Chromatography for the Separation of Enantiomers. *Chirality*, 28(3), 192–198. <https://doi.org/10.1002/chir.22575> [23]

- [26] Han, X., Berthod, A., Wang, C., Huang, K., & Armstrong, D. W. (2007). Super/subcritical fluid chromatography separations with four synthetic polymeric chiral stationary phases. *Chromatographia*, 65(7–8), 381–400. <https://doi.org/10.1365/s10337-007-0182-1>
- [27] Del Nozal, M. J., Toribio, L., Bernal, J. L., & Castaño, N. (2003). Separation of triadimefon and triadimenol enantiomers and diastereoisomers by supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 986(1), 135–141. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01920-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01920-9)
- [28] Bernal, J. L., Del Nozal, M. J., Toribio, L., Montequi, M. I., & Nieto, E. M. (2000). Separation of ketoconazole enantiomers by chiral subcritical-fluid chromatography. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 43(1–3), 241–250. [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(00\)00060-9](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(00)00060-9)

9. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS Y DE ACRÓNIMOS

9.1. LISTADO DE ABREVIATURAS

CSPs: Chiral Stationay Phases

EtOH: Etanol

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

iPrOH: Isopropanol

LC: Liquid Chromatography

MeOH: Metanol

Rs: Resolución

SFC: Supercritical Fluid Chromatography

t_0 : Tiempo muerto

TEA: Trietilamina

TFA: Ácido trifluoroacético

t_r : Tiempo de retención

UV-VIS: Ultravioleta-Visible

9.2. LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS

Figura 1. Diagrama de fases del CO ₂	3
Figura 2. Esquema general de un equipo SFC	5
Figura 3. Estructura del Sulconazol	9
Figura 4. Estructura del Bifonazol	10
Figura 5. Estructura del Triadimefon.....	10
Figura 6. Estructura del Triadimenol	11
Figura 7. Cromatograma de la separación de triadimenol. Condiciones: 8% MeOH, 35 °C, 150 bar, 2mL/min	23
Figura 8. Cromatograma de la separación de triadimenol. Condiciones: 8% iPrOH, 35 °C, 150 bar, 2mL/min	23
Figura 9. Cromatograma de la separación de sulconazol. Condiciones: 40% EtOH, 35 °C, 150 bar, 2mL/min	37
Figura 10. Cromatograma de la separación de bifonazol. Condiciones: 35% EtOH, 35 °C, 150 bar, 2mL/min	37
Figura 11. Cromatograma de la separación de triadimefon. Condiciones: 8% MeOH, 20 °C, 150 bar, 2 mL/min	37
Figura 12. . Cromatograma de la separación de triadimenol. Condiciones: 8% MeOH, 20 °C, 150 bar, 2 mL/min	38
Figura 13. Cromatograma de la separación de triadimenol. Condiciones: 15% iPrOH, 25 °C, 150 bar, 2 mL/min	38

TABLAS

Tabla 1. Equipo cromatográfico	14
Tabla 2. Reactivos.....	15
Tabla 3. Compuestos	15
Tabla 4. Fases estacionarias	16
Tabla 5. Efecto del modificador orgánico en la separación enantiomérica de sulconazol. Condiciones cromatográficas: Temperatura 35 °C, presión 150 bar, flujo 2 mL/min	20
Tabla 6. Efecto del modificador orgánico en la separación enantiomérica de bifonazol. Condiciones cromatográficas: Temperatura 35 °C, presión 150 bar, flujo 2 mL/min	21
Tabla 7. Efecto del modificador orgánico en la separación enantiomérica de triadimefon. Condiciones cromatográficas: Temperatura 35 °C, presión 150 bar, flujo 2 mL/min	22
Tabla 8. Efecto del modificador orgánico en la separación enantiomérica de triadimenol.	24
Tabla 9. Influencia de la temperatura en la separación enantiomérica de sulconazol. Condiciones cromatográficas: presión 150 bar, flujo 2 mL/min.....	29
Tabla 10. Parámetros termodinámicos y temperatura de isoelución para el sulconazol.....	29
Tabla 11. Influencia de la temperatura en la separación enantiomérica de bifonazol. Condiciones cromatográficas: presión 150 bar, flujo 2 mL/min.....	30

Tabla 12. Influencia de la temperatura en la separación enantiomérica de triadimefon. Condiciones cromatográficas: presión 150 bar, flujo 2 mL/min.....	32
Tabla 13. Parámetros termodinámicos y temperaturas de isoelución para el triadimefon	33
Tabla 14. Influencia de la temperatura en la separación enantiomérica de triadimenol. Condiciones cromatográficas: presión 150 bar, flujo 2 mL/min.....	34
Tabla 15. Parámetros termodinámicos y temperaturas de isoelución para el triadimenol	35
Tabla 16. Mejores condiciones para la separación de los compuestos analizados en la columna LuxCellulose2.....	36

GRÁFICOS

Gráfico 1. Variación de la retención de sulconazol con el porcentaje de EtOH.....	20
Gráfico 2. Variación de la retención de bifonazol con el porcentaje de EtOH.....	21
Gráfico 3. Variación de la retención de bifonazol con el porcentaje de MeOH.....	21
Gráfico 4. Variación de la retención de triadimenol con el porcentaje de MeOH.....	25
Gráfico 5. Variación de la retención de triadimenol con el porcentaje de EtOH.....	25
Gráfico 6. Variación de la retención de triadimenol con el porcentaje de iPrOH.....	25
Gráfico 7. Representación de $\ln k$ - Sulconazol - 40% EtOH	29
Gráfico 8. Representación de $\ln \alpha$ - Triadimefon - 8% MeOH	32
Gráfico 9. Representación de $\ln \alpha$ - Triadimefon - 8% EtOH.....	32
Gráfico 10. Representación de $\ln k$ - Triadimefon - 20% EtOH	33
Gráfico 11. Representación de $\ln k$ - Triadimefon - 8% iPrOH	33
Gráfico 12. Representación de $\ln k$ - Triadimefon - 15% iPrOH	33
Gráfico 13. Representación de $\ln \alpha$ - Triadimenol (picos 1P y 2P)- 8% MeOH.....	35
Gráfico 14. Representación de $\ln k$ - Triadimenol (picos 1G y 2G) - 8% MeOH	35
Gráfico 15. Representación de $\ln k$ - Triadimenol (picos 1G y 2G) - 20% EtOH.....	35
Gráfico 16. Representación de $\ln \alpha$ - Triadimenol (picos 1P y 2P)- 20% EtOH.....	35

ECUACIONES

Ecuación 1. Selectividad	26
Ecuación 2. Ecuación de Van't Hoff en función de la selectividad	26
Ecuación 3. Factor de retención.....	27
Ecuación 4. Ecuación de Van't Hoff en función del factor de retención.....	27