

SEPARACIÓN ENANTIOMÉRICA DE FUNGICIDAS QUIRALES POR CROMATOGRAFÍA DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Expositor e investigador

Luis Carlos Morán Alarcón

Departamento de Ingeniería de Procesos y Ciencias Ambientales

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 le conoce como enantiómero. Esta es una forma de estereoisomería, es decir que posee la misma forma molecular, las mismas propiedades físicas y químicas, pero se diferencia en su configuración espacial, su actividad óptica y su reactividad en entornos quirales, lo cual hace que la toxicidad, degradabilidad y la bioactividad en cada uno de los enantiómeros pueda ser diferente (Wade, 2012).

El estudio de las sustancias quirales tiene gran importancia en el área medioambiental, esto se debe primero a la gran producción de pesticidas a nivel mundial con un valor de cuatro millones de toneladas para el 2017. De estos, el 27% corresponde a pesticidas son quirales (Williams, 1996), (Ulrich y otros, 2012). En segundo lugar, la falta de producción de pesticidas quirales enantioméricamente trae como consecuencia una diferencia en la actividad enantiomérica, lo que produce situaciones problemáticas, por ejemplo:

a) Una parte de los productos puede ser inútil. b) Esta carga inútil hay que retirarla de los sistemas ambientales donde se ha utilizado, c) Una parte de los productos

pueden reaccionar con selectores celulares diferentes y causar efectos secundarios y potencialmente tóxicos (Williams, 1996).

Los fungicidas son un grupo importante de pesticidas de uso común. Se definen como 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 como en animales, pero no solo cumplen esta función, sino que generan un ambiente adecuado para evitar el desarrollo y el crecimiento de otros organismos interferentes en los cultivos (Melgarejo García, 2011). Entre los fungicidas más comunes están los de tipo azólicos, que se caracterizan por la presencia de un grupo amino, grupos aromáticos y grupos complementarios como OH, O y otros metales (Andani, 2010), (Fortún Abete, 1998).

En los últimos años, la mayoría de las empresas de química y farmacéutica, por las necesidades sociales, ambientales y económicas, han aumentado su interés en vender productos enantioméricamente puros (Ekhn, 2009), lo que las ha llevado a desarrollar métodos analíticos que permiten separar los enantiómeros. Entre las técnicas analíticas utilizadas para este fin están los métodos polarimétricos (dispersión óptica rotatoria y dicroísmo circular) y los

métodos cromatográficos (gases (GC), líquidos (LC) y fluidos supercríticos (SFC)), siendo estas últimas las que tiene mayor popularidad (Fernández, 2013).

Las separaciones quirales SFC se han 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, y es posible utilizar un abanico más amplio de disolventes orgánicos polares, por lo que la SFC es considerada una técnica más verde (Pérez Fernández y otros, 2011), (Toribio y otros, 2004), (Bernal y otros, 2011).

El objetivo general de la investigación fue estudiar la separación enantiomérica de siete fungicidas de uso comercial (diniconazol, econazol, miconazol, penconazol, tebuconazol, tetraconazol y cyproconazol) utilizando la técnica de cromatografía de fluidos supercríticos. Para alcanzar el objetivo general, se plantearon tres objetivos específicos:

- Estudiar el comportamiento de diferentes fases estacionarias para posteriormente seleccionar las más adecuadas. Para este objetivo se delimitó el estudio de dos columnas cromatográficas comerciales con distintas fases estacionarias:

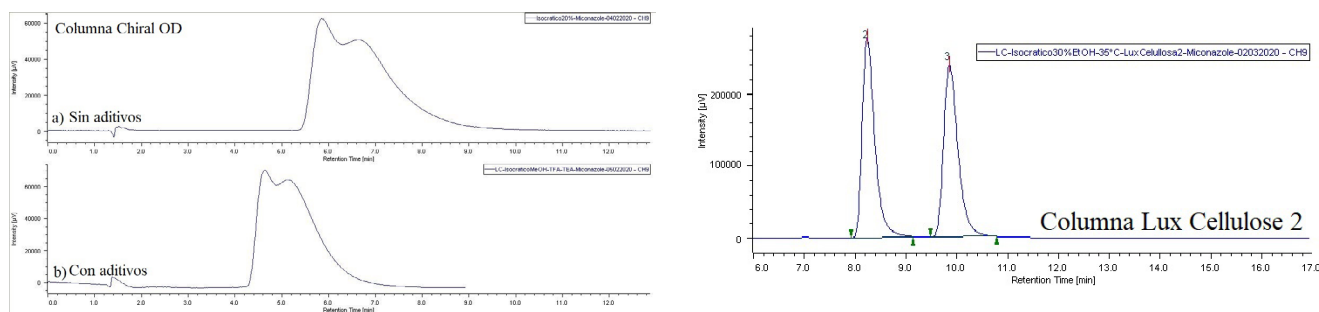
- Columna Chiral OD (tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulosa).
- Columna Lux Cellulose 2 (tris (3-cloro-4-metilfenilcarbamato) de celulosa).

