



SEPARACIÓN ENANTIOMÉRICA DE FUNGICIDAS QUIRALES POR CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.

AUTOR: LUIS CARLOS MORÁN ALARCÓN

TUTORA: DRA. LAURA TORIBIO RECIO

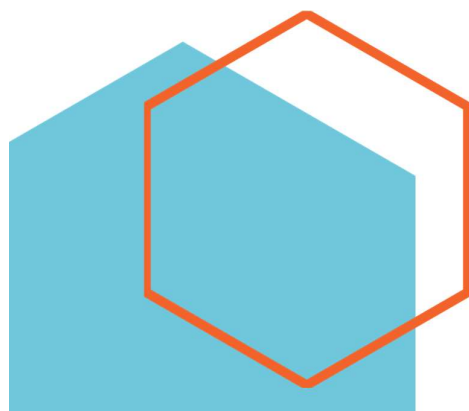
TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**MÁSTER EN TÉCNICAS AVANZADAS EN QUÍMICA.
ANÁLISIS Y CONTROL DE CALIDAD QUÍMICOS.**

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

VALLADOLID, JULIO 2020



UVa



Facultad de Ciencias

RESUMEN TRABAJO FIN DE MÁTER

TÍTULO: Separación enantiomérica de fungicidas quirales por cromatografía de fluidos supercríticos.

DEPARTAMENTO: Química Analítica

TUTOR(ES): D.^a Laura Toribio Recio

AUTOR: Luis Carlos Morán Alarcón

RESUMEN:

El estudio de las sustancias quirales tiene gran importancia en el área medioambiental, debido a que el 27% de la oferta de pesticidas son compuestos quirales. La técnica de cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) es una de las más utilizadas para su análisis, ya que presenta ventajas con respecto a otras técnicas cromatográficas.

En esta investigación, se estudia la separación enantiomérica de siete fungicidas quirales, del tipo azólicos: diniconazol, econazol, miconazol, penconazol, tebuconazol, tetraconazol y cyproconazol, por la técnica de SFC, estudiando la influencia de tres factores: tipo de columna cromatográfica (Chiral OD y Lux Cellulose 2), diferentes tipos y concentraciones de modificadores (metanol, etanol y 2-propanol) y la temperatura.

De las columnas estudiadas la que obtiene mejores resultados es la Lux Cellulose 2, ya con ella se logra la separación enantiomérica de todos los fungicidas. El uso de un modificador orgánico tiene una importante influencia en la separación quiral, independiente del tipo y la concentración del mismo, observando que la retención incrementa en sentido inverso al aumento de la polaridad de los modificadores, excepto con el diniconazol que el orden se ve alterado. Para todos los casos la retención disminuye con el aumento de la concentración de modificador.

Los mejores resultados para la separación de los enantiómeros de los fungicidas estudiados, en términos de retención y resolución, es el etanol al 30%. En el caso de diniconazol y tetraconazol, los mejores resultados se obtuvieron con metanol al 20%. Siendo con tetraconazol que se obtiene las mejores resoluciones.

El estudio de la influencia de la temperatura en la separación quiral muestra que para el diniconazol (etanol y 2-propanol), tetraconazol (etanol y 2-propanol) y cyproconazol (para enantiómeros 2-3 y 3-4 en etanol y etanol y 2-propanol, respectivamente) existe una tendencia lineal para las rectas de Van't Hoff y que se realizan bajo un control entálpico.

La investigación ha permitido establecer variables cromatográficas para la separación enantiomérica de siete fungicidas quirales, presentando resultados satisfactorios.

ABSTRACT OF TMF

TITLE: Enantiomeric separation of fungicides chiral by supercritical fluid chromatography.

DEPARTMENT: Analytic Chemistry

TUTOR: D.^a Laura Toribio Recio

AUTHOR: Luis Carlos Morán Alarcón

ABSTRACT:

The chiral substances study is essential in the environment field, due to the 27% of commercial pesticides are chiral. The supercritical fluid chromatography (SFC) technique is used for its analysis because it has more advantages that other chromatography techniques.

This paper aims to study the enantiomeric separation of seven chiral fungicides from azoles such as: diniconazole, econazole, miconazole, penconazole, tebuconazole, tetraconazol cyproconazole, by SFC technique, examining the three-factor influence: 1. Type of chromatography column (Chiral OD and Lux Cellulose 2), different types and concentrations of modifiers (methanol, ethanol and 2-propanol) and finally temperature.

The columns that have been studies, Lux Cellulose 2 has the best results, because this column obtains the enantiomeric separation of all fungicides. The modifiers use crucial influence in the chiral separation. Also, it is independent of the type and has its concentration; it is observed that retention increases with the decrease of the modifier polarity by contrast to the diniconazole which the order is changeable. In all cases, while the retention is decreasing, the modifiers concentration is increasing.

The best results for the chiral separation of fungicides studied about retention and resolution terms are the ethanol on the 30% concentration. In the case of diniconazole and tetraconazole, the best results had obtained with methanol to the 20%. As a result, the tetraconazole, which obtains best resolutions.

The study temperature influences of chiral separation set up that for diniconazole (ethanol and 2-propanol), tetraconazole (ethanol and 2-propanol) and cyproconazole (for pairs enantiomers 2-3, ethanol, and 3-4, ethanol and 2-propanol), there is a lineal tendency by Van't Hoff plots. And are done under enthalpic control

The research has set up chromatographic variables for the enantiomeric separation of seven chiral fungicides, showing satisfactory results.

Agradecimientos

¡No balconeen la vida, no se metan en la cola de la historia! ¡Sean protagonistas jueguen para adelante! S.S. Papa Francisco

El camino para alcanzar los sueños nunca es fácil, pero el arte está en aprender a disfrutar de ese camino al cual llamamos vida, siendo nosotros los peregrinos en este caminar. En este camino se presentan muchas personas que nos ayudan a alcanzar esos sueños que nos proponemos y a ellos agradezco:

A Dios Todopoderoso y María Santísima: por ser guías, protectores, consejeros y amigos, ya que ellos limpiaron el camino para que logre seguir mis estudios, fueron esa guía en la oscuridad y los que dan el empujón para seguir la caminata.

A mis padres, hermana y familia: agradezco a mi mamá Carolina, mi papá Luis Carlos, por ayudar a formar la persona que soy y ayudarme a lograr mis objetivos académicos. Gracias porque cada día se han sacrificado por darme lo mejor de lo mejor y que tenga lo que necesite, además son los que siempre me aconsejan, alientan y ponen su brazo para seguir en la lucha. También a mi hermana, Zayda María, que ha sido un ejemplo por ser el pilar de la familia y la que, desde lejos me ha apoyado siempre en mis locuras y demostrado que siempre hay alegría por la que sonreír. A mis abuelos, Rene, Blanquita y tía Ma. Luisa, que se adelantaron en el camino de la vida y desde el cielo me protegen y siguen siendo guía en mi vida. Y mi abuela, Mercedes, que en vida y a la distancia ha orado y pensado en mí siempre. Y el resto de mi familia que ha sido un apoyo en este recorrido.

A mis amigos: esos ángeles que Dios pone en el camino para que sea más llevadero y para recordar que no estamos solos en este trayecto. Mencionar a cada uno de ellos me llevaría mucho así que resumo como dice la cita bíblica “el que ha encontrado un amigo, ha encontrado un tesoro” (Ecl. 6, 14) y creo que eso tengo por agradecer, que poseo un gran tesoro. Tanto a mis amigos de infancia, Mirna y Oscar; y Alejandro y Marcela, porque me han brindado su amistad y su apoyo siempre que lo he necesitado y el resto que también han estado ahí. Amigos de la universidad ya que en ellos encontré personas con las que he compartido muchos ideales, tantos amigos de la UCA como en la UVA. Las situaciones de la vida me permitieron formar amistades sinceras como, mis amigos del grupo de vida, que han sido hermanos en Cristo y han sido esa voz de súplica ante el Padre en todo momento. Finalmente, y no menos importantes, a mis amigos internacionales que España me permitió encontrar (Mica, Alex, Darwin, Gaby, etc.) que, a pesar de ser de diferentes nacionalidades hemos compartido grandes experiencia y sueños.

A mi tutora: agradecimiento especial a la Dra. Laura Toribio Recio, por guiarme en este trabajo compartir sus conocimientos y sus enseñanzas en todo momento, y al grupo de investigación TESEA por acogerme para realizar la investigación. Y al resto de profesores que abonaron en mi formación, tanto en El Salvador (Claudia, Aracely, Frida y Carmen) y en Valladolid.

A la UCA: Al rector Padre Andreu Oliva de la Esperanza; al vicerrector académico, Ing. Carlos Rivas y a Dra. Dolores Rovira por el apoyo a seguir mis estudios.

Beca Iberoamérica-Asia: agradecimientos especiales a los financistas tanto del Banco Santander como de la Universidad de Valladolid porque a través del programa de beca han permitido desarrollar mis estudios de postgrado. Y a todas las personas, que de forma directa e indirecta han participado en mi desarrollo académico.

Dedicatoria

«Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.» Marie Curie

Este trabajo y formación se las dedico primeramente a Dios Todopoderoso y a su Madre Santísima. A mis padres y familia por ser mi pilar y apoyo siempre. Y a mis amigos que me han mostrado su lealtad y compañía en todo momento.

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. QUIRALIDAD.....	1
1.2. AGROQUÍMICOS QUIRALES Y SUS IMPLICACIONES EN EL MEDIOAMBIENTE	2
1.3. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE SUSTANCIAS QUIRALES	4
1.1.1. Métodos polarimétricos	4
1.1.2. Métodos cromatográficos.....	5
1.4. CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	6
1.1.3. Fases estacionarias quirales.....	9
1.1.4. Evaluación de las separaciones enantioméricas.....	11
1.1.5. Efecto de la temperatura en las separaciones enantioméricas.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. GENERAL	13
2.2. ESPECÍFICOS	13
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	15
3.1. FUNGICIDAS ESTUDIADOS	15
3.2. COLUMNAS Y FASES ESTACIONARIAS	17
3.3. EQUIPO CROMATOGRÁFICO	17
3.4. MATERIALES Y REACTIVOS.....	18
3.5. METODOLOGÍA	19
2. RESULTADOS.....	21
3.6. VARIABLES CROMATOGRÁFICAS.....	21
3.7. COLUMNA OD	21
3.8. COLUMNA LUX CELLULOSE 2.....	23
2.1.1. Pruebas preliminares	23
2.1.2. Influencia del modificador	24
2.1.3. Influencia de temperatura	33
4. CONCLUSIONES.....	43
5. BIBLIOGRAFÍA.....	45
5. ÍNDICE DE FIGURAS.....	49
6. ÍNDICE DE TABLAS.....	51

1. Introducción

1.1. Quiralidad

La quiralidad deriva de la palabra quiral (ky-ral) del griego chier (“mano”), se define como aquella propiedad por la cual dos objetos son imágenes especulares entre sí (imágenes en el espejo) y no son superponibles, por esta razón su significado etimológico es el de mano; porque la mano derecha es imagen especular de la izquierda pero no son superponibles entre sí [1]. En química una molécula quiral está constituida por dos entidades que son imágenes especulares entre sí, pero no son superponibles, a cada una de ellas se les conoce como enantiómeros. Esta es una forma de estereoisomería, es decir que poseen la misma forma molecular, las mismas propiedades físicas y químicas, pero se diferencian en su configuración espacial, su actividad óptica y su reactividad en entornos quirales, lo cual hace que la toxicidad, degradabilidad, su bioactividad en cada uno de los enantiómeros puedan ser diferente [2][3]. Una molécula orgánica quiral se caracteriza por tener un estero centro, centro quiral o un carbono quiral, que se reconoce porque posee cuatro sustituyentes diferentes no es la única característica pero la más común y el carbono se denota con un asterisco [1], [3], tal como como se observa la figura 1 en el ejemplo de quiralidad del bromoclorofluorometano.

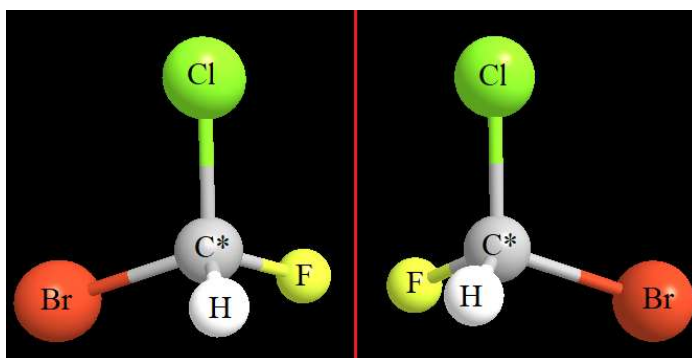


Figura 1 Enantiómeros del bromoclorofluorometano.

En compuestos quirales se utilizan dos tipos de nomenclaturas: la primera de ellas es la que se designa para compuestos con un solo centro quiral, y es conocida como nomenclatura levo- y dextro- o L- y D-. Este tipo nomenclatura no ha sido muy aceptada en la comunidad científica, ya que suele confundir con la actividad óptica de las sustancias. La segunda y más utilizada debido a sus generalidades, ya que se aplica a compuestos quirales con uno o más de un centro quiral, se basa en la configuración espacial de los sustituyentes priorizándolos y este sistema que se conoce como configuración R y S. La priorización de los sustituyentes se realiza a través de reglas establecidas por Cahn, Ingold y Prelog y estas son [3]:

1. Asignar un número equivalente a la priorización, entre más bajo el número más alta la priorización. En el primero de los casos se toma en cuenta los átomos unidos al carbono asimétrico con mayor número atómico tendrán una prioridad más alta. Ejemplo si tenemos un carbono asimétrico enlazado a flúor, bromo, yodo e hidrogeno; la priorización será: yodo, bromo, flúor e hidrogeno.
2. En el caso de empate, se tomará los átomos siguientes de la cadena. Por ejemplo: un carbono asimétrico con los sustituyentes isopropilo, un metilo y un cloro etilo. Debido a que los 3 sustituyentes están enlazados a otros carbonos seguimos al siguiente átomo en

la cadena. La priorización sería: isopropilo ya que el carbono se encuentra unido a dos carbonos más, el siguiente será el cloro etilo ya que se une a otro carbono el siguiente es el cloro y por último el metilo ya que se une a un hidrogeno.

3. Tratar los enlaces dobles y triples como enlaces a otros átomos. Asumir que los enlaces π se rompen y se enlazan a los átomos en los extremos que se duplican, imaginariamente. Por ejemplo: el enlace doble carbono oxígeno tendríamos que el carbono se une a un oxígeno y el oxígeno a un carbono. Ejemplificándolo si se tiene un carbono asimétrico enlazado a $-\text{CHO}$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CH}=\text{CH}_2$. La priorización en este caso quedara $-\text{CHO}$, $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CH}=\text{CH}_2$, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$. Ya que todos estarán unidos a un carbono se traslada al segundo átomo en la cadena. En CHO estaría unido a dos átomos de oxígeno y un hidrogeno, el $-\text{CH}_2\text{OH}$ unido a dos hidrógenos y un oxígeno, el $-\text{CH}=\text{CH}_2$ enlazado a dos carbonos y un hidrogeno y finalmente el $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ unido a dos carbonos enlaces simples.

La importancia de la quiralidad abarca áreas muy diferentes por ejemplo la medicina, el medioambiental, el alimentario, farmacéutico, entre otros. Este interés se debe a que debido a la diferencia en la actividad enantiomérica, cuando no se utilizan sustancias enantioméricamente puras, que en muchas ocasiones es lo más habitual; se pueden producir situaciones problemáticas como por ejemplo [4]:

- a) Una parte de los productos puede ser inútil, provocando utilizar más compuesto del necesario e incurriendo en costos de compra y producción.
- b) Una parte de los productos plantea una carga inútil en el sistema aplicado, donde se tendrá que incurrir en removerlo por medio natural o artificial, provocando así cargas de contaminantes.
- c) Una parte de los productos pueden reaccionar con selectores celulares diferentes y causar efectos secundarios y potencialmente tóxicos.

Cuando esta situación sucede uno de los enantiómeros es el efectivo, pero el otro enantiómero es inactivo o genera efectos diferentes al deseado, a veces hasta el punto de ser altamente toxico para el organismo y los organismos en contacto con él. Por ejemplo: La talidomida, un principio activo de medicamentos anti nauseas para los primeros meses de embarazo introducido en el mercado en 1956. Al inicio se comercializó como mezcla racémica encontrándose casos de malformaciones genéticas en fetos de mujeres embarazadas, se demostró que el enantiómero S era altamente toxico y el eficaz para síntomas de embarazo era el R [5].

1.2. Agroquímicos quirales y sus implicaciones en el medioambiente

Al hablar de agroquímicos principalmente nos referimos a fertilizantes o pesticidas. Estos últimos se definen como cualquier sustancia pura o mezcla que tenga como función prevenir, destruir o controlar una plaga, controlar el crecimiento de las plantas y/o estabilizar los niveles de nitrógeno. Los pesticidas se clasifican según, el objetivo a controlar, en [6]:

- **Algucidas** Previenen el crecimiento y destruye algas.
- **Fungicidas** controlan los hongos como el moho, esporas, el mildiu y el óxido.
- **Herbicidas** intervienen o inhiben el crecimiento de plantas no deseadas, malezas.
- **Insecticidas** regula el crecimiento de los insectos y su proliferación.
- **Rodenticidas** controla roedores como ratones, ratas y taltuzas.

Los ámbitos medioambiental y farmacéutico son los de mayor relevancia en el estudio de sustancia quirales. En el área ambiental, la proporción de los pesticidas quirales representa 25-28% del total conocido [4][7]. Estos tienen relevancia, primeramente, por la falta de producción de pesticidas enantioméricamente puros, ya que la mayoría de los producidos sintéticamente, se utilizan como mezclas racémicas (mezcla de los enantiómeros en proporciones iguales) [8], a tal grado que la FDA ha promulgado una política para que las farmacéuticas y agroquímicas declaren la composición enantiomérica de sus formulaciones [9] y en segundo lugar, el aumento mundial en conciencia ambiental, ya que como hablamos en la sección anterior las sustancias quirales, uno de los enantiómeros pueden generar una carga a los sistemas, en este caso en el medio ambiente, generar así contaminación, y en los últimos años se ha intensificado la reducción de contaminantes y esto puede ser un punto en el futuro para reducir carga contaminante a los ecosistemas. Se estima que, en el año 2017, el uso mundial de pesticidas en el ámbito agrícola fue de 4 millones de toneladas con un crecimiento del 1% anual entre los años 2007 y 2017. En el caso particular de España, el consumo de pesticidas en el 2017 fue de 60,739 toneladas distribuidas en 62.56% como fungicidas, 26.44 % de herbicidas y 11 % como insecticidas [10].

Los fungicidas son los principales pesticidas utilizado en España, de ahí la importancia del estudio de estas sustancias y sus enantiómeros. Como ya anticipamos, un fungicida es una sustancia de origen químico o biológico que tiene la capacidad de matar y controlar el crecimiento de hongos, mohos y esporas, tanto en plantas y animales, pero no solo cumple esta función, ya que también genera un ambiente adecuado para evitar el desarrollo y el crecimiento de otros organismos interferentes en los cultivos [11].

A nivel químico, existen una gran diversidad de fungicidas, pero uno de los más utilizados son los compuestos azólicos. Los fungicidas azólicos conforman una amplia gama de compuestos usualmente utilizados para prevenir y curar infecciones por hongos en frutas, vegetales y plantas, por eso son utilizados en agricultura y también tienen usos en la farmacéutica ya que algunos de ellos son utilizados en humanos como medicamentos para tratar hongos de la piel [12]–[14]. El mecanismo de acción de estos fungicidas consiste en la inhibición de la enzima demetilasa, reduciendo la biosíntesis del ergosterol principal componente de la membrana de los hongos [12], [14].

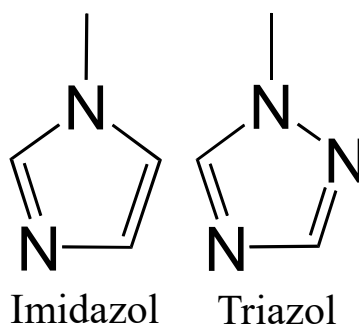


Figura 2 Estructura de los grupos imidazol y triazol.

Estructuralmente los compuestos azólicos se caracterizan por la presencia de un grupo amino, grupos aromáticos y grupos complementarios (OH, O, otros metales). Se clasifican por poseer de dos o tres átomos de nitrógeno, imidazoles o triazoles respectivamente [12], [15]. En la figura 2 observamos la estructura básica de los grupos imidazol y triazol.

La actividad antifúngica puede ser alterada por el entorno quiral en que actúe. En la actualidad, los estudios del comportamiento de cada uno de los enantiómeros es reducido aunque si bien los compuestos más estudiados son los tipos conazol y amidas [16]. Se conoce que para el diniconazol el enantiómero R posee actividad fúngica mayor que el enantiómero S, este último se caracteriza por tener mayor actividad en la regulación del crecimiento de las plantas [16]. Otro ejemplo es el cyproconazol estudiado en pepinos, que presenta cuatro estereoisómeros todos con actividad antifúngica siendo el enantiómero 2S, 3S el que presentan mayor actividad y el enantiómero 2R, 3S el de menor actividad [17]. En los procesos de degradación también se observan discrepancias entre los enantiómeros: por ejemplo, el tebuconazol probado en conejos presenta una cinética de pseudo primer orden, siendo el enantiómero R el que se degrada más fácilmente en el plasma sanguíneo [16].

1.3. Técnicas de análisis de sustancias quirales

En los últimos años, la mayoría de empresas química y farmacéuticas, por la necesidades sociales, ambientales y económicas, han aumentado su interés en vender productos enantioméricamente puros [18]. La ciencia ha avanzado en la innovación de mecanismos de síntesis más eficientes, el acceso a materias primas quirales y el desarrollo de procesos de fabricación y analíticos para este tipo de sustancias. Esto ha abierto nuevas líneas de investigación en el campo de la Química Analítica para poder desarrollar métodos que permitan separar, identificar y cuantificar los enantiómeros de las mezclas racémicas y adaptarlos a los procesos de producción. Los métodos más usuales para el análisis de enantiómeros son variados, pero se pueden agrupar en dos principales, los polarimétricos y los cromatográficos. A continuación, se describe cada uno de ellos:

1.3.1. Métodos polarimétricos

Los métodos ópticos para el análisis de enantiómeros son principalmente la dispersión óptica rotatoria y el dicroísmo circular, ambos están basados en la interacción entre la luz polarizada en el plano y los analitos que presentan actividad óptica. Ambos manifiestan la desventaja que no pueden separar las sustancias quirales solo identificarlas, por esta razón usualmente se utilizan para aplicaciones cualitativas. Pero con el tiempo se han llegado a acoplar a técnicas de separación para emplearse como detectores y así lograr aplicaciones cuantitativas. A continuación, se describen cada uno de los métodos ópticos mencionados:

- **Dispersión óptica rotatoria:** Un haz de luz polarizado en un plano, se puede descomponer en dos componentes iguales en magnitud, pero polarizados circularmente en sentidos opuestos: derecha e izquierda. Cuando este haz de luz se hace pasar por una sustancia ópticamente activa, si los índices de refracción de la sustancia son distintos para los dos componentes circulares, se produce una rotación en el plano de polarización, es decir, se produce una rotación óptica como consecuencia de que las velocidades de propagación de los componentes polarizado circularmente son diferentes. Si la velocidad de propagación del componente polarizado circularmente a la derecha es mayor veremos una rotación a la derecha (dextrógiro) y viceversa (levógiro) [19]. Esta rotación varía según la longitud de onda, la concentración de la sustancia y la temperatura. Para sustancias racémicas, la rotación óptica es nula puesto que los dos enantiómeros se encuentran en la misma proporción. Usualmente la rotación óptica se mide por medio un polarímetro (si se hace una medida a longitud de onda fija) o espectropolarímetro (si se mide la variación de la rotación óptica con la longitud de onda). Esta técnica presenta la desventaja de ser poco sensible y debe

ser comparada con el enantiómero puro [20]. La variación de la rotación óptica con la longitud de onda se conoce como dispersión óptica rotatoria [21].

- **Dicroísmo Circular:** El dicroísmo circular es un proceso de absorción y se observa cuando la absorción de los componentes polarizados circularmente es distinta, dando como resultado una polarización elíptica y a esta diferencia desigual de absorción se le conoce como dicroísmo circular [19], [21]. El dicroísmo circular de las sustancias fue estudiada por los científicos Biot y Fresnel [22].

Una sustancia quiral es posible que se produzca dos fenómenos de forma simultánea y sería posible observar el efecto Cotton, que se basa en un cambio brusco entre la dispersión óptica y el dicroísmo circular en las proximidades de las bandas de absorción de las sustancias.

El efecto Cotton se observa en un gráfico al representar de la elipticidad frente a la longitud de onda, con un máximo y un mínimo, conocidos como pico y pozo, respectivamente. Este fenómeno se dará en zonas donde se produce absorción de la radiación, la elipticidad (o rotación óptica) aumentará drásticamente y al pasar por el punto máximo de absorción, cruzará el cero, para luego crecer en el signo contrario [19], [21].

Hay que tener en cuenta que no todas las sustancias quirales poseen dicroísmo circular ya que para esto tiene que producir una absorción de la luz polarizada, en cambio todas estas sustancias quirales poseerán rotación óptica. Por tanto, ambas técnicas son complementarias entre sí.

1.3.2. Métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos permiten la separación y cuantificación de las sustancias quirales y sus respectivas mezclas. Estos métodos constan de la mayor popularidad para el análisis de enantiómeros [23]. Entre las técnicas cromatográficas más utilizadas están [24], [25]:

- **Cromatografía de gases (GC):** se caracteriza por utilizar una fase móvil gaseosa, se utiliza por su alta reproducibilidad, sensibilidad y alta eficiencia. Ampliamente utilizada para compuestos quirales muy volátiles y térmicamente estables [2], [26], por eso su desarrollo ha quedado en compuestos muy específicos.

- **Cromatografía de Líquidos (LC):** se caracteriza por utilizar una fase móvil líquida. Es una de las técnicas más utilizada en las separaciones quirales, ya que es de uso habitual en laboratorios de análisis. El desarrollo de fases estacionarias quirales para cromatografía de líquidos ha sido muy grande en los últimos años. Hay que resaltar que la mayoría de ellas, o al menos las que presentan un mayor número de éxitos en lo que se refiere a separaciones enantioméricas; están diseñadas para trabajar en fase normal, lo cual implica el empleo de fases móviles que son mezclas de un disolvente orgánico apolar (hexano y heptano) y un disolvente orgánico polar miscible con el anterior y que se utiliza en una menor proporción. Debido a problemas de miscibilidad el disolvente orgánico polar más utilizado es casi exclusivamente 2-propanol, lo cual tiene una desventaja que es la elevada caída de presión a través de la columna y la limitación en cuanto a la composición de la fase móvil lo que también limita las posibilidades de separación. Por otro lado, también hay que tener en cuenta las implicaciones medioambientales del empleo de una fase móvil que es 100% un disolvente orgánico.

- **Cromatografía de Fluidos Supercríticos (SFC):** se caracteriza por utilizar como fase móvil, un fluido supercrítico. En las separaciones quirales la SFC se ha convertido en una poderosa alternativa debido a que las propiedades fisicoquímicas de los fluidos supercríticos permiten la separación de los compuestos quirales muy eficientemente y en tiempos más cortos que en LC, además la mayor parte de la fase móvil es CO₂ por lo que la SFC es considerada una técnica más verde [16], [27], [28], y además es posible utilizar un abanico más amplio de disolventes orgánicos polares; con lo que se abren mayores posibilidades a la hora de conseguir la separación enantiomérica. Sobre ella profundizaremos en el apartado siguiente.

1.4. Cromatografía de Fluidos Supercríticos

La cromatografía de fluidos supercríticos (SFC, por su siglas en inglés Supercritical Fluid Chromatography) es una técnica cromatográfica que utiliza como fase móvil un fluido que se encuentra a presión y temperatura superior al punto crítico termodinámico (T_c, P_c) [29], a este estado se le denomina como fluido supercrítico [30]. Estos fluidos tienen propiedades intermedias entre los líquidos y los gases, lo que les permite ser buenos sustitutos de solventes orgánicos [31].

El estudio de los fluidos supercríticos se remonta a 1822. Fue el Barón Charles Cagniard de la Tours, quien definió el término. De la Tours observó que una sustancia gaseosa por encima de una temperatura específica (T_c) no cambiara a fase líquida, por más que se aumente la presión y fue en 1869 que Thomas Andrews definía el punto crítico para el CO₂ [29], [32]. Pero no se conoció su propiedad como solvente extractivo hasta en 1879, por los estudios realizados por Hannay y Hogarth [29]. Y fue hasta 1962 que se comenzó a estudiar los fluidos supercríticos como fase móvil en cromatografía. En principio, se utilizó la cromatografía de fluidos supercríticos, como una ampliación a la cromatografía de gases. La primera aplicación en que se utilizó fue para separar derivados de la porfirina, ya que estos se descomponen con la temperatura, por eso se usaron diclorodifluorometano y monoclorofluoroetano como fase móvil a presiones entre los 70 y 100 atm, con lo cual se logró recuperar y purificar con éxito estos derivados [29].

Los fluidos supercríticos se consideran como un cuasi estado de la materia [32]. Este estado posee propiedades únicas, intermedias entre líquidos y gases, que hace que estos fluidos sean únicos como fases móviles. Estas son:

- La densidad y poder de solvatación es similar a los líquidos, lo que provoca que la solubilidad sea mayor que en gases, ya que la interfaz en el punto crítico entre las fases líquido y gas desaparece lo que permite una mejor interacción entre los analitos y la fase móvil [29], [30], [33].
- La viscosidad es similar a los gases [30], [31], y por tanto inferior a los líquido. Esto se considera como una ventaja con respecto a otras técnicas, ya que aumenta las propiedades hidrodinámicas, por ejemplo: de este modo, disminuye las caídas de presión en la columna cromatográfica y permite utilizar flujos más altos para reducir los tiempos de análisis, comparados con el HPLC [32], [34].
- La tensión superficial es muy baja en los fluidos supercríticos, por tanto aumenta la capacidad de penetración del fluidos en las matrices, aumentando así la transferencia de materia [32], [34].
- La difusividad es similar a los gases, debido a que la viscosidad es drásticamente inferior a los líquidos y la baja tensión superficial, provoca que los fenómenos de transferencia se vean favorecidos y por consiguiente se mejoran los procesos de separación [29]–[31].

- La presión y la temperatura son parámetros operativos que permiten controlar las separaciones cromatográficas utilizando SFC. La densidad es una función de estos parámetros y está relacionada con la retención de los analitos [33]. Por tanto, el poder controlar la temperatura y presión permite separar una amplia gama de compuestos [30].

Tabla 1. Parámetros Críticos de Sustancias

Sustancia	Presión Crítica (bar)	Temperatura Crítica (K)	Densidad Crítica (mol/L)
Agua	220.60	647.20	17.90
Dióxido de Carbono	73.67	304.21	10.66
Metanol	81.00	513.00	8.51
Etanol	63.00	514.00	6.00
2-propanol	-	508.97	-
Amoniaco	113.00	405.50	-
Acetona	48.00	508.00	4.49
n-Propano	42.50	369.90	5.10
n-Hexano	30.20	507.60	2.71

Elaboración propia. Fuente: [35]–[44]. Se realizó un promedio de los parámetros críticos publicados en la base de datos.

Como hemos discutido las propiedades supercríticas de un fluido están relacionadas con el punto crítico de estas sustancias, por tanto, se han medido las condiciones de presión y temperatura crítica de varios disolventes. En la tabla 1 se observan las propiedades críticas de algunos solventes comunes. El CO₂ es el mejor solvente para aplicaciones en SFC, tanto para extracción como para cromatografía [34], esto se debe a diversos criterios, algunos de ellos permiten denominarlo como solvente verde [34], [45], estos los describimos a continuación.

- Presión y temperatura crítica fácilmente alcanzables: las condiciones críticas para el CO₂ son relativamente bajas, como se observa en la tabla 1. La temperatura crítica es de 31.1 °C y la presión crítica es de 73.67 bares, por tanto, la temperatura es levemente superior al ambiente, lo que es una ventaja por reducir los costos energéticos.
- Toxicidad: el CO₂ es un gas que no es tóxico a bajas concentraciones, en comparación con otros solventes orgánicos cuya toxicidad es mucho más alta en todos los rangos de concentración.
- Inflamabilidad: es un producto que no es inflamable, por el contrario, se utiliza CO₂ presurizado para controlar incendios.
- Abundante y pureza adecuada: es un subproducto de muchas industrias y se encuentra muy fácilmente en la pureza requerida para este tipo de aplicaciones.
- Miscibilidad: posee buena solubilidad para muchos analitos. A pesar que para compuestos polares no es muy favorable, usualmente se adicionan solventes orgánicos para mejorar su miscibilidad.
- Baja absorbancia: tiene una baja absorbancia para detectores UV.
- Baja Viscosidad: a una densidad de 0.9 g/cm la viscosidad el CO₂ es de 0.1 cP, muy inferior a muchos solventes orgánicos.

- Baja tensión superficial.
- No deja residuos: las mezclas con otros compuestos son fácilmente purificables ya que, a temperatura y presión atmosférica, el CO₂ se volatiliza y los analitos son recolectados y muy a menudo disueltos en el modificador orgánico.
- Costo: su precio es relativamente bajo.
- No corrosivo: en comparación con otros fluidos es inerte con las superficies metálicas.

Sin embargo, el CO₂ presenta una desventaja: la baja solvatación con compuestos polares ya que es apolar. Por ese motivo, es usual que se le adicione un solvente orgánico que permita aumentar su polaridad, la solvatación y evite la excesiva retención cromatográfica de los analitos polares o su precipitación. A este compuesto se lo denomina modificador orgánico [29], [33], [34], y suele ser un alcohol (metanol y etanol, los más usuales), acetonitrilo, tetrahidrofurano o hexano, pero este último por su toxicidad se emplea en casos muy específicos [31]. El metanol es el modificador orgánico que más se utiliza en cromatografía de fluidos supercríticos, ya que con él se logran buenas resoluciones y retenciones de los analitos [26].

Las propiedades físico-químicas de las sustancias puras se ven alteradas cuando se adicionan modificadores orgánicos, lo que vuelve más complejo poder predecir el comportamiento y las propiedades críticas de estas mezclas [29], [34]. Por esta razón, usualmente, no se utilizan concentraciones de modificador mayores al 50 %, ya que, al incrementar la concentración del modificador, los parámetros críticos de la fase móvil se alejan de los correspondientes al CO₂ puro. A pesar de esto, se logra llegar a un estado intermedio, conocido como región subcrítica que mantiene las ventajas de la región crítica [29]. Por ejemplo: en una mezcla de CO₂-Metanol a una composición del 70-30%, el punto crítico se eleva dramáticamente llegando a 135 °C y 168 bares, muy superior al CO₂ puro [34]. Pero las condiciones de trabajo se mantienen constantes por lo tanto se mantiene en la región subcrítica.

El solo mero uso de modificadores, a veces no es suficiente, para mejorar las separaciones cromatográficas, por esta razón se utilizan aditivos que suelen ser compuestos como aminas alifáticas, ácidos polifuncionales carboxílicos [31] que permiten mejores definiciones de los picos cromatográficos. Estos aditivos tienen diversos mecanismos de acción que favorecen una mejor separación, pero no se conocen con exactitud. Un mecanismo sería la interacción con los sitios de más fuerte adsorción de la fase estacionaria, compitiendo con analitos. Otro mecanismo sería en el aumento del poder como solvente del fluido, aumentando así su polaridad y la solvatación. También el aditivo puede aumentar el grado de ionización de los analitos a través de la modificación del pH [29]. Los aditivos se adicionan por regla general de la siguiente manera: cuando se trabaja con solutos ácidos se agregan aditivos ácidos. Si se separan solutos básicos se agregan aditivos básicos y finalmente si se trata de solutos neutros usualmente se utilizan mezcla de ácidos y bases o sales [31].

La utilización de los fluidos supercríticos, tanto en extracciones como en cromatografía, ha tenido su auge en los últimos años. En el ámbito de la cromatografía, la aplicación más relevante, aunque no la única, es el estudio de sustancias quirales, tanto por la necesidad de estudiar estas sustancias como por las bondades de este tipo de cromatografía. Tal ha sido el desarrollo de esta técnica, que en el área de las separaciones quirales ha demostrado ser superior a la de HLPC y GC [31].

La primeras separaciones quirales, utilizando SFC, se remontan a los años ochenta, cuando se trató de separar pares de enantiómeros de óxidos de fosfina utilizando CO₂ supercrítico y adicionando modificadores orgánicos, metanol, etanol y 2-propanol [31]. El estudio de la separación de fungicidas quirales por SFC no se dio hasta el año 1999, separando ketoconazol e itraconazol en columnas de amilosa [46]. A partir de esas investigaciones, se han desarrollado nuevas fases estacionarias quirales ampliando los mecanismos de interacción con el fin de conseguir enantióseparaciones más eficientes y para un mayor número de compuestos.

La separaciones cromatográficas por SFC necesitan una instrumentación particular, que constituye una modificación de la instrumentación de HPLC [29]. En la figura 3, se observa el esquema básico de un sistema de SFC que consiste principalmente en: (1) suministro de fase móvil y (2) modificador orgánico, (3,4) bombas para el modificador orgánico y CO₂, (5) una válvula de mezcla del CO₂ y modificador, (6) inyector de muestras, (7) horno donde se termostata la (8) columna cromatográfica, (9) detector, (10) regulador de presión, también conocido como restrictor, (11) deshecho y (12) registrador/ordenador.

En la instrumentación de SFC cabe destacar la importancia de las bombas que tienen que estar acondicionadas con un refrigerante por la licuefacción de los modificadores orgánicos. Por otro lado, el restrictor es el responsable de controlar de contrapresión del sistema. En la figura 3, la zona de color naranja es la que se encuentra en una presión controlada para lograr las condiciones críticas tanto de CO₂ como del modificador orgánico [31].

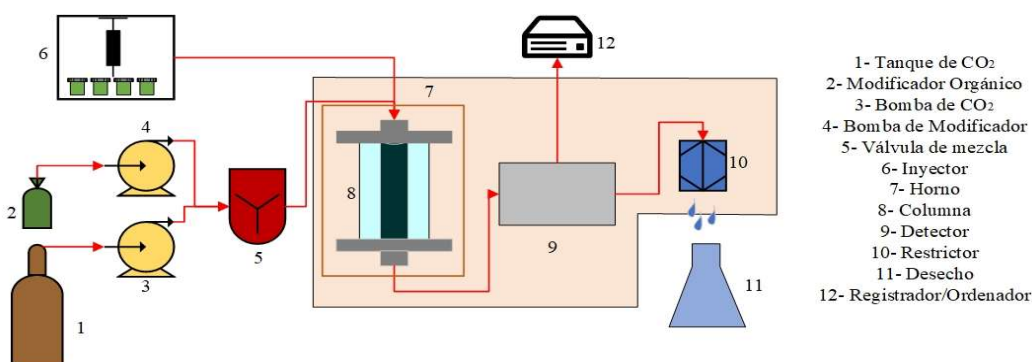


Figura 3 Esquema de instrumentación de SFC.

1.4.1. Fases estacionarias quirales

Las sustancias quirales tiene un comportamiento característico en ambientes quirales, como se ha señalado anteriormente. Esto ha llevado a desarrollar fases estacionarias que permitan este ambiente químico para habilitar las separaciones de estos compuestos. Estas fases se diferencian por poseer un selector quiral unido a un núcleo de sílice o alúmina y se les denomina fases estacionarias quirales (CPS, Chiral Phase Stationary). Usualmente pueden ser ciclodextrinas, proteínas, éteres corona, polisacáridos, poliacrilamidas, tensoactivos poliméricos, antibióticos macrocíclicos y alcaloides del ergol aunque no todas utilizadas en SFC [18,19]. Las interacciones entre la fase estacionaria y los analitos pueden ser múltiples e incluyen interacciones secundarias del tipo enlaces de hidrógeno, interacciones Π - Π , dipolo-dipolo, impedimento estérico, interacciones hidrofóbicas y electrostáticas [20]. Las CPS más utilizadas son las basadas en polisacáridos para el uso en SFC, especialmente las derivadas de celulosa y amilosa [19] y ciclodextrinas son menos utilizadas pero en aplicaciones medioambientales en HPLC, especialmente en el análisis de plaguicidas todavía se utilizan [18].

Las CPS desarrolladas en ciclodextrinas se caracterizan por tener enlazadas de 6 a 8 unidades de α -D-glucopirronosa, un polisacárido derivado del almidón. Este genera una cavidad generalmente hidrófoba y las uniones hidroxilo provocan un mayor número de interacciones, lo que le permite ser un buen selector quiral. En la figura 4, se observa la estructura básica de una ciclodextrina. En la naturaleza se han reconocido tres tipos de ciclodextrinas, diferenciadas por su capacidad de separación quiral y el tamaño de la cavidad [19], [30]. Este tipo de fase estacionaria no ha sido empleada ampliamente en SFC ya que el CO_2 , puede interferir en la separación porque las moléculas de CO_2 competirán con los analitos en las cavidades de las ciclodextrinas. Aun no se tiene claro el comportamiento de estas fases en SFC [31].

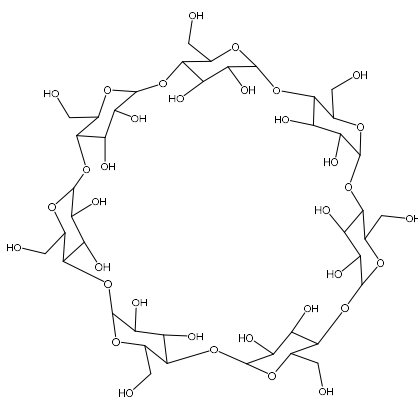


Figura 4 Ciclodextrina.

Las fases caracterizadas por poseer polisacáridos como selectores quirales son las más utilizadas en SFC, debido a su gran aplicabilidad a una amplia cantidad de compuestos. Los dos tipos principales de fases estacionarias derivadas de polisacáridos son: los fenilcarbamatos y los derivados de benzoatos. Los primeros, están constituidos fundamentalmente por los tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulosa o amilosa, y son los que presentan enantióseparaciones más eficientes [31].

El mecanismo de acción en la discriminación enantiomérica cuando se utilizan derivados de fenilcarbamato, se basa en la diferente interacción de los enantiómeros con los grupos carbamatos a través de enlaces de hidrógeno, interacciones π - π o dipolo-dipolo inducido [2]. Para el caso de los fenilcarbamatos de celulosa este mecanismo de separación se basa en la interacción del analito con los grupos fenilos y sus respectivos sustituyentes, lo que determinará su capacidad de separación [20]. Los fenilcarbamatos que dan lugar a mejores separaciones se identifican por dos criterios: el primero, la capacidad de extracción o donación de electrones, al poseer halógenos o grupos alquilo, respectivamente. Esto provoca una alteración en la polaridad, por efecto inductivo, del grupo carbamato permitiendo así una interacción entre los grupos funcionales de los analitos quirales y los grupos derivados de celulosa, es así que los grupos fenilos sustituidos con grupos polares se ha encontrado poco o nulo reconocimiento quiral, ya que este no generara una perturbación en el grupo carbamato. El segundo criterio es el tipo de ordenación de los grupos sustituyentes donde los para-sustituidos son más eficientes que los orto-sustituidos [20].

En el caso de los derivados de amilosa el mecanismo de acción es el mismo que en los de celulosa al introducir diferentes grupos extractores de electrones, grupos halógenos o grupos alquilo, ya que alteran el grupo carbamato de forma inductiva. En cambio, si se tiene en cuenta la posición de los sustituyentes en el grupo fenilo se ha observado que los orto- presentan mejores reconocimientos quirales que los para-, sucediendo lo contrario que con las de celulosa [20].

1.4.2. Evaluación de las separaciones enantiómericas.

La enantioseparación de compuestos en SFC depende de muchas variables: la elección de la fase estacionaria, la fase móvil, las condiciones de presión y temperatura óptima. A la hora de evaluar una separación cromatográfica, los parámetros habitualmente empleados son:

Factor de capacidad o factor de retención (k): este parámetro está relacionado con el equilibrio de distribución del analito entre la fase móvil y la fase estacionaria y proporciona información sobre lo retenido en la columna. El valor del factor de capacidad se calcula mediante la ecuación 1. En la literatura, se encuentra que un factor de capacidad superior a 10 se interpreta como un tiempo excesivamente alto para lograr la separación. Por el contrario, si el factor de capacidad es menor a 1 es posible que el analito eluya muy cerca del tiempo muerto y/o del disolvente. Habitualmente se requiere que el factor de capacidad se situé entre los valores de 1 a 10, de manera óptima [47].

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Ecuación 1: Factor de Capacidad.

Donde:

k'= Factor de capacidad.

t_r= Tiempo de retención del analito a analizar.

t_m= Tiempo muerto.

Factor de selectividad o factor de separación: Este factor proporciona información sobre la retención entre los compuestos estudiados, es decir, sobre la selectividad de la separación. Este factor depende de la naturaleza de fase estacionaria, como de la temperatura de operación de la columna cromatográfica de forma similar que el factor de capacidad. Su expresión matemática la observamos en la ecuación 2, que relaciona los tiempos corregidos de los compuestos estudiados y se simboliza por α [24].

$$\alpha = \frac{t_{r1} - t_m}{t_{r2} - t_m} = \frac{k'_1}{k'_2}$$

Ecuación 2: Factor de Selectividad.

Resolución: La resolución es un factor que nos indica la separación entre dos picos cromatográficos teniendo también en cuenta la anchura de la banda cromatográfica. Es función de la selectividad, del factor de capacidad y de la eficacia de la columna. Se calcula relacionando la distancia entre los picos estudiados y el ancho promedio de estos. En la ecuación 3, se presenta la expresión matemática para este factor [20].

$$R_{1-2} = 1.8 \times \frac{t_{r1} - t_{r2}}{W_1 + W_2}$$

Ecuación 3: Resolución.

Donde:

R₁₋₂=Resolución entre compuesto 1 y compuesto 2.

t_{r1}=Tiempos de retención

W₁=Ancho a la altura media de pico

1.4.3. Efecto de la temperatura en las separaciones enantioméricas.

La presión y la temperatura son variables críticas para controlar las separaciones quirales en SFC. Pero la mayoría de las separaciones enantioméricas se llevan a cabo a temperaturas entre 20 y 40 °C ya que a mayores temperaturas no suponen una mejoría en la separación quiral y la fase estacionaria puede dañarse [26], por el contrario no se baja a menor de 20 °C, ya que limita la eficacia de la separación, debido a que la densidad a temperatura muy bajas se modifica drásticamente afectando la disolución de los analitos en la fase móvil, también produce un ensanchamiento de la banda cromatográfica [48].

En muchos trabajos recientes se estudia la relación entre la temperatura y los factores de capacidad de los analitos. La ecuación de Van't Hoff establece que existe una relación lineal entre el logaritmo neperiano del factor de selectividad y el inverso de la temperatura absoluta, tal como se muestra en la ecuación 4 [48].

$$\ln \alpha = -\frac{1}{T} * \frac{\delta\Delta H^\circ}{R} + \frac{\delta\Delta S^\circ}{R}$$

Ecuación 4. Ecuación de Van't Hoff.

A través, de esta expresión matemática, se obtienen los parámetros termodinámicos de la separación quiral, donde $\delta\Delta H^\circ$ y $\delta\Delta S^\circ$ representan la variación de la entalpia y la entropía de la interacción de los enantiómeros con la fase estacionaria respectivamente, R es la constante de gases ideales y T la temperatura absoluta de trabajo. De esta misma expresión, se puede calcular la temperatura de isoelución, la cual se define como la temperatura en la cual dos enantiómeros coeluyen, cuando esta temperatura es superada el orden de elución de los enantiómeros se invierte y los enantiómeros vuelven a separarse. Cuando se representa $\ln\alpha$ frente al inverso de la temperatura, la temperatura de isoelución sería aquella para la cual $\ln\alpha$ se anula ($\alpha=1$) [48].

La temperatura afecta las separaciones quirales desde dos puntos, el primero de ellos el cinético relacionado con la viscosidad y el coeficiente de difusión; ya que al elevar la temperatura la viscosidad disminuye y el coeficiente de difusión aumenta, aumentando así la solubilidad de los analitos en la fase móvil, pero esto no implica necesariamente un aumento o disminución de la retención, sino que depende del compuesto estudiado. El segundo, es el termodinámico, que está relacionado con los factores de resolución y factores de selectividad, como lo hemos mencionado con la ecuación de Van't Hoff [19], [49], [50].

Desde un punto de vista termodinámico la retención y la selectividad están controladas por dos términos: termino entrópico que es independiente de la temperatura y el entálpico que disminuye a medida que la temperatura aumenta [19], [49], [50]. Si $\delta\Delta H^\circ$ y $\delta\Delta S^\circ$ son independientes de la temperatura, al representar $\ln\alpha$ frente al inverso de la temperatura absoluta se obtendrá una línea recta y se podrá calcular el valor de la temperatura de isoelución (aquella donde las contribuciones entálpicas y entrópicas a la selectividad se compensan y los dos enantiómeros coeluyen). Por encima de la temperatura de isoelución se produce una inversión en el orden de elución de los enantiómeros y el signo de la variación en la energía libre de Gibbs ($\Delta\Delta G^0$) está controlado por la entropía ($\Delta\Delta S^0$) [49], [50]. Por debajo, el signo de $\Delta\Delta G^0$ está controlado por la entalpia ($\Delta\Delta H^0$) [19], [49], [50].

2. Objetivos

2.1. General

Estudiar la separación enantiomérica de siete fungicidas de uso comercial utilizando la técnica de cromatografía de fluidos supercríticos.

2.2. Específicos

Estudiar el comportamiento de diferentes fases estacionarias, para posteriormente seleccionar las más adecuadas.

Estudiar el efecto del tipo y concentración de modificador orgánico en la separación enantiomérica.

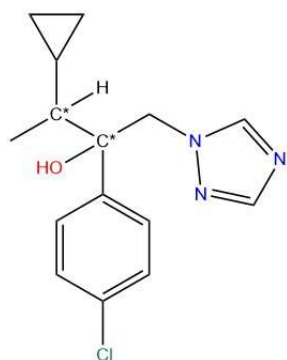
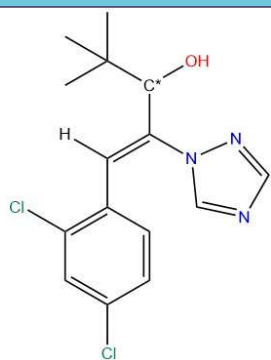
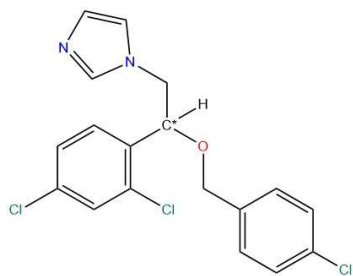
Evaluar la influencia de la temperatura en la separación quiral de los siete fungicidas estudiados.

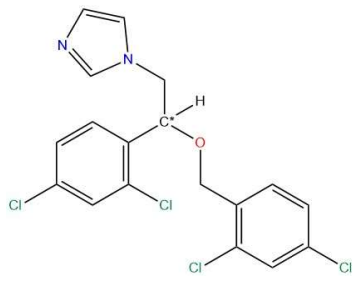
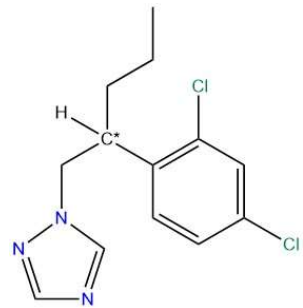
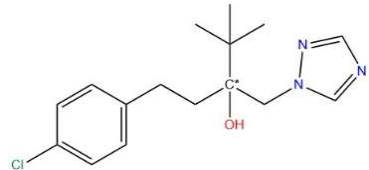
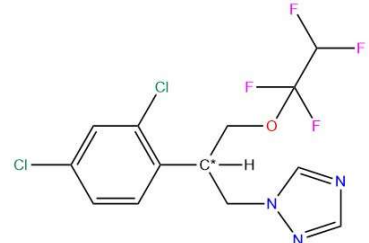
3. Parte experimental

3.1. Fungicidas estudiados

En esta investigación se ha estudiado la separación enantiomérica de siete fungicidas quirales de uso comercial, dos de ellos caracterizados por tener grupos imidazol y los otros cinco grupos triazoles. Además, seis poseen un centro quiral y uno posee dos centros quirales. Los patrones utilizados de los fungicidas se encontraban como mezclas racémicas de los enantiómeros, a excepción del diniconazol en el que predominaba el enantiómero R y en estado sólido a excepción del tetraconazol que se encontraba en estado de líquido viscoso. Cada uno se preparó a una concentración de 1000 mg/L en metanol como solvente. En la tabla 2, se muestran los fungicidas estudiados, sus características estructurales, información general y sus principales usos:

Tabla 2 Fungicidas estudiados.

Nombre:	Cyproconazol	Fórmula Molecular:	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₃ O
Nombre IUPAC:	(2RS,3RS; 2RS,3SR)- 2-(4-chlorophenyl)-3-cyclopropyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)butan-2-ol		
Características estructurales:	es una sustancia caracterizada estructuralmente por poseer un grupo triazol, un cloro-benceno mono sustituido, un grupo hidroxilo (perteneciente a un alcohol terciario) y un ciclopropano. Posee una estereoisometría con dos centros quirales, en las posiciones 2 y 3 que proporcionan dos diastereoisómeros y cada uno de ellos dos enantiómeros entre sí.		
Usos:	es un fungicida de amplio espectro, principalmente utilizado para cereales y frutas. Controla eficientemente la roya, septoria, mildiu, etc.		
Nombre:	Diniconazol	Fórmula Molecular:	C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O
Nombre IUPAC:	(RS)-(Z)-1-(2,4-diclorofenil)-4,4-dimetil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pent-1-en-3-ol		
Características estructurales:	es una sustancia caracterizada estructuralmente por poseer un grupo triazol, un cloro-benceno di sustituido, un grupo hidroxilo (perteneciente a un alcohol secundario) y un enlace alqueno en la posición 1-2. Posee una estereoisometría con un centro quiral, en la posición 3, proporcionando dos enantiómeros.		
Usos:	es un fungicida utilizado en frutas y plantas ornamentales. Controla eficientemente los mohos en cereales y café.		
Nombre:	Econazol	Fórmula Molecular:	C ₁₈ H ₁₅ Cl ₃ N ₂ O
Nombre IUPAC:	(RS)-1-[2-[4-clorofenil]metoxy]-2-(2,4-diclorofenil)etil]-1H-imidazole		
Características estructurales:	es una sustancia caracterizada estructuralmente por poseer un grupo imidazol, dos cloro-bencenos, uno di sustituido y otro mono sustituido, un grupo éter. Posee una estereoisometría con un centro quiral, en la posición 2, proporcionando dos enantiómeros.		
Usos:	es un fungicida aprobado para el uso en humanos. Utilizado para controlar la sarna, el pie de atleta, la candidiasis y la tiña		

Nombre:	Miconazol	Fórmula Molecular:	$C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$
Nombre IUPAC:	(RS)-1-[2-(2,4-diclorophenyl)-2-[2,4-diclorophenyl)methoxy]ethyl]-1H-imidazole		
<p>Características estructurales: es una sustancia caracterizada estructuralmente por poseer un grupo imidazol, dos clorobencenos di sustituidos, un grupo éter. Posee una estereoisometría con un centro quiral, en la posición 2, proporcionando dos enantiómeros.</p> <p>Usos: es un fungicida aprobado para el uso en humanos. Utilizado para controlar la candidiasis, la onicomicosis y la tiña</p>			
Nombre:	Penconazol	Fórmula Molecular:	$C_{13}H_{15}Cl_2N_3$
Nombre IUPAC:	(RS)-1-[2-(2,4-diclorophenyl)pentyl]-1H-1,2,4-triazole		
<p>Características estructurales: es una sustancia caracterizada estructuralmente por poseer un grupo triazol y un cloro-benceno di sustituido. Su estructura se compone de una estereoisometría con un centro quiral, en la posición 2, proporcionando dos enantiómeros.</p> <p>Usos: es un fungicida para el tratamiento de hongos patógenos en vinos, frutas, lúpulo y vegetales. Es utilizado para el control de plagas como Blanquilla, Scab, Ring Spot y Roya.</p>			
Nombre:	Tebuconazol	Fórmula Molecular:	$C_{16}H_{22}ClN_3O$
Nombre IUPAC:	(RS)-1-(4-clorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)pentan-3-ol		
<p>Características estructurales: es una sustancia caracterizada estructuralmente por poseer un grupo triazol, un cloro-benceno mono sustituido y un grupo hidroxilo (perteneciente a un alcohol terciario). Posee una estereoisometría con un centro quiral, en la posición 3, proporcionando dos enantiómeros.</p> <p>Usos: fungicida principalmente usado para enfermedades foliares en cereales y otros cultivos. Utilizado en el control de plagas Tizón, Mancha amarilla en hoja, Blanquilla y Punto negro.</p>			
Nombre:	Tetraconazol	Fórmula Molecular:	$C_{13}H_{11}Cl_2F_4N_3O$
Nombre IUPAC:	(RS)-1-[2-(2,4-diclorophenyl)-3-(1,1,2,2-tetrafluoroethoxy)propil]-1H-1,2,4-triazole		
<p>Características estructurales: es una sustancia caracterizada estructuralmente por poseer un grupo triazol, un cloro-benceno di sustituido y un grupo éter y un compuesto fluorado. Posee una estereoisometría con un centro quiral, en la posición 3, proporcionando dos enantiómeros.</p> <p>Usos: fungicida principalmente usado en cereales y remolacha azucarera. Utilizado en el control de plagas Septoria y Rynchosporium</p>			

Elaboración propia. Fuentes: [44], [51]–[59]

3.2. Columnas y fases estacionarias

Para este trabajo de investigación se han estudiado dos columnas empaquetadas con fase quirales. En la tabla 3, se presentan la información de cada una de ellas. Todas son fases estacionarias derivadas de celulosa. En ambas fases estacionarias el selector quiral está adsorbido sobre sílice. Las dimensiones de las dos columnas son las mismas.

Tabla 3 Columnas cromatográficas a estudiar

Columna	Tamaño	Fase Estacionaria	Descripción
Columna Chiral OD	250x4,6 mm	tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulosa	Fabricante: Diacel Chemical Industries (Illkirch, Francia) Fase polimérica helicoidal depositada en un soporte de sílice de 10 µm Serial: OD00CE-HK032
Columna LUX Cellulose 2	250x4,6 mm	tris (3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulosa	Fabricante: Phenomenex (Torrance, EEUU) Fase polimérica helicoidal depositada en un soporte de sílice de 5 µm Serial No. 458095-3

Elaboración propia. Fuentes: Certificados de las columnas utilizadas.

3.3. Equipo Cromatográfico

El equipo cromatográfico utilizado para el desarrollo de esta investigación se describe a continuación y en la figura 5 se muestra el equipo utilizado:

Soporte de botellas: Bottle Stand; BS-2000-04; Jasco, Japón.

Bomba de suministro de CO₂: PU-2080-CO₂; CO₂ Delivery Pump; Serial No. A012161162; Jasco, Japón.

Bomba de Suministro de modificador: PU-2080 plus; Intelligent HPLC Pump; Serial No. C070860962; Jasco, Japón.

Regulador de presión: BP-2080 plus; Automatic back pressure regulator; Serial No. A014961164; Jasco, Japón.

Restrictor: BP-1580-81; Back pressure regulator; Serial No. A001760773; Jasco, Japón.

Interfase: LC-NetII/ADC; MAC Adress 00:CO:28:00:18:4F; Serial No. B212761095; Jasco, Japón.

Horno Cromatográfico: CO-2060 plus; Intelligent Column Thermostat; Serial No. B096660879; Jasco, Japón.

Inyector: AS-2059-SF plus; Autosampler for SFC; Serial No. B004061061; Jasco, Japón.

Detector: MD-2010 plus; Multiwavelength detector; Serial No. D073160870; Jasco, Japón.

Software cromatográfico: Chrom NAV; Versión: 1.09.02; 2003-2008; Serial No. 67M-KFR-00000915



Figura 5 Equipo utilizado para la investigación

3.4. Materiales y Reactivos

Los reactivos utilizados para el desarrollo de esta investigación se describen a continuación:

Metanol: CH₃OH, HiPerSolv CHROMANORM; 2.5 L; Reag. Ph. Eur. For HPLC Gradiente Grade; Francia.

Etanol: C₂H₅OH, Panreac Applichem; 2.5 L; Ethanol Absolut (UV-IR-HPLC); Barcelona, España.

2-propanol: C₃H₈O, Lab-Scan Analytical Science, 2.5 L, HPLC;; Gliwice, Poland.

Dióxido de Carbono: CO₂, Carburos Metalicos; Líquido; Aranjuez, España.

Cyproconazol: Polvo, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Agsburg, Germany

Diniconazol: Polvo, Dr. Ehrenstorfer GmbH; Agsburg, Germany

Econazol: Polvo, Sigma Aldrich, Madrid, España.

Miconazol: Polvo, Miconazole Nitrate Salt; Sigma Aldrich.

Penconazol: Polvo, Dr. Ehrenstorfer GmbH; Agsburg, Germany

Tebuconazol: Polvo, Riedel-deHaën.

Tetraconazol: Líquido Viscoso, Dr. Ehrenstorfer GmbH; Agsburg, Germany

Trietilamina: Líquido, Sigma Aldrich, Madrid, España.

Ácido trifluoroacético: Líquido, Sigma Aldrich, Madrid, España.

3.5. Metodología

El desarrollo metodológico que se siguió consta de cuatro etapas por columna cromatográfica estudiada. En la figura 6, se observa el diagrama de flujo para esta investigación. Como primer paso, se realizó una prueba preliminar para obtener el rango de concentración de modificador orgánico en el cual los enantiómeros se separan. Esta prueba preliminar consistió en inyectar, en régimen gradiente de concentración de modificador, alguno de los fungicidas. De la cual se obtendrán el rango de concentración de operación para este modificador.

La segunda etapa consistió en inyectar los siete fungicidas de régimen isocrático a las concentraciones definidas en la primera etapa por cada modificador orgánico. Para la tercera etapa, se seleccionó la combinación de modificador y concentración del mismo para evaluar la influencia de la temperatura en la separación quiral.

La cuarta parte y última, consistió en el análisis de los resultados obtenidos, evaluando el factor de capacidad, el factor de selectividad y la resolución de cada separación realizada. Finalmente se seleccionaron los mejores parámetros cromatográficos para la separación enantiomérica de cada uno de los siete fungicidas estudiados.

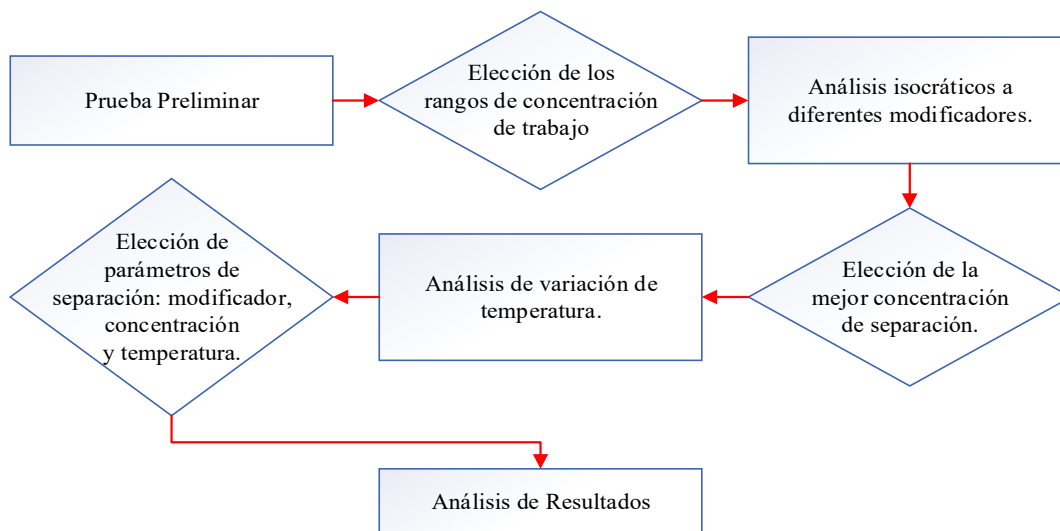


Figura 6 Diagrama de flujo para la separación.

4. Resultados

En el siguiente capítulo se discutirán los resultados obtenidos para la separación enantiomérica de los siete fungicidas estudiados, en las condiciones cromatográficas planteadas en el capítulo anterior. Primero se presentarán los modificadores orgánicos que se han utilizado y luego los resultados para columna OD y la columna Lux Cellulose 2.

4.1. Variables cromatográficas

Los modificadores orgánicos, como se ha mencionado anteriormente, son solventes que mejoran el poder de solvatación del CO₂ aumentando su poder como disolvente de compuestos polares. En esta investigación se evaluarán tres modificadores: Metanol, Etanol y 2-propanol. Estos se seleccionaron ya que en la literatura son los más utilizados en separaciones quirales. En la tabla 4, se presentan sus propiedades fisicoquímicas más importantes y los rangos de concentración con los cuales se trabajarán en la investigación.

Tabla 4 Modificadores orgánicos utilizados en la investigación

Modificador	Punto de fusión (K)	Punto de Ebullición (K)	Punto Crítico	Coefficiente de polaridad	Capacidad puente de hidrógeno donador	Capacidad puente de hidrógeno aceptor	Rango de trabajo
Metanol	176.1±1.0	337.8±0.3	81 bar 513 K	5.1	0.93	0.62	5-30%
Etanol	158.8±0.7	351.5±0.2	63 bar 514 K	4.3	0.83	0.77	5-30%
2-propanol	-	355.7±2.9*	- 509 K	3.9	0.76	0.95	5-20%

Elaboración propia. Fuente: [37]–[39], [44], [60], [61]. *Se realizó un promedio de los parámetros críticos publicados en la base de datos.

La presión y la temperatura son variables claves en las separaciones cromatográficas. Para el desarrollo de la investigación, se ha tenido en cuenta la experiencia del grupo investigador y se ha utilizado una presión de 150 bares que se fijó en el restrictor. En el caso del flujo se utilizó un flujo constante para todas pruebas realizadas, este flujo se definió en 2 mL/min.

4.2. Columna Chiral OD

La columna chiral OD, posee una fase estacionaria de tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulosa, como se describe en la tabla 3. Dicha columna se caracteriza por tener un sustituyente fenilo y este a su vez sustituido con dos metilos. El fenilo se enlaza a una unidad de ácido carbámico y este a unidades de celulosa, de esta forma se genera cavidades propicias para albergar o encerrar moléculas mejorando su retención, en la figura 7 se observa la molécula de esta fase estacionaria.

Siguiendo la metodología del esquema de la figura 6. Se comenzó con una prueba preliminar que consistió en realizar inyecciones en régimen gradiente de modificador orgánico en el que el porcentaje de modificador variaba desde 5 a 30 % con una tasa de cambio de 2.5% de modificador por minuto. Para las pruebas preliminares se utilizó como modificador orgánico metanol, ya que este presenta los mejores parámetros de separación en la revisión bibliográfica. Las condiciones de presión y temperatura y flujo de fase móvil fueron 150 bar, 35°C y 2 mL/min respectivamente.

Para ninguno de los fungicidas estudiados se obtuvo una buena separación enantiomérica. Para descartar influencia de cualquier otro factor se realizó una inyección en régimen isocrático, utilizando 20% de metanol. Este porcentaje se eligió ya que en la prueba de gradiente es la concentración en la que se observa cierta separación de los picos cromatográficos. En este caso, tampoco se logró mejorar la separación.

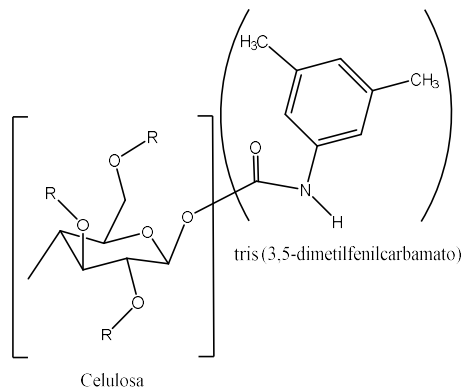


Figura 7. Estructura química de la fase estacionaria de celulosa tris(3,5-dimetilfenilcarbamato)

En la introducción se ha mencionado que, en cromatografía de fluidos supercríticos, usualmente se utiliza aditivos para mejorar las separaciones, y usualmente se sigue una regla general. Para este caso aplicando dicha regla se realizó una inyección con un aditivo mixto, de trifluoroacético y trietilamina en una composición de 0.1% de cada uno en metanol. Se realizó la inyección en estado isocrático a 20% de modificador, con los parámetros establecidos. Se observó el tiempo de retención de los enantiómeros se redujo en 2 minutos con respecto a la inyección sin aditivos, y también se redujo la anchura de pico, pero no logrando, de igual forma, la separación a línea base. A modo de ejemplo, en la figura 8 se muestran los cromatogramas obtenidos para el miconazol, con y sin aditivos.

Debido a que los resultados obtenidos no eran satisfactorios, se descartó el uso de esta columna. Ya que no se lograba la separación enantiomérica de los compuestos estudiados.

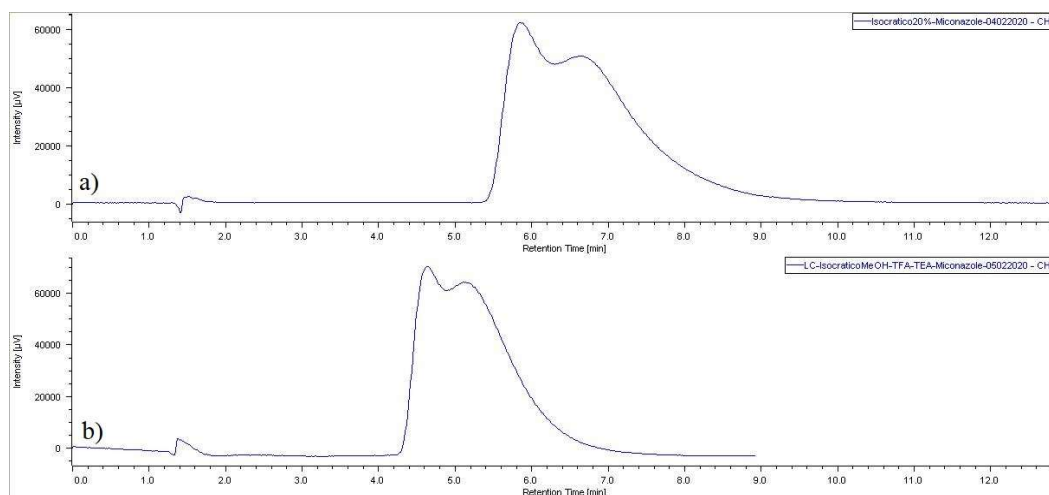


Figura 8; 8a cromatograma de miconazol a 20% metano en columna OD, 8b cromatograma de miconazol a 20 % con TFA y TEA al 0.1%; a temperatura de 35°C y presión de 150 MPa.

4.3. Columna Lux Cellulose 2

La columna Lux Cellulose 2, es una de las primeras fases estacionarias cloradas para la separación de enantiómeros, se caracteriza por poseer una fase estacionaria de tris (3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulosa, como se describe en la tabla 3. Se diferencia de la columna chiral OD que se sustituye un grupo metilo por un cloro y en una configuración orto en el anillo bencénico, en la figura 9 se observa la estructura química de esta fase estacionaria. La presencia de cloro en su molécula, un átomo muy electronegativo y altamente receptor de electrones lo que permite tener interacciones mucho más fuertes con otros grupos orgánicos que logra mejores retenciones.

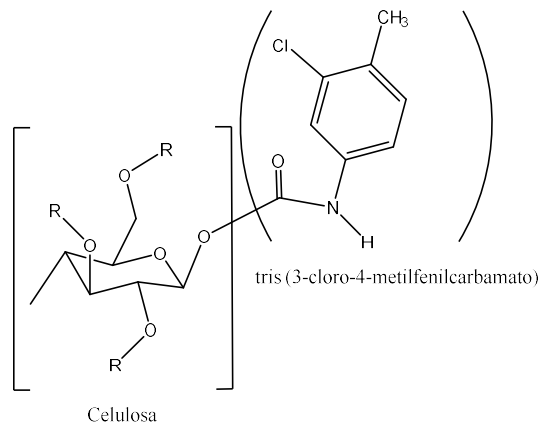


Figura 9 Estructura química de la fase estacionaria de celulosa tris(3-cloro-4-metilfenilcarbamato)

4.3.1. Pruebas preliminares

El análisis preliminar en la columna Lux Cellulose 2 se realizó para tres de los fungicidas estudiados, Cyproconazol, Miconazol y Tebuconazol, esto se llevó a cabo con un gradiente de modificador, antes mencionado, a una tasa de cambio de 2.5% por minuto durante 10 min, de forma similar que en la columna OD. Esta prueba preliminar se realizó con cada uno de los modificadores a estudiar, metanol, etanol y 2-propanol. Para los tres casos no se obtuvo separación a línea base de los fungicidas, con estos resultados se determinaron las concentraciones de modificador para realizar las pruebas en estado isocrático. En la figura 10 se presentan el esquema de las concentraciones seleccionadas para cada uno de los modificadores estudiados, para el caso de etanol y metanol se seleccionaron concentraciones y un rango de trabajo iguales ya que poseen un mismo comportamiento químico, y en la prueba preliminar la separación enantiomérica se observó en el tiempo equivalente a 20% de modificador. Por tanto, se seleccionó una concentración inferior y una superior para evaluar la influencia de los parámetros de factor de selectividad, factor de capacidad y resolución. El límite inferior se seleccionó de forma que no se produjese una retención excesiva de los compuestos y el superior como una solución de compromiso entre tiempo de retención y mantener una resolución cercana a línea de base. Para 2-propanol se seleccionaron una concentración del 10 y 20% por dos motivos, el primero de ellos porque este modificador posee una viscosidad alta, por eso en composiciones altas genera un aumento drástico en la contrapresión de la columna cromatográfica y el segundo motivo es que, al ser un modificador menos polar, la retención de los compuestos es mayor, por lo que utilizando porcentajes inferiores al 10% es de esperar que la retención sea muy elevada obteniéndose unos picos muy anchos.

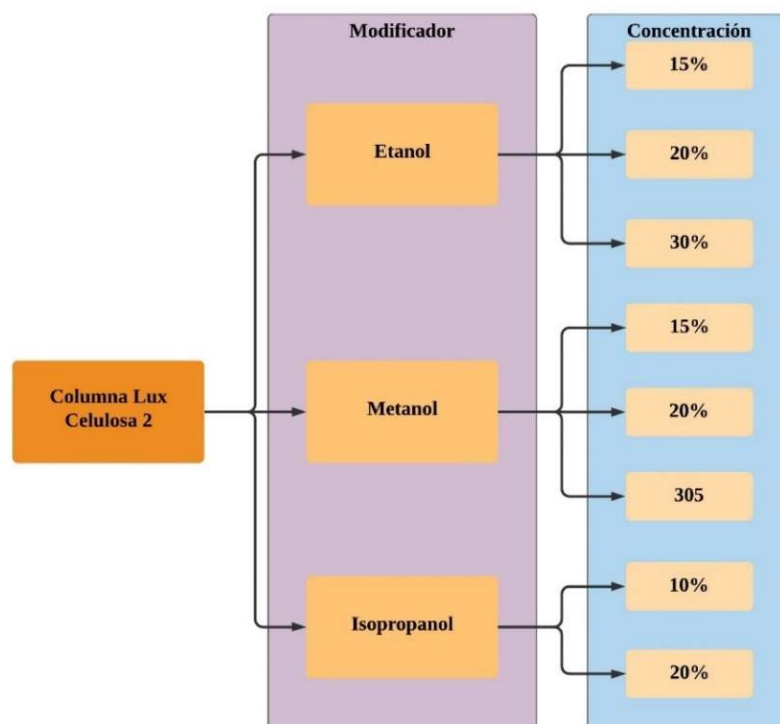


Figura 10 Diagrama de concentración para modificadores orgánicos de columna lux celulosa 2.

Los ensayos en régimen isocrático se realizaron a una temperatura constante de 35 °C, a un flujo y presión constante de 2 mL/min de fase móvil y 150 MPa, respectivamente. Las inyecciones se realizaron en el siguiente orden: diniconazol, econazol, miconazol, penconazol, tebuconazol, tetraconazol y cyproconazol; este orden se realizó aleatoriamente solo dejando el fungicida con cuatro enantiómeros al final de las inyecciones. Las pruebas se realizaron iniciando con la concentración más baja de modificador hasta la más alta. Este proceso se siguió para todas las inyecciones realizadas en las pruebas en régimen isocrático independiente del modificador orgánico utilizado.

4.3.2. Influencia del modificador

Se observó que, en los resultados obtenidos para los tres modificadores orgánicos estudiados, el tiempo de retención disminuía con respecto al incremento de la concentración del mismo, esto debido al aumento de la polaridad de la fase móvil. Dichos tiempos se presentan en la tabla 5 donde se observa la tendencia a la disminución para los siete fungicidas, al aumentar la concentración de modificador. En la figura 11 se muestra los cromatogramas para tebuconazol a las diferentes concentraciones de modificador orgánico.

En forma general se puede interpretar que para todos los compuestos estudiados el tiempo de retención aumenta en el orden metanol<etanol<2-propanol. A excepción del diniconazol que presenta un orden de elución diferente alternando el metanol con el etanol. En la figura 12 se muestran los cromatogramas para diniconazol con los diferentes modificadores estudiados, a una concentración de 20%, donde se observa el comportamiento de los fungicidas, para el cromatograma 15% metanol la escala es diferente al resto.

Tabla 5 Variación del tiempo de retención (min) con el porcentaje y tipo de modificador orgánico.

	Etanol			Metanol			2-propanol	
	15%	20%	30%	15%	20%	30%	10%	20%
Diniconazol-1	4.56	3.32	2.60	4.68	3.73	2.71	10.08	3.87
Diniconazol-2	4.97	3.56	2.69	5.27	4.07	2.89	11.00	4.11
Econazol-1	*	13.53	6.77	19.51	10.24	7.40	*	23.23
Econazol-2	*	17.28	8.28	23.43	12.05	8.63	*	32.55
Miconazol-1	*	17.36	8.24	23.77	15.80	9.08	*	28.01
Miconazol-2	*	21.28	9.85	28.32	18.68	10.51	*	36.23
Penconazol-1	8.60	6.23	4.39	7.65	5.99	4.39	18.29	7.85
Penconazol-2	10.25	7.29	4.99	8.77	6.76	4.89	22.95	9.63
Tebuconazol-1	8.77	6.08	3.85	7.99	5.75	3.87	26.47	8.15
Tebuconazol-2	11.09	7.57	4.53	9.96	7.01	4.53	33.72	9.92
Tetraconazol-1	4.11	3.20	2.72	3.83	3.27	2.60	7.40	3.53
Tetraconazol-2	5.71	4.31	3.35	5.28	4.32	3.21	11.71	4.88
Cyproconazol-1	6.51	4.64	3.17	6.17	4.73	3.23	16.89	5.77
Cyproconazol-2	8.89	6.15	3.84	8.01	5.89	3.88	25.04	7.72
Cyproconazol-3	12.13	8.23	4.81	10.63	7.47	4.77	33.68	10.27
Cyproconazol-4	16.83	11.15	6.09	14.81	10.08	6.23	*	14.21

*Retención mayor a 40 min.

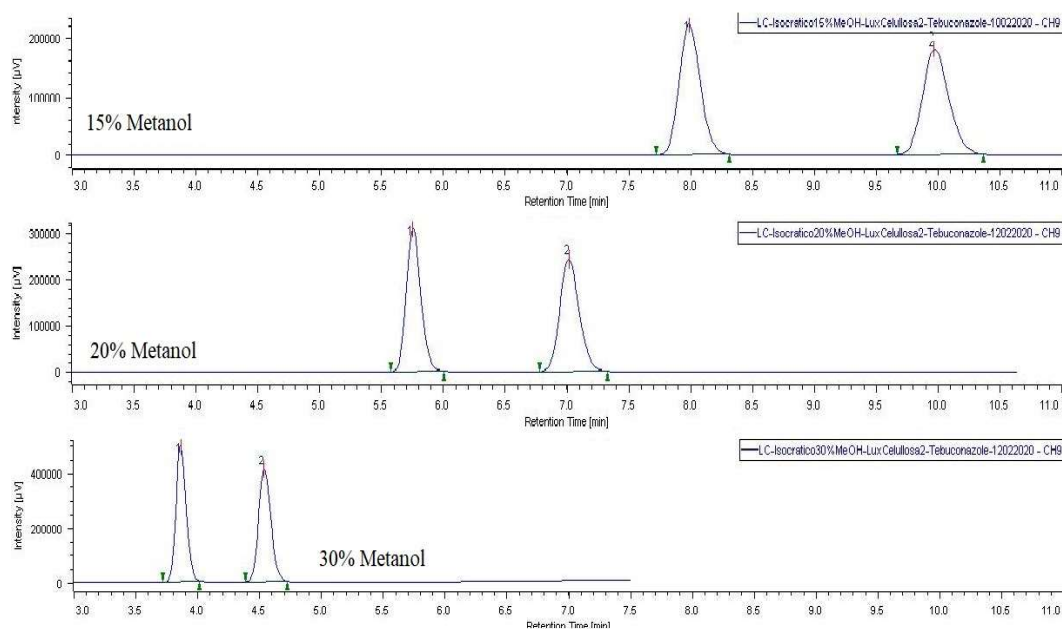


Figura 11 Cromatograma obtenidos para tebuconazol con diferentes concentraciones de modificadores orgánicos a 15%, 20% y 30% a 35°C y 2mL/min.

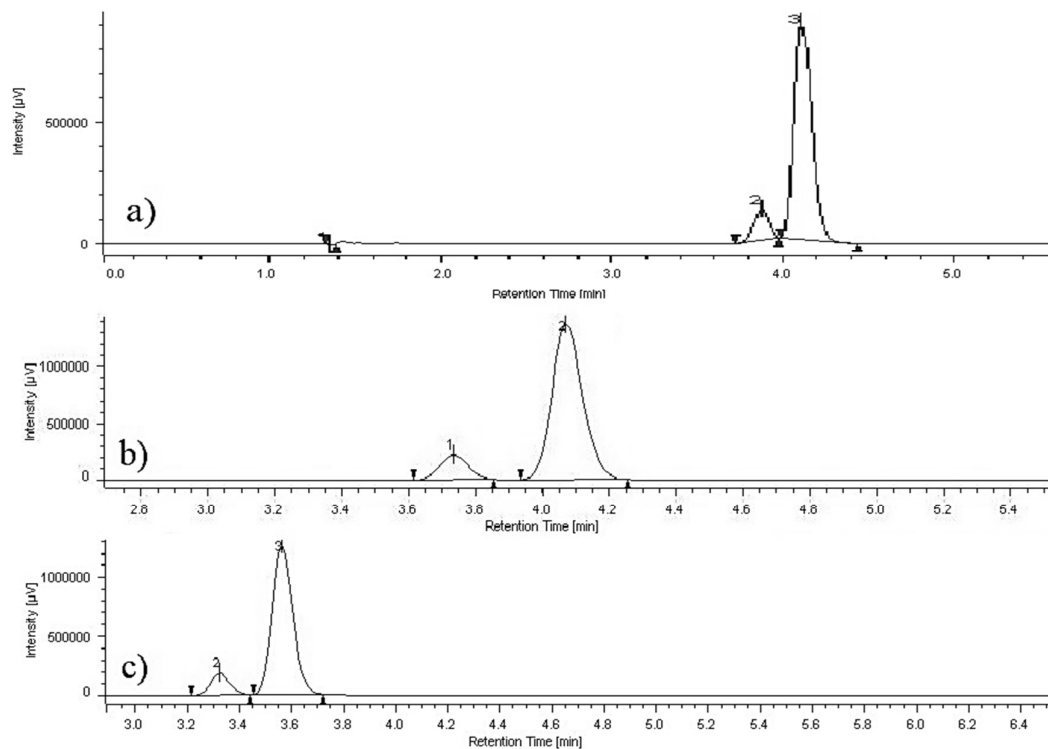


Figura 12 Cromatograma obtenidos para diniconazol con diferentes modificadores orgánicos a 20%, 35°C y 2mL/min. a) 2-propanol, b) metanol y c) etanol.

El que 2-propanol genere mayores tiempos de retención puede ser explicado por que su polaridad es la más baja de los tres solventes, mientras que el metanol el que presenta mayor polaridad. La mayor retención del diniconazol cuando se utilizó metanol es comparable con la retención obtenida con etanol que podría deberse a la presencia del doble enlace en su estructura, generando diferentes interacciones secundarias con la fase estacionaria.

Otra observación encontrada en los resultados es que la variación en los tiempos de retención, para el caso de metanol y etanol, se da más drásticamente en el cambio de concentración de 15% a 20% que de 20% a 30%, de forma general con algunas excepciones encontradas. Esto se atribuye a que la variación del porcentaje de modificador no genera una modificación lineal en la retención sino una variación de forma asintótica, esto debería de verificarse con mayor número de puntos de concentración de modificador.

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos para los factores de capacidad, selectividad y resolución utilizando diferentes modificadores orgánicos y porcentajes de los fungicidas estudiados, excepto el fungicida cyproconazol. Como puede observarse, a medida que aumenta el porcentaje de modificador, tanto el factor de capacidad como la selectividad y resolución disminuyen, si bien el efecto es diferente. Así mientras que el factor de selectividad disminuyó ligeramente, la disminución en el factor de capacidad es bastante más marcada. Esto es así para todos los modificadores estudiados. Si se mantiene fijo el porcentaje de modificador, los parámetros que más se vieron afectados por el cambio del tipo de modificadores son los factores de capacidad y la resolución; y hay que decir que la resolución fue más afectada por el cambio del tipo de modificador que por el porcentaje del mismo.

Tabla 6 Parámetros de separación cromatográfica para los fungicidas estudiados

	Modificador	k' 1	k' 2	α	R
Diniconazol	Metanol 15%	2.16	2.56	1.18	2.95
	Metanol 20%	1.06	1.24	1.17	2.08
	Metanol 30%	0.78	0.90	1.16	1.75
	Etanol 15%	2.23	2.52	1.13	2.05
	Etanol 20%	1.26	1.43	1.13	1.71
	Etanol 30%	0.49	0.54	1.11	0.76
	2-propanol 10%	6.13	6.78	1.11	1.88
	2-propanol 20%	1.79	1.96	1.10	1.38
Econazol	Metanol 15%	12.45	15.16	1.22	3.95
	Metanol 20%	4.37	5.32	1.22	3.37
	Metanol 30%	3.74	4.53	1.21	3.08
	Etanol 15%	*	*	*	*
	Etanol 20%	8.62	11.20	1.30	4.15
	Etanol 30%	2.91	3.78	1.30	3.83
	2-propanol 10%	*	*	*	*
	2-propanol 20%	15.75	22.47	1.43	4.83
Miconazol	Metanol 15%	15.98	19.23	1.20	3.95
	Metanol 20%	8.94	10.75	1.20	2.64
	Metanol 30%	4.57	5.45	1.19	2.97
	Etanol 15%	*	*	*	*
	Etanol 20%	10.95	13.65	1.25	3.73
	Etanol 30%	3.94	4.94	1.25	3.45
	2-propanol 10%	*	*	*	*
	2-propanol 20%	19.01	24.88	1.31	3.88
Penconazol	Metanol 15%	4.17	4.93	1.18	3.69
	Metanol 20%	2.84	3.33	1.17	3.29
	Metanol 30%	1.94	2.28	1.18	2.85
	Etanol 15%	5.09	6.26	1.23	3.05
	Etanol 20%	3.32	4.06	1.22	4.04
	Etanol 30%	1.63	1.99	1.22	3.25
	2-propanol 10%	12.07	15.39	1.28	5.67
	2-propanol 20%	4.23	5.33	1.26	4.71
Tebuconazol	Metanol 15%	4.44	5.78	1.30	5.59
	Metanol 20%	2.68	3.50	1.30	5.02
	Metanol 30%	1.52	1.96	1.29	3.97
	Etanol 15%	4.48	5.93	1.32	4.05
	Etanol 20%	3.26	4.31	1.32	5.19
	Etanol 30%	1.31	1.72	1.31	3.92
	2-propanol 10%	17.90	23.09	1.29	5.83
	2-propanol 20%	4.93	6.23	1.26	4.37
Tetraconazol	Metanol 15%	1.59	2.57	1.62	8.23
	Metanol 20%	1.09	1.77	1.62	7.21
	Metanol 30%	0.70	1.10	1.57	5.54
	Etanol 15%	1.59	2.60	1.63	5.05
	Etanol 20%	1.24	2.02	1.62	7.29
	Etanol 30%	0.63	1.01	1.60	5.12
	2-propanol 10%	4.19	7.20	1.72	10.17
	2-propanol 20%	1.57	2.55	1.62	7.57

*Retención superior a 40 min.

Diniconazol

En el caso del diniconazol, los factores de capacidad indican que la retención fue baja, pero se mantuvo en el intervalo válido (entre 1-10). Los valores obtenidos utilizando 30% de metanol o etanol fueron inferiores a 1, indicando que el tiempo de retención era muy cercano al tiempo muerto lo que podría dificultar el análisis, además que se observa que utilizando un 30% de etanol los picos cromatográficos no lograron resolverse a línea base.

Para diniconazol los mejores resultados se obtuvieron con metanol al 20% ya que los factores de capacidad fueron los más bajos dentro del rango aceptable, el factor de selectividad fue el segundo mejor obtenido y se consiguió una resolución que permite la separación a línea base de los enantiómeros, siendo la segunda mejor alcanzada. Con respecto a los tiempos de retención fueron los segundos más bajos sin afectar a los parámetros de separación, como se muestra en la tabla 5. En la figura 13 se presenta el cromatograma obtenido en las condiciones de separación.

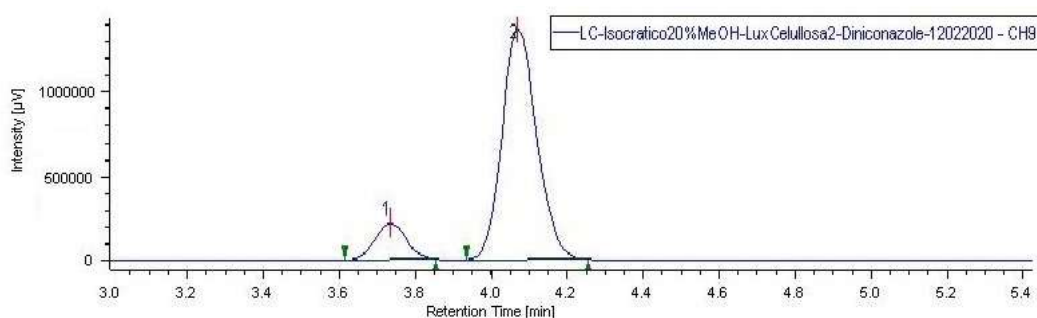


Figura 13 Cromatograma del diniconazol obtenido utilizando 20% metanol, 2 mL/min, 150 MPa y a 35°C.

Econazol

En el caso del econazol, la mayor resolución se obtuvo utilizando 2-propanol al 20% y la menor con un 30% de metanol, pero hay que señalar que para este compuesto se obtuvieron resoluciones altas con cualquier de los modificadores estudiados. El mejor valor del factor de selectividad se obtuvo utilizando 2-propanol al 20%

Con respecto a los factores de capacidad para el caso del econazol, se encontró que de las combinaciones estudiadas tres presentaron factores mayores de 10 indicando que el tiempo es excesivamente largo y se pierde cantidad de solvente innecesariamente, estas combinaciones corresponden a metanol al 15%, etanol al 20% y 2-propanol al 20%. Los mejores valores obtenidos dentro del intervalo de trabajo establecido (1-10), es decir los más bajos dentro del intervalo, corresponden a 30% etanol con 2.91 y 3.78 respectivamente para cada uno de los enantiómeros.

Para el econazol, los mejores resultados se obtuvieron con etanol al 30% ya que los factores de capacidad fueron los más bajos. El factor de selectividad fue el segundo mejor con un valor de 1.30 y se obtiene una resolución de 3.83 correspondiente a la mejor resolución dentro de las opciones válidas según el criterio del factor de capacidad y que permite la separación a línea base de los enantiómeros. Finalmente, los tiempos de retención son los más bajos obtenidos. En la figura 14 se presenta el cromatograma obtenido en las mejores condiciones de este fungicida.

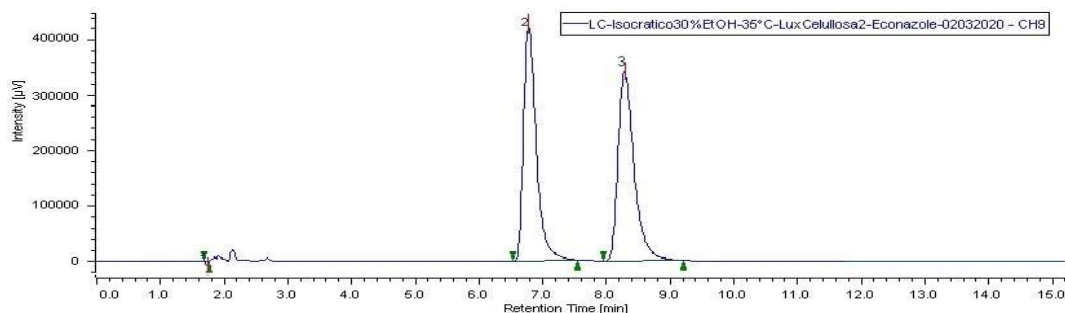


Figura 14 Cromatograma del econazol obtenido utilizando un 30% etanol, 2 mL/min, 150 MPa y a 35°C.

Miconazol

Con el miconazol se obtuvieron altas resoluciones con cualquier de los modificadores estudiados. La resolución más alta alcanzada correspondió a metanol 15% y la menor a metanol a 20%, con unos valores de 3.95 y 2.64 respectivamente. El factor de selectividad, para este fungicida, más alto se obtuvo utilizando 2-propanol a 20% con 1.31 y el menor factor con metanol a 30% con un 1.19.

Los factores de capacidad para el caso del miconazol se encontraron que de las combinaciones estudiadas cuatro presentaron factores mayores de 10, indicando que le tiempo es excesivamente largo para ser óptimo, estas combinaciones corresponden a metanol a 15%, etanol a 20% y 2-propanol a 20% y para el caso de metanol a 20% el enantiómero 2 presento un valor superior a 10 con 10.75. Los menores valores obtenidos dentro del intervalo de trabajo establecido (1-10) corresponden a 30% etanol con 3.94 y 4.94 para cada uno de los enantiómeros.

La combinación que presenta los mejores resultados para miconazol es etanol al 30% ya que los factores de capacidad fueron los más bajos obtenidos. El factor de selectividad fue el más alto alcanzado con un valor de 1.25 y se obtuvo una resolución de 3.45 que permite la separación a línea base de los enantiómeros y los tiempos de retención son las más bajos obtenidos. En la figura 15 se presenta el cromatograma para la mejor separación de este fungicida.

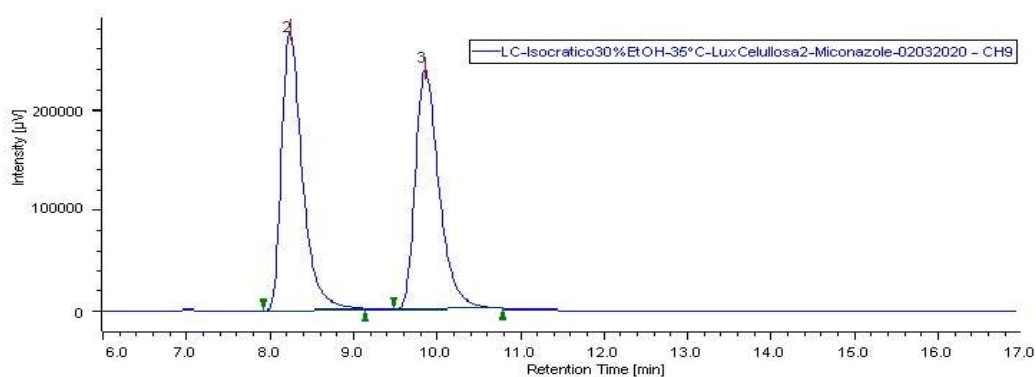


Figura 15 Cromatograma del miconazol obtenido utilizando 30% etanol, 2 mL/min, 150 MPa y a 35°C.

Penconazol

En el caso del penconazol, la mayor resolución obtenida corresponde a 2-propanol al 10% con un valor de 5.67, pero el factor de capacidad supera el valor de 10 por lo cual queda descartado y el segundo con el valor más alto se obtiene utilizando 2-propanol al 20% con 4.71 y la resolución con menor valor es con metanol al 30% con 2.85. Para este fungicida se obtuvieron altas resoluciones con cualquiera de los modificadores estudiados, superando ampliamente la resolución hasta línea base.

Los factores de capacidad para el caso del penconazol, no son excesivos salvo cuando se utiliza un 10% de 2-propanol, donde fueron superiores a 10. En el caso del factor de selectividad el mejor valor de obtiene con 2-propanol al 10% con un valor de 1.28.

La combinación que presenta los mejores resultados para penconazol es etanol al 30% ya que la resolución es considerablemente alta, con 3.25. El factor de selectividad es el tercero más alto, con 1.22. Y los factores de capacidad son los menores lo que nos dará un menor tiempo de elución de los enantiómeros como se observa en la tabla 5 que para los enantiómeros de este fungicida a esta concentración eluyen a 4.39 y 4.89 minutos respectivamente. A pesar que metanol a 30% también se obtiene valores de factores capacidad similares, la resolución es considerablemente más alta en etanol a 30%. En la figura 16 se presenta el cromatograma para la mejor separación de este fungicida.

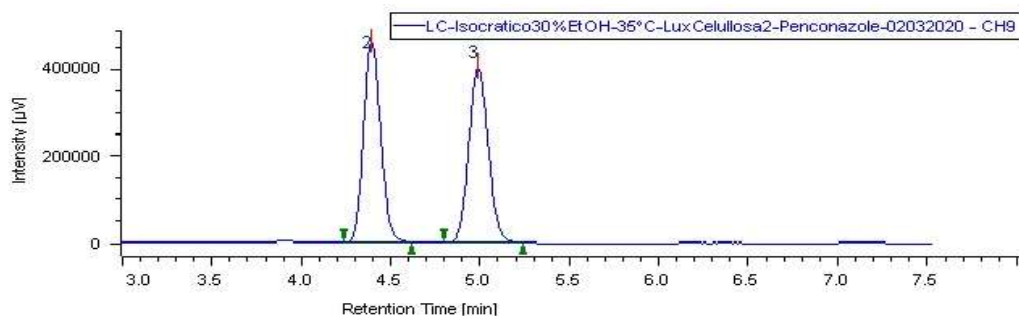


Figura 16 Cromatograma del penconazol obtenido utilizando 30% etanol, 2 mL/min, 150 MPa y a 35°C.

Tebuconazol

En el caso de este fungicida, presenta una elevada resolución en conjunto con todos los modificadores estudiados. La mejor resolución se obtiene utilizando 2-propanol a 10%, pero los factores de capacidad superan el límite máximo establecido de 10. Por lo tanto, se considera como mejor valor el segundo más alto que corresponde a metanol al 15% con 5.59, aunque por lo mencionado anteriormente con este criterio se podría considerar todas las pruebas ya que las resoluciones son relativamente altas.

Los factores de selectividad obtenidos en todos los análisis de tebuconazol se muestran en la tabla 6, el valor más alto conseguido es el correspondiente a etanol a 15 y 20% con 1.32. Y el factor más bajo obtenido es el correspondiente a 2-propanol a 20% con un valor de 1.26.

Para el caso de los factores de capacidad del tebuconazol, el valor más bajo se obtuvo con etanol al 30% con valores de 1.31 y 1.72 respectivamente.

La combinación que presenta los mejores resultados para tebuconazol es etanol al 30% ya que los factores de capacidad son los más bajos. El factor de selectividad es el segundo mejor obtenido con un valor de 1.31 y se obtiene una resolución de 3.92 no es la más alta obtenida pero los enantiómeros presentaron una separación superior a línea de base y los tiempos de elución son los más bajos 3.85 y 4.53 minutos. En la figura 17 se presenta el cromatograma para la mejor separación de este fungicida.

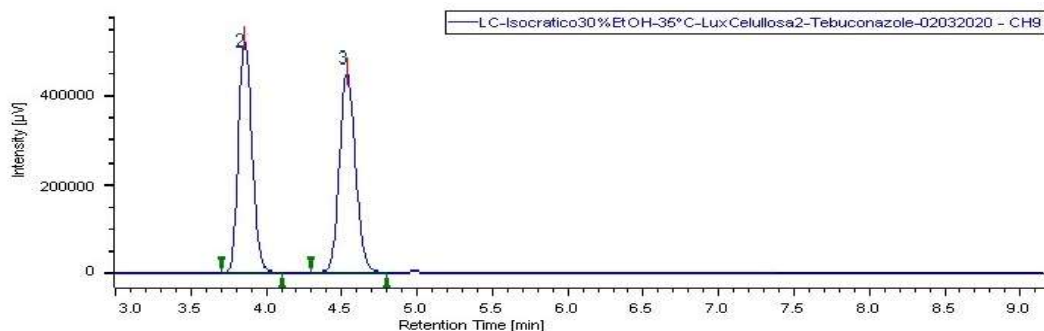


Figura 17 Cromatograma del tebuconazol obtenido utilizando un 30% etanol, 2 mL/min, 150 MPa y a 35°C.

Tetraconazol

Para este fungicida las resoluciones obtenidas fueron las más altas de todos los fungicidas estudiados. En este caso la resolución más alta se alcanzó utilizando 2-propanol a 10% con un valor de 10.17 y la menor resolución se obtuvo con etanol al 15% con un valor de 5.05.

Los factores de selectividad, de igual forma que para la resolución, son los más altos obtenidos para los fungicidas estudiados. Este comportamiento puede deberse a la presencia de átomos de flúor en la molécula, ya que estos pueden provocar mejores interacciones secundarias con la fase estacionaria mejorando así la enantioselectividad. El valor más alto obtenido para el factor de selectividad de este fungicida es correspondiente al análisis de 2-propanol al 10%, como modificador, con un valor de 1.72.

Con respecto a los factores de capacidad para este fungicida, los valores obtenidos no son altos, estando en todos los casos por debajo de 10. Hay que comentar que utilizando metanol al 30% y etanol 30%, los factores de capacidad son inferiores a 1 lo que puede ocasionar problemas en su análisis debido a su escasa retención. Los mejores resultados para el factor de capacidad corresponden a 20% metanol con 1.09 y 1.77 para cada uno de los enantiómeros.

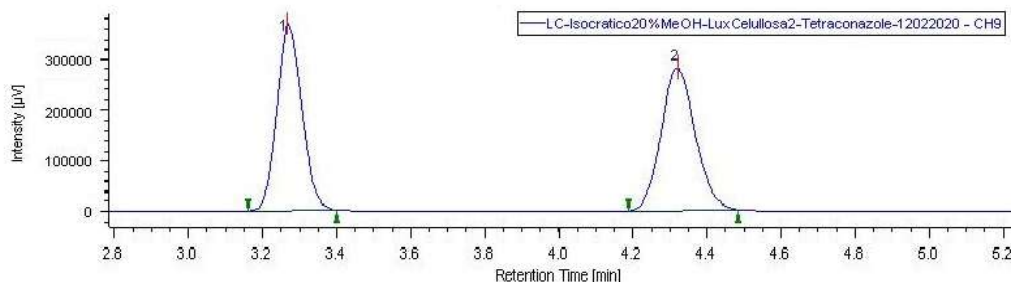


Figura 18 Cromatograma del tetraconazol obtenido utilizando 20% metanol, 2 mL/min, 150 MPa y a 35°C

La combinación que presenta los mejores resultados es metanol al 20% ya que los factores de capacidad, no son los más bajos, pero son los cumplen con los criterios válidos, presentando una retención baja y además poseen una alta resolución con un valor de 7.21 llevando a separación a línea base. En la figura 18 se presenta el cromatograma para la mejor separación de este fungicida.

Cyproconazol

En la tabla 7 se muestran los parámetros de factor de capacidad, factor de selectividad y resolución obtenidos para del fungicida cyproconazol. Este fungicida se presenta como mezcla racémica de los cuatro enantiómeros correspondientes. Cuando se utilizó 2-propanol como modificador orgánico el ultimo enantiómero no se logró eluir antes de los 50 min.

En el caso del cyproconazol se evaluaron los parámetros correspondientes a tres agrupaciones de picos con una notación 1-2, 2-3 y 3-4, correspondientes a cada número a un enantiómero. Los valores más altos obtenidos para los factores de selectividad corresponden, para la separación 1-2 con 2-propanol a 10%, para 2-3 a etanol 30% y para 3-4 corresponde a metanol 15%. En cuanto a los factores de capacidad, los valores más bajos se obtuvieron empleando etanol a 30%.

Tabla 7 Parámetros cromatográficos obtenidos para cyproconazol.

Modificador	k' 1	k' 2	k' 3	k' 4	α 1-2	α 2-3	α 3-4	R 1-2	R 2-3	R 3-4
Cyproconazol										
Metanol 15%	3.23	4.49	6.28	9.15	1.39	1.40	1.46	6.52	7.10	8.38
Metanol 20%	1.96	2.68	3.67	5.30	1.37	1.37	1.45	5.79	6.21	7.62
Metanol 30%	1.12	1.55	2.14	3.09	1.38	1.38	1.45	4.57	5.06	6.43
Etanol 15%	3.24	4.80	6.91	9.98	1.48	1.44	1.44	7.55	7.53	7.87
Etanol 20%	2.28	3.35	4.82	6.89	1.47	1.44	1.43	6.65	6.90	7.14
Etanol 30%	0.89	1.29	1.87	2.63	1.45	1.45	1.41	4.69	5.41	5.49
2-propanol 10%	11.18	17.05	23.28	*	1.53	1.37	*	9.27	7.26	*
2-propanol 20%	3.16	4.57	6.40	9.25	1.44	1.40	1.44	6.64	6.54	7.45

* Elución superior a 50 min.

Para el parámetro de resolución se obtuvo que para la separación del par 1-2 el valor más alto corresponde a 2-propanol a 10%, pero en este caso la retención es muy elevada y no se logra eluir el último enantiómero en un tiempo razonable, por tanto, se toma el segundo valor más alto correspondiente a etanol 15% con un valor de 7.55. Para la separación de los enantiómeros 2-3 la resolución más alta obtenida corresponde a etanol al 15% con un valor de 7.53. Y la resolución para la separación 3-4 más alta obtenida corresponde a metanol 15%, pero con un 15% de etanol también se obtiene una resolución elevada y superior a línea base (7.87).

La combinación que presentó los mejores resultados para la separación de los cuatro enantiómeros del cyproconazol es etanol al 30% ya que los factores de capacidad son los más bajos correspondientes a 0.89, 1.29 y 1.87, y considerando que el factor de capacidad para la separación 1-2 es inferior a 1 este no afecta a la resolución de los enantiómeros a línea base, agregando a esto las resoluciones obtenidas para esta combinación 4.69, 5.41 y 5.49, que son bastante altas y superiores a línea de base. Y finalmente los tiempos de retención de esta combinación son los más bajo obtenidos entre todas las combinaciones. En la figura 19 se presenta el cromatograma para la mejor separación de este fungicida.

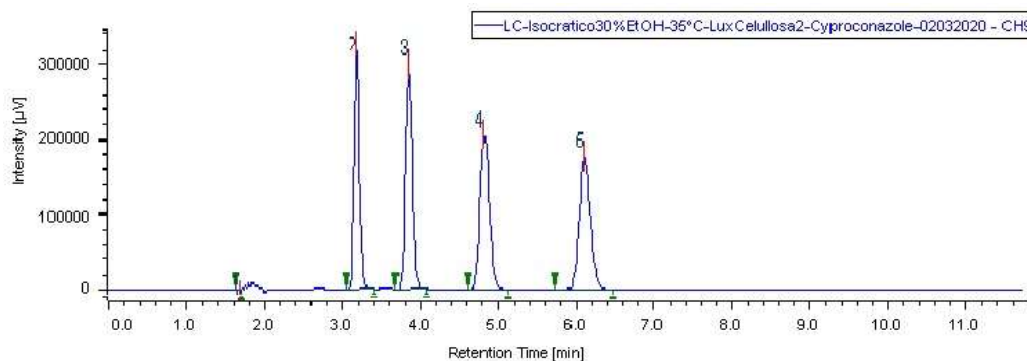


Figura 19 Cromatograma del cyproconazol obtenido utilizando 30% etanol, 2 mL/min, 150 MPa y a 35°C.

Como resumen, en la separación enantiomérica de los fungicidas estudiados en la columna Lux Cellulose 2, las combinaciones de modificador orgánico y concentración que proporcionaron los mejores resultados, se establecen de la siguiente manera: para diniconazol y tetraconazol fue como modificador metanol a una composición del 20 %. Para los fungicidas econazol, miconazol, penconazol, tebuconazol y cyproconazol fue etanol a una concentración 30%.

4.3.3. Influencia de temperatura

En este apartado se presenta como la temperatura influye en las separaciones enantioméricas en los fungicidas estudiados en esta investigación. Esto se realizó variando la temperatura en un rango de 20 a 35 °C, con incrementos de 5 grados, las condiciones de presión y flujo se mantuvieron constantes en 150 MPa y 2 mL/min para todas las pruebas realizadas. A la vez este estudio se realizó con los tres modificadores orgánicos con los cuales se ha trabajado y se designó la concentración de 20 % de modificador ya que se observó buenos resultados de separación en el los análisis de la influencia de modificadores. En la tabla 8 se muestran las variaciones los coeficientes de capacidad, de selectividad y las resoluciones obtenidas para los diferentes fungicidas excepto el cyproconazol, los modificadores y las temperaturas estudiadas.

Los resultados obtenidos permitieron representar el logaritmo neperiano del coeficiente de selectividad frente al inverso de la temperatura absoluta. De acuerdo con la ecuación 4, ecuación de Van't Hoff, con esta relación se puede calcular los parámetros termodinámicos de la separación quiral de los fungicidas, estos parámetros son la variación de entalpía y entropía de la interacción enantioselectiva de los enantiómeros con la fase estacionaria y la temperatura de isoelución de los enantiómeros.

Tabla 8 Efecto de la temperatura en la separación enantiomérica para diniconazol, econazol, miconazol, penconazol, tebuconazol y tetraconazol.

T (°C)	Metanol 20%				Etanol 20%				2-propanol 20%			
	α	k1	k2	R	α	k1	k2	R	α	k1	k2	R
Diniconazol												
20.00	1.21	1.42	1.72	2.86	1.19	1.01	1.20	2.13	1.14	1.48	1.68	1.57
25.00	1.21	1.44	1.74	2.77	1.16	1.18	1.37	2.98	1.12	1.55	1.74	1.43
30.00	1.18	1.45	1.71	2.59	1.14	1.37	1.57	1.90	1.09	1.79	1.94	1.19
35.00	1.15	0.76	0.87	1.84	1.14	1.35	1.54	1.83	1.07	1.91	2.05	1.10
Econazol												
20.00	1.18	10.35	12.20	2.46	1.30	7.52	9.75	3.13	1.46	14.47	21.13	4.34
25.00	1.20	8.96	10.78	2.88	1.26	5.68	7.14	3.98	1.45	14.01	20.28	5.25
30.00	1.20	8.56	10.24	3.04	1.31	9.26	12.15	2.90	1.45	16.01	23.24	3.93
35.00	1.21	4.88	5.93	3.45	1.31	7.98	10.47	2.83	1.43	15.75	22.47	4.83
Miconazol												
20.00	1.14	13.07	14.93	2.35	1.23	10.16	12.53	4.13	1.32	18.01	23.85	3.77
25.00	1.19	11.43	13.56	2.91	1.21	12.39	15.05	4.98	1.29	17.68	22.89	5.25
30.00	1.19	11.12	13.24	2.03	1.25	12.19	15.21	3.90	1.32	20.67	27.30	2.80
35.00	1.20	9.85	11.81	3.10	1.26	10.63	13.35	3.83	1.31	19.01	24.88	3.88
Penconazol												
20.00	1.20	3.18	3.81	3.58	1.25	3.01	3.76	5.13	1.29	4.44	5.72	4.68
25.00	1.19	3.33	3.98	3.58	1.21	2.84	3.43	4.98	1.30	3.84	4.99	4.75
30.00	1.19	3.28	3.90	3.46	1.23	3.25	3.99	4.99	1.29	4.69	6.07	4.75
35.00	1.19	2.56	3.04	3.27	1.22	3.56	4.35	4.83	1.28	4.50	5.75	4.74
Tebuconazol												
20.00	1.32	2.67	3.53	4.63	1.33	2.66	3.53	6.13	1.21	5.09	6.16	3.09
25.00	1.31	3.04	4.00	4.90	1.33	3.36	4.47	5.98	1.20	5.26	6.33	3.58
30.00	1.31	3.14	4.10	5.07	1.32	3.17	4.18	5.90	1.23	5.95	7.32	3.64
35.00	1.32	2.44	3.22	4.87	1.33	3.40	4.53	5.83	1.23	5.79	7.13	3.95
Tetraconazol												
20.00	1.72	1.08	1.86	7.99	1.73	1.10	1.90	7.13	1.76	1.50	2.65	7.24
25.00	1.67	1.21	2.03	7.97	1.70	1.27	2.16	6.98	1.71	1.37	2.34	7.22
30.00	1.66	1.21	2.02	7.67	1.66	1.29	2.13	6.90	1.71	1.74	2.96	7.49
35.00	1.49	1.13	1.69	6.86	1.62	1.27	2.06	6.83	1.66	1.74	2.89	7.54

Diniconazol

Los parámetros termodinámicos de la separación enantiomérica se muestran en la tabla 9, donde se observa que la entalpía, la entropía y la temperatura de isoelución aumentaron en el orden de 2-propanol, metanol y etanol. Estos parámetros proporcionan información de que el mecanismo se desarrolló a través de un control entálpico, ya que los valores de entalpía y entropía obtenidos para los tres modificadores son negativos y grandes, lo que genera que el factor de selectividad y la enantioresolución sea disminuida con el aumento de la temperatura, como se observa en la tabla 8 con los valores experimentales. Las entalpías que sean grandes nos indica que los mecanismos de interacción entre los enantiómeros y la fase estacionaria son diferentes. Además, las temperaturas de isoelución calculadas para los tres modificadores son 83.9, 95.9 y 51.7 °C para metanol, etanol e 2-propanol respectivamente, son superiores a las temperaturas de trabajo, que como ha indicado anteriormente es de 20-35 °C, lo que confirma el control entálpico de la separación enantiomérica. En la figura 20 se presentan las rectas de Van't Hoff para el fungicida diniconazol. Para este fungicida se obtuvo una tendencia lineal con los tres modificadores.

En los cromatogramas obtenidos (figura 21) puede observarse que la retención aumentó a medida que aumentaba la temperatura de trabajo.

Tabla 9 Parámetros termodinámicos para la separación enantiomérica de diniconazol

	Metanol al 20%	Etanol al 20%	2-propanol al 20%	unidades
$\Delta\Delta H^\circ$	-2737.7	-1985.6	-3272.6	J/mol
$\Delta\Delta S^\circ$	-7.7	-5.4	-10.1	J/K*mol
Tiso	83.9	95.9	51.7	°C

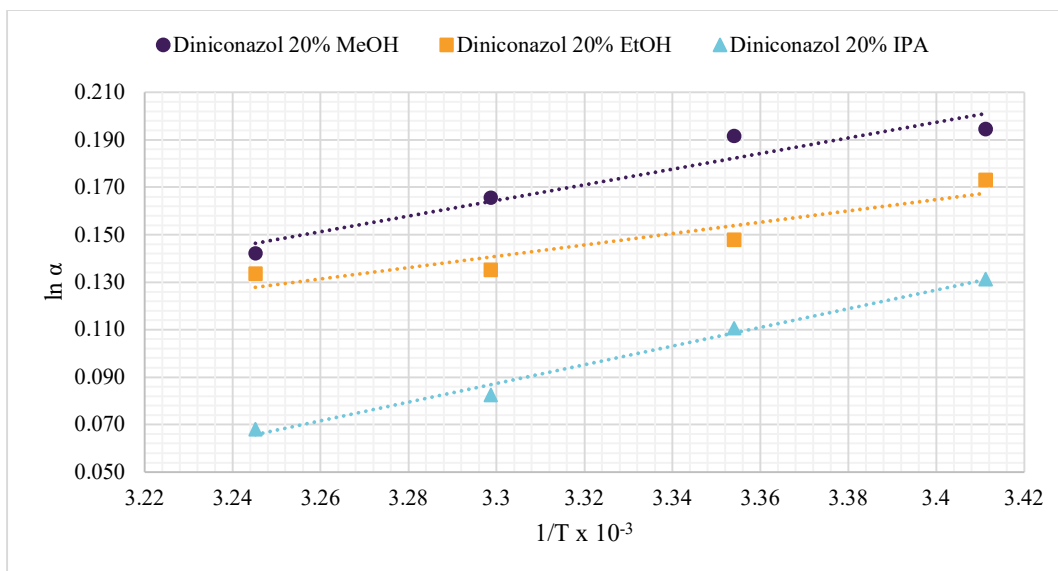


Figura 20 Rectas Van't Hoff para el diniconazol, modificadores a 20%, 2 mL/min y 150 MPa.

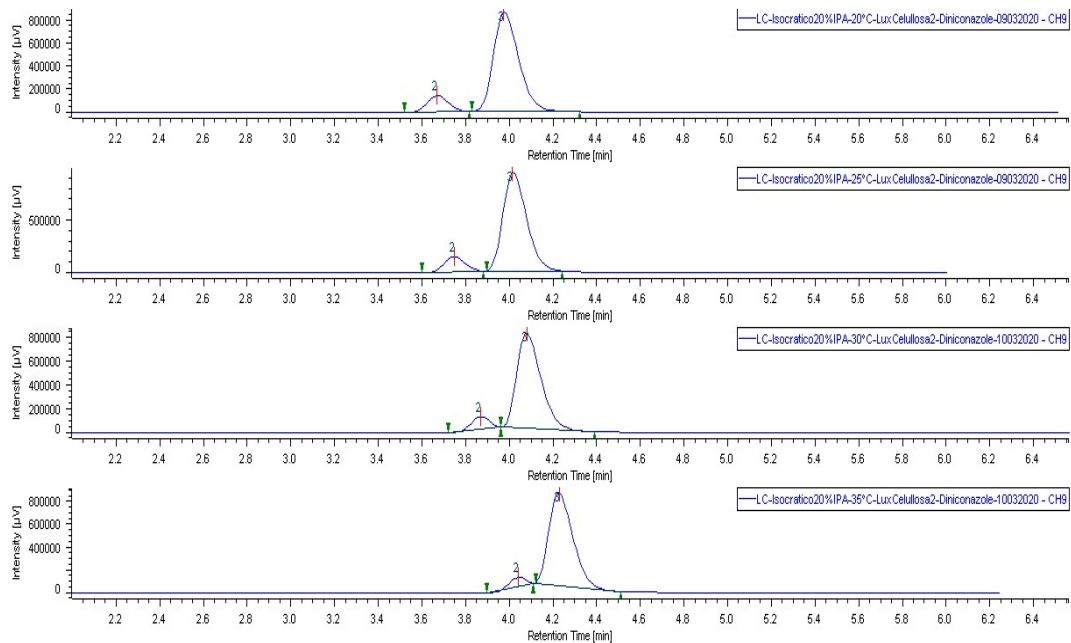


Figura 21 Cromatogramas a 20, 25, 30 y 35 °C del diniconazol, presión de 150 MPa, flujo de 2 mL/min y modificador 2-propanol al 20%.

Tetraconazol

En la figura 22 se presentan las rectas de Van't Hoff para el fungicida tetraconazol. Como puede observarse solo se obtuvo una tendencia lineal cuando se utilizó etanol o 2-propanol; en cambio cuando se utilizó metanol la tendencia no fue lineal debido a una disminución muy marcada de la selectividad a 35°C. En la figura 23 se muestran los cromatogramas obtenidos para etanol que presenta la mejor tendencia lineal.

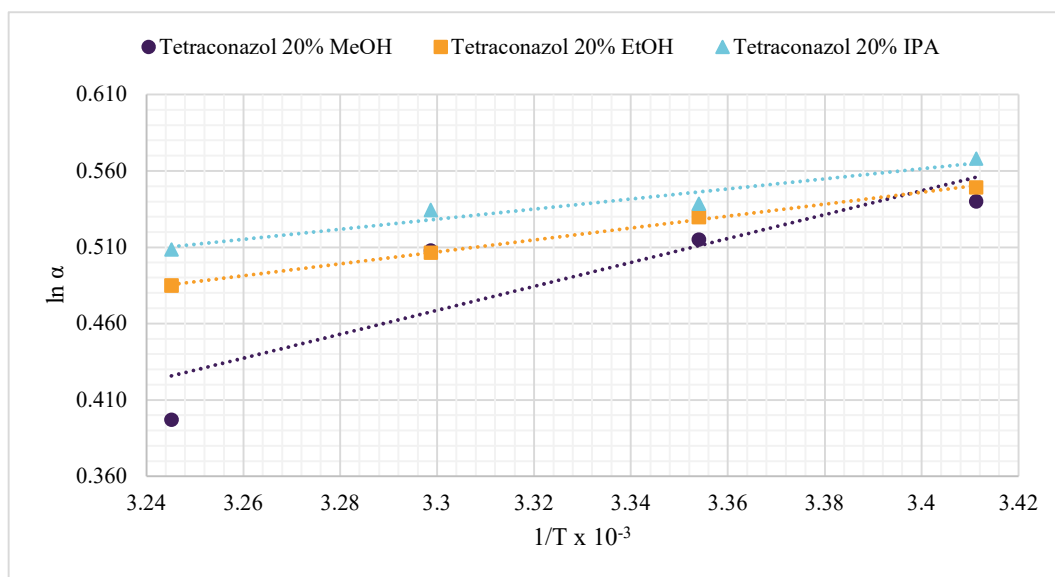


Figura 22 Rectas Van't Hoff para tetraconazol, modificadores a 20%, 2 mL/min y 150 MPa.

Los parámetros termodinámicos de la separación enantiomérica se muestran en la tabla 10, donde se observa que la variación de entalpía, la variación de entropía y la temperatura de isoelución aumenta en el orden de etanol y 2-propanol, en el caso del metanol no se realizaron los cálculos ya que al no presentar una tendencia lineal los cálculos termodinámicos no se pueden realizar. Estos parámetros proporcionan información de que el mecanismo de separación enantiomérica se desarrolló a través de un control entálpico, debido a que las entalpías son negativas y grandes. Además, las temperaturas de isoelución son de 226.4 y 315.4 °C superiores a las de trabajo. En este caso el modificador que genera mayor separación entre los enantiómeros es el metanol, a pesar que es el que menor linealidad posee al representar la ecuación de Van't Hoff. Para el caso del 2-propanol la temperatura de isoelución calculada es muy superior a la temperatura absoluta (273.15°C), generando errores de cálculo, ya que cuando la temperatura de isoelución se encuentra muy por encima de la temperatura de trabajo hace que la variación de la selectividad sea muy pequeña. En la figura 23 donde se muestra los cromatogramas obtenidos con etanol, se observa que la retención disminuye a medida que aumenta la temperatura especialmente para el segundo enantiómero eluido, caso contrario con el 2-propanol, que la tendencia no es tan precisa de la retención.

Tabla 10 Parámetros termodinámicos para la separación enantiomérica de tetraconazol

	Etanol al 20%	2-propanol al 20%	Unidades
$\Delta\Delta H^\circ$	-3247.316	-2744.272	J/mol
$\Delta\Delta S^\circ$	-6.501	-4.663	J/K* μmol
Tiso	226.346	-	°C

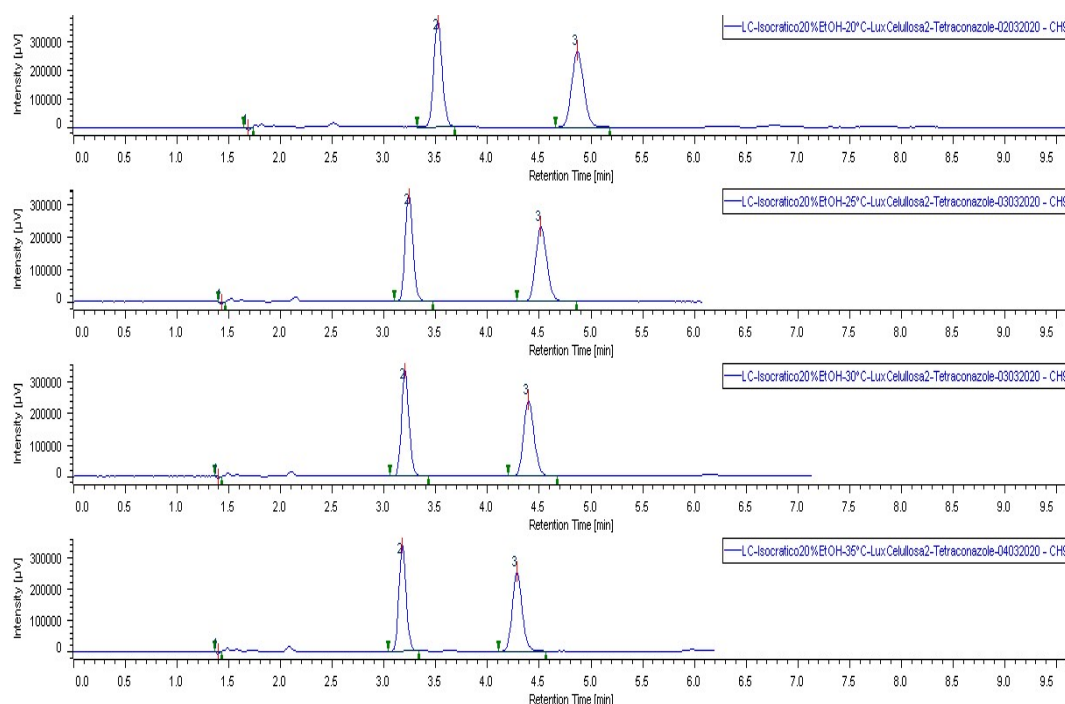


Figura 23 Cromatogramas a 20, 25, 30 y 35 °C de tetraconazol, presión de 150 MPa, flujo de 2 mL/min y modificador etanol al 20%.

Cyproconazol

En las figuras 24 y 25 se presentan las rectas de Van't Hoff para los enantiómeros 2-3 y 3-4 respectivamente del fungicida cyproconazol. En el caso de la separación de los enantiómeros 1-2 para ninguno de los modificadores se obtuvo una tendencia lineal. Para la separación de los enantiómeros 2-3 se obtuvo una representación lineal cuando se utilizó etanol como modificador. Y finalmente para la separación de los enantiómeros 3-4 con los modificadores de etanol y 2-propanol se obtuvo una tendencia lineal con valores de 0.9997 y 0.9715, respectivamente de coeficiente de correlación. En la figura 26 se presentan los cromatogramas obtenidos utilizando etanol a 20% y puede observarse que la retención para los dos últimos enantiómeros disminuye al aumentar la temperatura mientras que para los dos primeros la variación de la retención con la temperatura es muy pequeña y presenta una ligera tendencia al aumento.

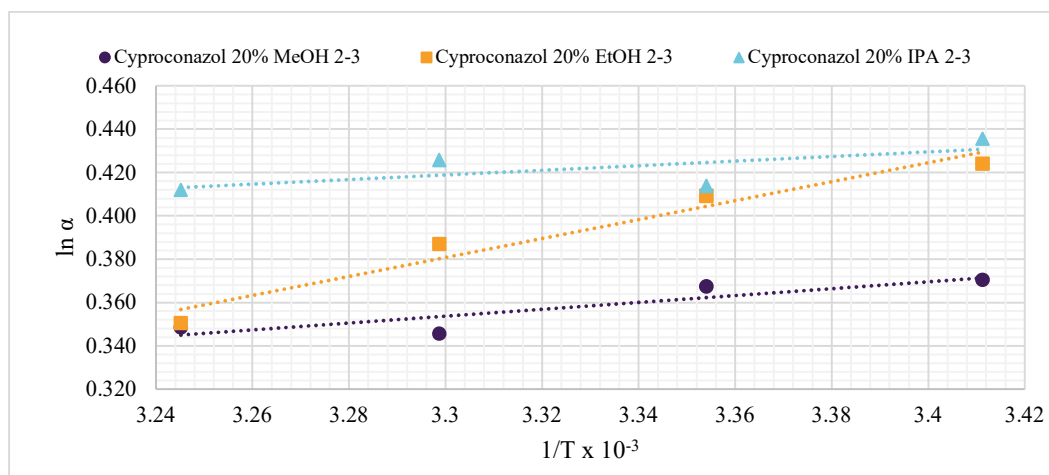


Figura 24 Rectas Van't Hoff para enantiómeros 2-3 del cyproconazol, modificadores a 20%, 2 mL/min y 150 MPa.

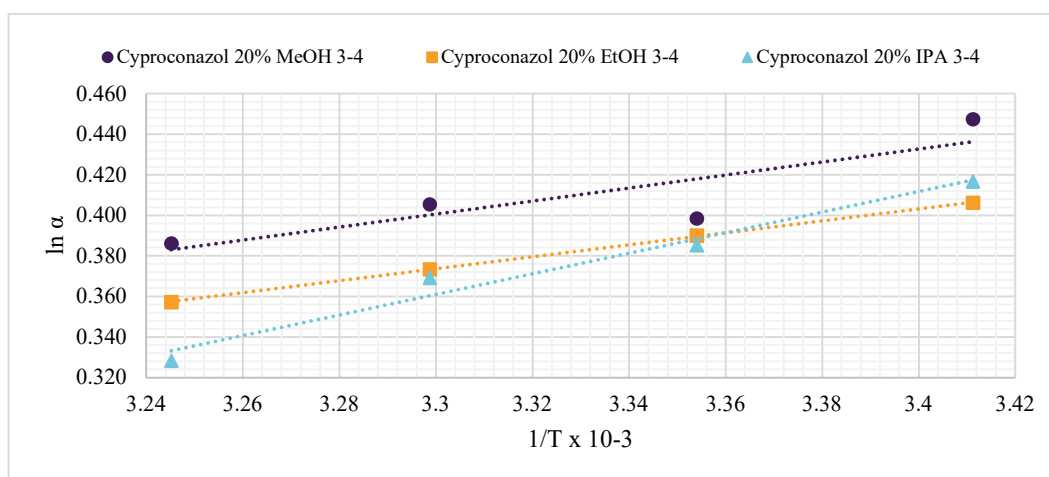


Figura 25 Rectas Van't Hoff para enantiómeros 3-4 del cyproconazol, modificadores a 20%, 2 mL/min y 150 MPa.

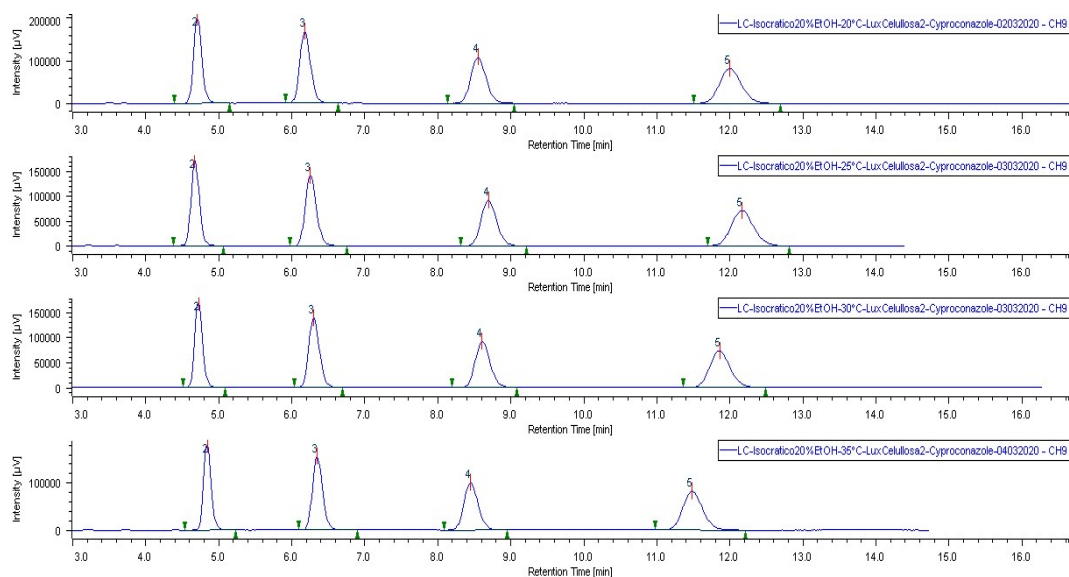


Figura 26 Cromatogramas a 20, 25, 30 y 35 °C de econazol, presión de 150 MPa, flujo de 2 mL/min y modificador etanol al 20%.

En la tabla 11 se muestran los parámetros termodinámicos de las separaciones del fungicida cyproconazol. En el caso de la separación de enantiómeros 2-3, se considera solo el etanol y se observa un control entálpico ya que la entalpia es negativa y muy grande y la temperatura de isoelución es superior a la de trabajo con un valor de 138.5 °C. Además, se observa que las tendencias de las rectas de Van't Hoff en la figura 24 son de tendencia creciente indicando que el factor de selectividad disminuye con el aumento de la temperatura, como se muestra en la tabla 12.

Tabla 11 Parámetros termodinámicos para la separación enantiomerica de cyproconazol

		Etanol al 20%	2-propanol al 20%	Unidades
Enantiómeros 2-3	$\Delta\Delta H^\circ$	-3637.172	-	J/mol
	$\Delta\Delta S^\circ$	-8.837	-	J/K*mol
	Tiso	138.446	-	°C
Enantiómeros 3-4	$\Delta\Delta H^\circ$	-2452.367	-4218.298	J/mol
	$\Delta\Delta S^\circ$	-4.986	-10.919	J/K*mol
	Tiso	218.696	113.188	°C

En el caso de la separación de los enantiómeros 3-4, de igual forma que con el caso anterior posee un control entálpico ya que la temperatura de isoelución es superior a la de trabajo, con un valor de 218.69 y 113.18 °C para etanol y 2-propanol ya que son los poseen una tendencia lineal. Se observa a la vez que los valores termodinámicos entre estos dos modificadores son muy distintos puede indicar que los mecanismos de separación enantiómericas son muy diferentes entre sí. También para este par de enantiómeros la selectividad disminuye a medida que aumenta la temperatura como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12 Efecto de la temperatura en la separación enantiomérica para cyproconazol.

T (°C)	Metanol 20%			Etanol 20%			Etanol 20%					
	α	k1	R	α	k1	R	α	k1	R			
Cyproconazol 1-2												
20.00	1.401	2.068	5.689	1.485	1.802	6.103	1.473	2.778	5.808			
25.00	1.421	1.991	5.847	1.490	2.270	6.466	1.459	2.529	6.022			
30.00	1.386	2.205	5.769	1.476	2.340	6.685	1.515	3.133	6.624			
35.00	1.405	1.679	5.567	1.433	2.559	6.761	1.494	3.177	6.710			
Cyproconazol 2-3												
20.00	1.448	2.897	6.742	1.528	2.675	7.219	1.546	4.090	6.823			
25.00	1.444	2.829	6.678	1.506	3.382	7.224	1.513	3.688	7.136			
30.00	1.413	3.055	6.540	1.473	3.454	7.155	1.531	4.747	7.104			
35.00	1.417	2.359		1.420	3.667	6.908	1.510	4.746	7.653			
T (°C)	Metanol 20%				Etanol 20%				Etanol 20%			
	α	k1	k2	R	α	k1	k2	R	α	k1	k2	R
Cyproconazol 3-4												
20.00	1.564	4.197	6.564	8.068	1.501	4.087	6.135	7.315	1.517	6.323	9.592	6.806
25.00	1.490	4.085	6.085	8.085	1.477	5.092	7.521	7.264	1.470	5.578	8.200	7.118
30.00	1.500	4.317	6.475	7.895	1.453	5.086	7.389	7.337	1.447	7.266	10.512	6.429
35.00	1.471	3.343	4.919	7.511	1.429	5.206	7.441	7.131	1.389	7.166	9.951	6.539

Econazol, miconazol, penconazol y tebuconazol.

Para el caso de los fungicidas econazol, miconazol, penconazol y tebuconazol con ninguno de los modificadores estudiados, se obtuvieron representaciones lineales de la ecuación de Van't de Hoff. Esto se puede atribuir a que exista un cambio en el mecanismo de interacción de los enantiómeros con la fase estacionaria por efecto de la temperatura, por el motivo que exista una variación en la conformación estructural de la fase estacionaria. Para el caso de estos fungicidas los parámetros termodinámicos no se calcularon

En las figuras 27, 28, 29 y 30 se presenta los cromatogramas de los fungicidas de econazol, miconazol, penconazol y tebuconazol, respectivamente, utilizando etanol al 20% para los dos primeros y 20% de 2-proapnol para los siguientes como modificadores. Para todos los casos no se observa tendencias claras en la retención de los enantiómeros, como se ha observado en otros trabajos de investigación para el caso de econazol y miconazol [50].

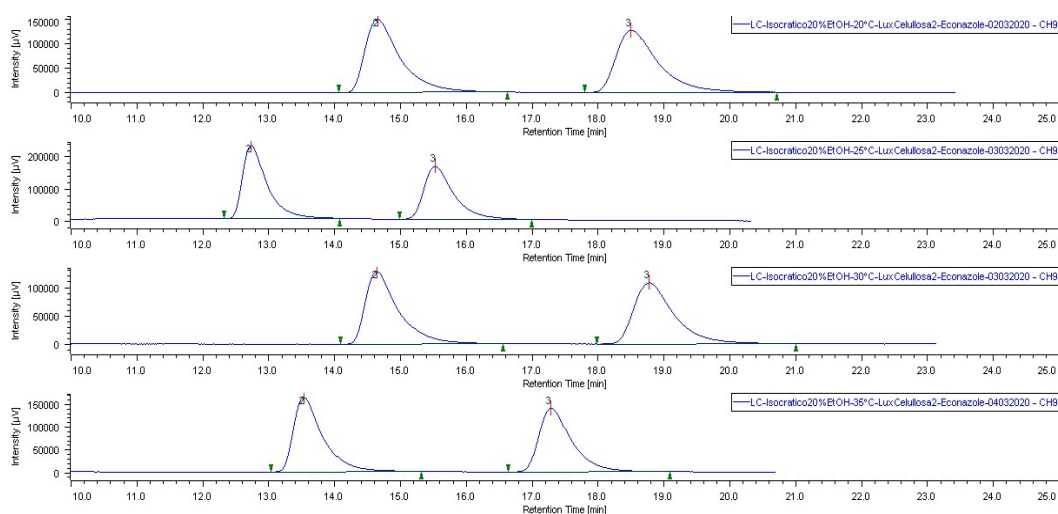


Figura 27 Cromatogramas a 20, 25, 30 y 35 °C de econazol, presión de 150 MPa, flujo de 2 mL/min y modificador etanol al 20%.

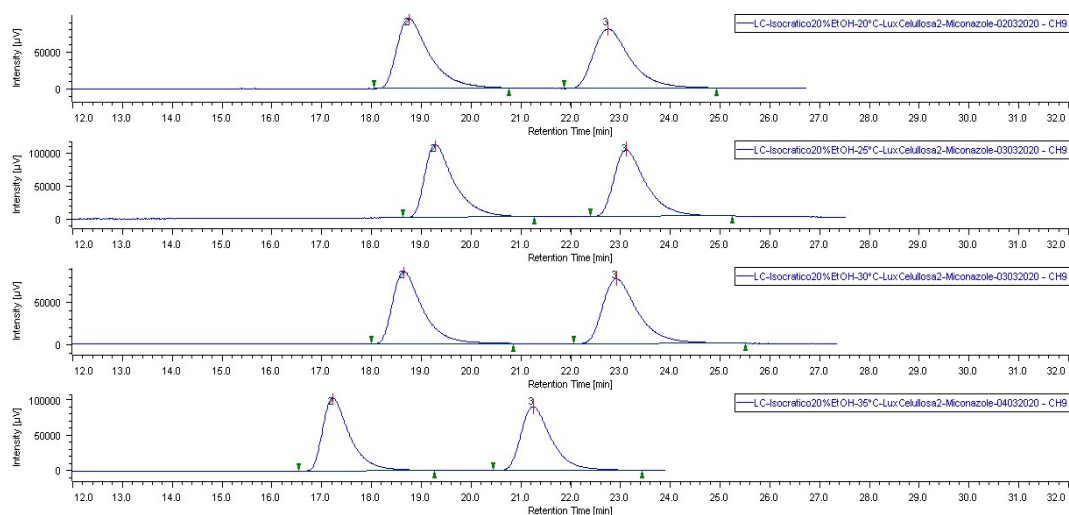


Figura 28 Cromatogramas a 20, 25, 30 y 35 °C de miconazol, presión de 150 MPa, flujo de 2 mL/min y modificador etanol al 20%.

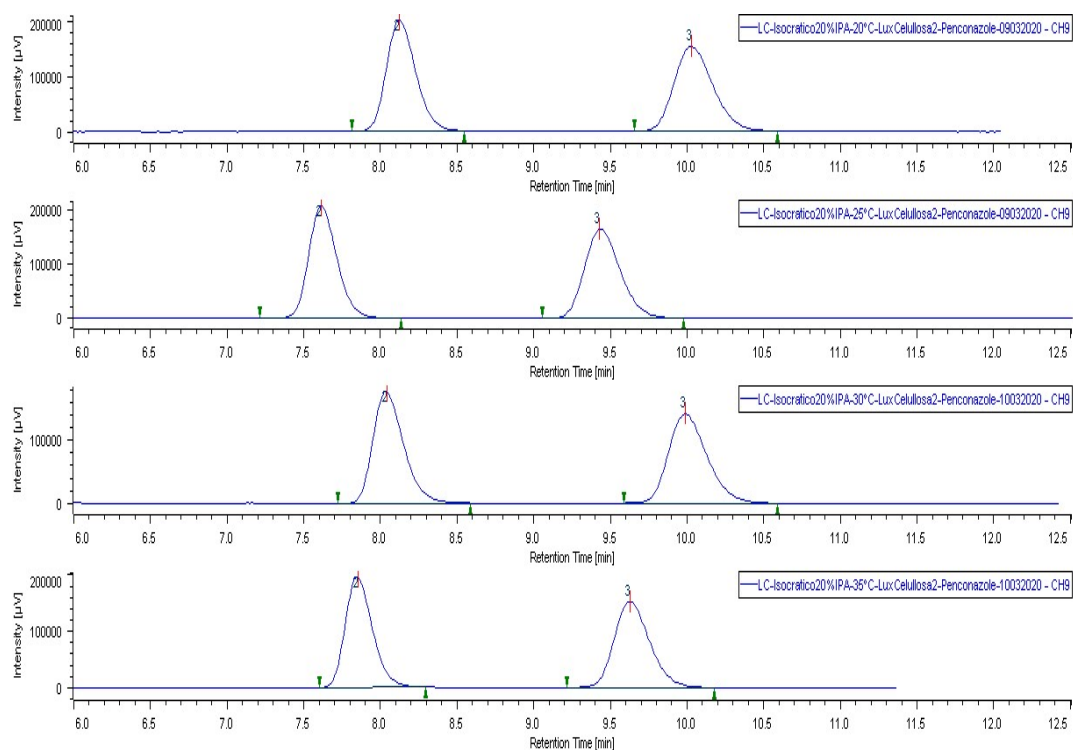


Figura 29 Cromatogramas a 20, 25, 30 y 35 °C de penconazol, presión de 150 MPa, flujo de 2 mL/min y modificador 2-propanol al 20%.

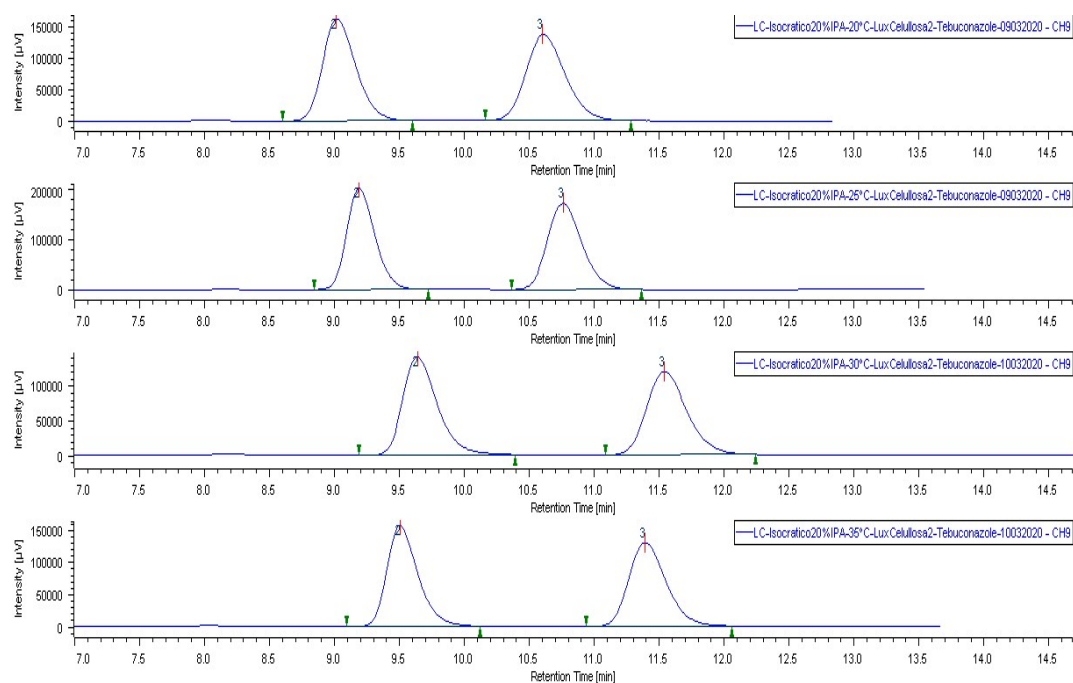


Figura 30 Cromatogramas a 20, 25, 30 y 35 °C de tebuconazol, presión de 150 MPa, flujo de 2 mL/min y modificador etanol al 20%.

5. Conclusiones

1. De las dos columnas quirales estudiadas en este trabajo, fue la columna Lux Cellulose 2 la que proporciono los mejores resultados para la separación enantiomérica de los siete fungicidas. Esto puede ser debido a que la presencia del átomo de cloro en la fase estacionaria genera una modificación de la polaridad del grupo carbamato beneficiando la aparición de enlaces secundarios con los grupos funcionales de los fungicidas, lo que permite mejorar la separación enantiomérica.
2. El tipo y la concentración de modificador tienen una gran influencia en la retención y enantioresolución de los fungicidas. En el caso de la Lux Cellulose 2 se observó que la retención aumentaba con el orden metanol<etanol<2-propanol, es decir en el sentido inverso al aumento de la polaridad del modificador orgánico; excepto para diniconazol para el cual el orden fue etanol<metanol<2-propanol. Por otro lado, en todos los casos la retención disminuyó al aumentar la concentración de modificador orgánico en la fase móvil.
3. En la mayoría de los casos, el modificador que proporcionó los mejores resultados en términos de retención y resolución fue un 30% de etanol. Así se consiguieron resoluciones enantioméricas superiores a 2, en tiempo de análisis inferiores a 10 minutos (para varios compuestos inferiores a 5 minutos). Para el diniconazol y tetraconazol los mejores resultados se obtuvieron utilizando 20% metanol; siendo precisamente para el tetraconazol para el que se obtuvieron las mayores enantioresoluciones (mayores a 7 con todos los modificadores).
4. El estudio de la influencia de la temperatura en la separación de los fungicidas estudiados mostró que para diniconazol (etanol y 2-propanol), tetraconazol (etanol y 2-propanol) y cyproconazol (para enantiómeros 2-3 y 3-4 en etanol y etanol y 2-propanol, respectivamente) existe una tendencia lineal en las representaciones de Van't Hoff. Además, en todos ellos la separación enantiomérica es de control entálpico, ya que con el aumento de la temperatura la resolución y el factor de selectividad disminuyen. Por lo lado, la temperatura de isoelución calculada está por encima al rango de trabajo empleado, y los valores de entropía fueron negativos. Las entalpías calculadas son grandes y negativas, lo que indica que existen grandes diferencias en los mecanismos de interacción de los enantiómeros de los fungicidas con la fase estacionaria. En cambio, para los fungicidas econazol, miconazol, penconazol, tebuconazol y cyproconazol (para enantiómeros 1-2) no se obtuvieron tendencias lineales en las representaciones de Van't Hoff.

6. Bibliografía

- [1] J. McMurry, *Química Orgánica*, Novena. 2018.
- [2] P. Wang, S. Jiang, D. Liu, W. Shan, H. Zhang, and Z. Zhou, “Chiral Separations of Pesticide Enantiomers by High- Performance Liquid Chromatography Using Cellulose Triphenylcarbamate Chiral Stationary Phase,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 44, no. December, pp. 602–607, 2006.
- [3] J. L.G. Wade, *Química Orgánica Vol. 1*, Sétima. México, 2012.
- [4] A. Williams, “Opportunities for chiral agrochemicals,” *Pestic. Sci.*, vol. 46, no. 1, pp. 3–9, Jan. 1996.
- [5] E. de J. Alcañiz, “El caso de la talidomida,” *UNIVERSIDADDE ALCALÁ*. [Online]. Available: <http://www3.uah.es/edejesus/lecturas/curiosidades/cur005.htm>. [Accessed: 03-Jun-2020].
- [6] Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, “Información básica sobre pesticidas,” 2019. [Online]. Available: <https://espanol.epa.gov/espanol/informacion-basica-sobre-pesticidas>. [Accessed: 10-Mar-2020].
- [7] E. M. Ulrich, C. N. Morrison, M. R. Goldsmith, and W. T. Foreman, “Chiral pesticides: identification, description, and environmental implications.,” *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 217, pp. 1–74, 2012.
- [8] D. W. Armstrong, G. L. Reid III, M. L. Hilton, and C. D. Chang, “RELEVANCE OF ENANTIOMERIC SEPARATIONS IN ENVIRONMENTAL SCIENCE,” *Environ. Pollut.*, vol. 79, pp. 51–58, 1993.
- [9] FDA, “Desarrollo de nuevas drogas estereoisoméricas | FDA.” [Online]. Available: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-new-stereoisomeric-drugs>. [Accessed: 09-Mar-2020].
- [10] FAO, “FAOSTAT.” [Online]. Available: <http://www.fao.org/faostat/es/?#data/RP>. [Accessed: 21-Feb-2020].
- [11] J. Melgarejo García, “Mecanismos de acción de los fungicidas,” in *Manejo Integrado de Enefermedades*, 2011.
- [12] E. P. Andani, “Selección y caracterización de anticuerpos recombinantes para fungicidas. Aplicación al desarrollo de técnicas inmunoanalíticas,” Universidad Politecnica de Valencia, 2010.
- [13] M. Kahle, I. J. Buerge, A. Hauser, M. D. Müller, and T. Poiger, “Azole fungicides: Occurrence and fate in wastewater and surface waters,” *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, no. 19, pp. 7193–7200, 2008.
- [14] E. R. Trösken, N. Bittner, and W. Völkel, “Quantitation of 13 azole fungicides in wine samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1083, no. 1–2, pp. 113–119, 2005.
- [15] J. Fortún Abete, “Antufúngicos: Azólicos, Imidazoles y Triazoles,” *Medicine (Baltimore)*, vol. 7, pp. 4231–4241, 1998.
- [16] V. Pérez-fernández, M. Á. García, and M. L. Marina, “Chiral separation of agricultural fungicides,” *J. Chromatogr.*, vol. 1218, pp. 6561–6582, 2011.

- [17] X. Yao, H. Gao, and W. Zhang, "Identification, Quantification, and Stereoselective Degradation of Triazole Fungicide Cyproconazole in Two Matrixes through Chiral Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 67, pp. 10782–10790, 2019.
- [18] B. S. S. Ekhon, "Chiral pesticides," *Pestic. Sci.*, vol. 34, no. 1, pp. 1–12, 2009.
- [19] M. P. Ibáñez, "Determinación simultánea de los enantiómeros de mezclas de ketoprofeno, naproxeno e ibuprofeno en fármacos y muestras de agua mediante HPLC bidimensional aquiral-quiral en modo heart-cut," Universidad Complutense de Madrid, 2018.
- [20] T. Ikai and Y. Okamoto, "Structure control of polysaccharide derivatives for efficient separation of enantiomers by chromatography," *Chem. Rev.*, vol. 109, no. 11, pp. 6077–6101, 2009.
- [21] D. Harvey, "Química Analítica Moderna," *Mc Graw Hill /Interamericana de España s.a.* p. 570, 2002.
- [22] T. M. Lowry, *Optical rotatory power*. Dover Publications, 1964.
- [23] V. P. Fenández, "Separación Enantiomérica y/o determinación de compuestos de interés medioambiental por metodologías analíticas electroforéticas y cromatográficas innovadoras," Universidad de Alcalá, 2013.
- [24] C. B. González, "Resolución enantiomérica de compuestos volátiles quirales mediante técnicas multidimensionales : cromatografía en lecho móvil simulado con fluidos supercríticos," Universidad Complutense de Madrid, 2011.
- [25] J. Dabrio, M. V.; Blanch, G. P.; Cifuentes, A.; Díez-Masa, J. C.; de Frutos, M.; Herraiz, M.; Martínez Castro, I.; Sanz Perucha, *Cromatografía y Electroforosis en Columna*. Madrid: Springer Iberica, 2000.
- [26] C. M. Galea, Y. Vander Heyden, and D. Mangelings, *Separation of Stereoisomers*. 2017.
- [27] L. Toribio, M. J. del Nozal, J. L. Bernal, J. J. Jiménez, and C. Alonso, "Chiral separation of some triazole pesticides by supercritical fluid chromatography &," *J. Chromatogr. A*, vol. 1046, pp. 249–253, 2004.
- [28] J. L. Bernal, L. Toribio, and M. J. Nozal, "Separation of antifungal chiral drugs by SFC and HPLC : a comparative study," *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 54, pp. 245–254, 2002.
- [29] G. Guiochon and A. Tarafder, "Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 8, pp. 1037–1114, 2011.
- [30] K. Kalíková, T. Šlechtová, J. Vozka, and E. Tesařová, "Supercritical fluid chromatography as a tool for enantioselective separation; a review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 821, pp. 1–33, 2014.
- [31] C. Grazieli and C. H. Collins, "Super/subcritical Fluid Chromatography with packed columns: State of the art and applications," *Quím. Nov.*, vol. 37, no. 6, pp. 1047–1057, 2014.
- [32] F. Ó. M. Salcedo, "Aplicación de la tecnología de fluidos supercríticos a la purificación de carbohidratos prebióticos," Universidad Autónoma de Madrid, 2009.

- [33] D. P. Poe, *Theory of Supercritical Fluid Chromatography*. Elsevier Inc., 2017.
- [34] E. Lesellier and C. West, “The many faces of packed column supercritical fluid chromatography – A critical review,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1382, pp. 2–46, 2015.
- [35] NIST, “Water.” [Online]. Available: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C7732185&Mask=4>. [Accessed: 25-Mar-2020].
- [36] NIST, “Carbon dioxide.” [Online]. Available: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=124-38-9>. [Accessed: 24-Mar-2020].
- [37] NIST, “Methyl Alcohol.” [Online]. Available: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C67561&Mask=4>. [Accessed: 25-Mar-2020].
- [38] NIST, “Ethanol.” [Online]. Available: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C64175&Mask=4>. [Accessed: 25-Mar-2020].
- [39] NIST, “Isopropyl Alcohol.” [Online]. Available: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C67630&Type=TC>. [Accessed: 25-Mar-2020].
- [40] NIST, “Ammonia.” [Online]. Available: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C7664417&Mask=4>. [Accessed: 25-Mar-2020].
- [41] NIST, “Acetone.” [Online]. Available: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C67641&Mask=4>. [Accessed: 25-Mar-2020].
- [42] NIST, “Propane.” [Online]. Available: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C74986&Mask=4>. [Accessed: 25-Mar-2020].
- [43] NIST, “n-Hexane.” [Online]. Available: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=110-54-3>. [Accessed: 03-Apr-2020].
- [44] P. J. Linstrom, W. G. Mallard, and National Institute of Standards and Technology, *NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69*. Gaithersburg MD.
- [45] C. Capello, U. Fischer, and K. Hungerbühler, “What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents,” *Green Chem.*, vol. 9, no. 9, pp. 927–934, 2007.
- [46] A. Thienpont, J. Gal, C. Aeschlimann, and G. Félix, “Studies on stereoselective separations of the ‘azole’ antifungal drugs ketoconazole and itraconazole using HPLC and SFC on silica-based polysaccharides,” *Analisis*, vol. 27, no. 8, pp. 713–718, 1999.
- [47] European Pharmacopoeia, “2.2.46. Chromatographic Separation Techniques,” *Eur. Pharmacop. 5.0*, pp. 69–73, 2004.
- [48] K. W. Phinney and R. W. Stringham, “Chiral Separations Using Supercritical Fluid Chromatography,” *Chiral Sep. Tech. A Pract. Approach, Third Ed.*, pp. 135–154, 2007.
- [49] E. T. Morán, “Trabajo de fin de máster: Separación quiral de fluoroquinolonas mediante cromatografía de fluidos supercríticos,” Universidad de Valladolid, 2013.

- [50] L. Toribio, L. Bernal, C. Alonso, and J. J. Jim, "Enantiomeric separation of several antimycotic azole drugs using supercritical fluid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1144, pp. 255–261, 2007.
- [51] National Center for Biotechnology Information, "Cyproconazole | C15H18ClN3O - PubChem, CID=86132," *PubChem Database*, 2019. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cyproconazole>. [Accessed: 20-Nov-2019].
- [52] National Center for Biotechnology Information., "Diniconazole | C15H17Cl2N3O - PubChem, CID=6086269," *PubChem Database*, 2019. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diniconazole>. [Accessed: 20-Nov-2019].
- [53] National Center for Biotechnology Information, "Tetraconazole | C13H11Cl2F4N3O - PubChem, CID=80277," *PubChem Database*, 2019. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tetraconazole>. [Accessed: 20-Nov-2019].
- [54] National Center for Biotechnology Information, "Penconazole | C13H15Cl2N3 - PubChem, CID=91693," *PubChem Database*, 2019. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Penconazole>. [Accessed: 20-Nov-2019].
- [55] National Center for Biotechnology Information, "Econazole | C18H15Cl3N2O - PubChem, CID=3198," *PubChem Database*, 2019. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Econazole>. [Accessed: 20-Nov-2019].
- [56] National Center for Biotechnology Information, "Miconazole | C18H14Cl4N2O - PubChem, CID=4189," *PubChem Database*, 2019. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Miconazole>. [Accessed: 20-Nov-2019].
- [57] National Center for Biotechnology Information, "Tebuconazole | C16H22ClN3O - PubChem, CID=86102," *PubChem Database*, 2019. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tebuconazole>. [Accessed: 20-Nov-2019].
- [58] National Center for Biotechnology Information, "Propiconazole | C15H17Cl2N3O2 - PubChem, CID=43234," *PubChem Database*, 2019. [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Propiconazole>. [Accessed: 20-Nov-2019].
- [59] K. A. Lewis, J. Tzilivakis, D. J. Warner, and A. Green, "An international database for pesticide risk assessments and management," *Hum. Ecol. Risk Assess. An Int. J.*, vol. 22, no. 4, pp. 1050–1064, May 2016.
- [60] G. O. Cantrell, R. W. Stringham, J. A. Blackwell, J. D. Weckwerth, and P. W. Carr, "Effect of Various Modifiers on Selectivity in Packed-Column Subcritical and Supercritical Fluid Chromatography," *Anal. Chem.*, vol. 68, no. 20, pp. 3645–3650, 1996.
- [61] Elena Katz, *Handbook of HPLC*, 78th ed. New York, 1998.

7. Índice de figuras

Figura 1 Enantiómeros del bromoclorofluorometano.	1
Figura 2 Estructura de los grupos imidazol y triazol.	3
Figura 3 Esquema de instrumentación de SFC.	9
Figura 4 Ciclodextrina.	10
Figura 5 Equipo utilizado para la investigación.....	18
Figura 6 Diagrama de flujo para la separación.	19
Figura 7. Estructura química de la fase estacionaria de celulosa tris(3,5-dimetilfenilcarbamato).....	22
Figura 8; 8a cromatograma de miconazol a 20% metano en columna OD, 8b cromatograma de miconazol a 20 % con TFA y TEA al 0.1%; a temperatura de 35°C y presión de 150 MPa.....	22
Figura 9 Estructura química de la fase estacionaria de celulosa tris(3-cloro-4-metilfenilcarbamato).....	23
Figura 10 Diagrama de concentración para modificadores orgánicos de columna lux celulosa 2.....	24
Figura 11 Cromatograma obtenidos para tebuconazol con diferentes concentraciones de modificadores orgánicos a 15%, 20% y 30% a 35°C y 2mL/min.	25
Figura 12 Cromatograma obtenidos para diniconazol con diferentes modificadores orgánicos a 20%, 35°C y 2mL/min. a) 2-propanol, b) metanol y c) etanol.	26
Figura 13 Cromatograma del diniconazol obtenido utilizando 20% metanol, 2 mL/min, 150 MPa y a 35°C.	28
Figura 14 Cromatograma del econazol obtenido utilizando un 30% etanol, 2 mL/min, 150 MPa y a 35°C.	29
Figura 15 Cromatograma del miconazol obtenido utilizando 30% etanol, 2 mL/min, 150 MPa y a 35°C.	29
Figura 16 Cromatograma del penconazol obtenido utilizando 30% etanol, 2 mL/min, 150 MPa y a 35°C.	30
Figura 17 Cromatograma del tebuconazol obtenido utilizando un 30% etanol, 2 mL/min, 150 MPa y a 35°C.	31
Figura 18 Cromatograma del tetraconazol obtenido utilizando 20% metanol, 2 mL/min, 150 MPa y a 35°C.	31
Figura 19 Cromatograma del cyproconazol obtenido utilizando 30% etanol, 2 mL/min, 150 MPa y a 35°C.	33
Figura 20 Rectas Van't Hoff para el diniconazol, modificadores a 20%, 2 mL/min y 150 MPa.	35
Figura 21 Cromatogramas a 20, 25, 30 y 35 °C del Diniconazol, presión de 150 MPa, flujo de 2 mL/min y modificador 2-propanol al 20%.	36
Figura 22 Rectas Van't Hoff para tetraconazol, modificadores a 20%, 2 mL/min y 150 MPa.	36
Figura 23 Cromatogramas a 20, 25, 30 y 35 °C de tetraconazol, presión de 150 MPa, flujo de 2 mL/min y modificador etanol al 20%.	37
Figura 24 Rectas Van't Hoff para enantiómeros 2-3 del cyproconazol, modificadores a 20%, 2 mL/min y 150 MPa.	38
Figura 25 Rectas Van't Hoff para enantiómeros 3-4 del cyproconazol, modificadores a 20%, 2 mL/min y 150 MPa.	38

Figura 26 Cromatogramas a 20, 25, 30 y 35 °C de econazol, presión de 150 MPa, flujo de 2 mL/min y modificador etanol al 20%.....	39
Figura 27 Cromatogramas a 20, 25, 30 y 35 °C de econazol, presión de 150 MPa, flujo de 2 mL/min y modificador etanol al 20%.....	41
Figura 28 Cromatogramas a 20, 25, 30 y 35 °C de miconazol, presión de 150 MPa, flujo de 2 mL/min y modificador etanol al 20%.	41
Figura 29 Cromatogramas a 20, 25, 30 y 35 °C de penconazol, presión de 150 MPa, flujo de 2 mL/min y modificador 2-propanol al 20%.	42
Figura 30 Cromatogramas a 20, 25, 30 y 35 °C de tebuconazol, presión de 150 MPa, flujo de 2 mL/min y modificador etanol al 20%.	42

8. Índice de tablas

Tabla 1. Parámetros Críticos de Sustancias	7
Tabla 2 Fungicidas estudiados.	15
Tabla 3 Columnas Cromatográficas a estudiar	17
Tabla 4 Modificadores orgánicos utilizados en la investigación	21
Tabla 5 Variación del tiempo de retención (min) con el porcentaje y tipo de modificador orgánico.	25
Tabla 6 Parámetros de separación cromatográfica para los fungicidas estudiados.....	27
Tabla 7 Parámetros de cromatográficos obtenidos para cyproconazol.	32
Tabla 8 Efecto de la temperatura en la separación enantiomérica para diniconazol, econazol, miconazol, penconazol, tebuconazol y tetraconazol.....	34
Tabla 9 Parámetros termodinámicos para la separación enantiomérica de diniconazol	35
Tabla 10 Parámetros termodinámicos para la separación enantiomérica de tetraconazol	37
Tabla 11 Parámetros termodinámicos para la separación enantiomérica de cyproconazol	39
Tabla 12 Efecto de la temperatura en la separación enantiomérica para cyproconazol.....	40