- Estudiar el efecto del tipo y concentración del modificador orgánico en la separación enantiomérica. Para ello se tomó a bien estudiar los siguientes modificadores y sus respectivas concentraciones:
 - Metanol (15%, 20% y 30%).
 - Etanol (15%, 20% y 30%).
 - 2-propanol (10% y 20%). Esto debido al incremento del gradiente de presión en la columna.
- Evaluar la influencia de la temperatura en la separación quiral de los siete fungicidas estudiados. Se evaluó la influencia a las temperaturas de 20°, 25°, 30° y 35°C.

Los resultados y conclusiones obtenidos en la investigación se describen a continuación.

1. De las dos columnas quirales estudiadas en este trabajo, la columna Lux Cellulose 2 fue la que proporcionó los mejores resultados para la separación enantiomérica de los siete fungicidas. En la Figura 1 se muestran los cromatogramas de resultados para ambas columnas en la prueba preliminar.

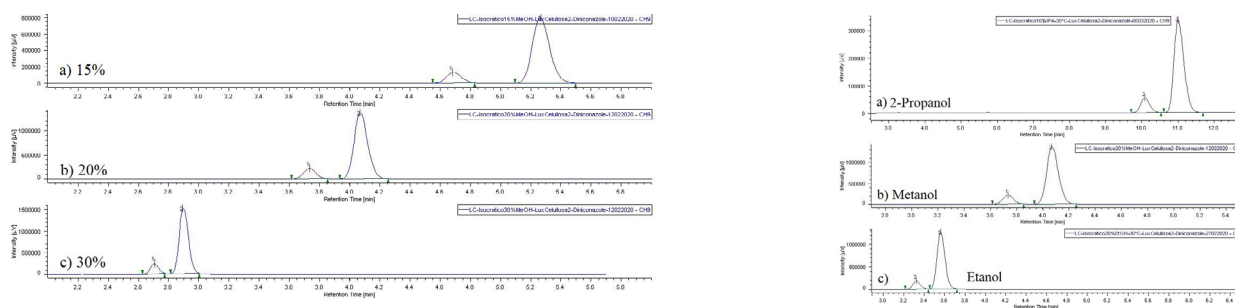
Figura 1. Comparación de resultados para las columnas estudiadas. A) Columna OD. B) Columna Lux Cellulose 2



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. En la Figura 2 se muestra el comportamiento del incremento del porcentaje de modificador orgánico para el tebuconazol y la variación del tipo de modificador orgánico para el diniconazol.

Figura 2. Comportamiento en la variación del tipo de modificador y la concentración.

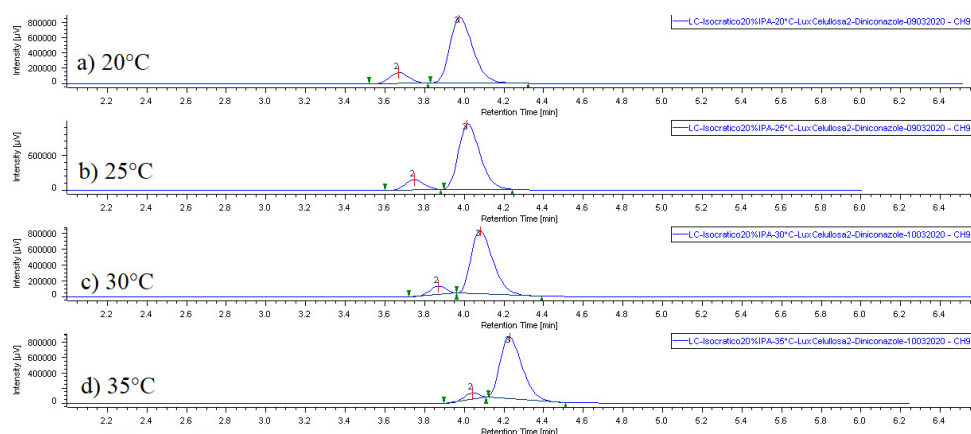


3. En la mayoría de los casos, el modificador que proporcionó los mejores resultados en términos de retención y resolución fue un 30% de etanol. Así se consiguieron resoluciones enantioméricas superiores a 2, en tiempo de análisis inferiores a 10 minutos (para varios compuestos inferiores a 5 minutos). Para el diniconazol y tetraconazol, los mejores resultados se obtuvieron utilizando un 20% de metanol; siendo precisamente para el tetraconazol que se obtuvieron las mayores enantioresoluciones mayores a 7 con todos los modificadores.

tendencia lineal en las representaciones de Van't Hoff, confirmando la dependencia de la temperatura en la separación. Existe un control entálpico, ya que al aumentar la temperatura la resolución y el factor de selectividad disminuyen. Por otro lado, la temperatura de isoelución calculada está por encima al rango de trabajo empleado y los valores de entalpias fueron 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. Para el resto de fungicidas no se obtuvieron tendencias lineales en las representaciones de Van't Hoff.

4. El estudio de la influencia de la temperatura en la separación de los fungicidas estudiados mostró que para diniconazol (etanol y 2-propanol) en la Figura 3, tetraconazol (etanol y 2-propanol) y cyproconazol (para enantiómeros 2-3 y 3-4 en etanol y etanol y 2-propanol, respectivamente) existe una

Figura 3. Cromatogramas a 20°, 25°, 30° y 35 °C del diniconazol, presión de 15 MPa, flujo de 2 mL/min y modificador 2-propanol al 20%.



Referencias bibliográficas

- Andani, E. P.** (2010). *Selección y caracterización de anticuerpos recombinantes para fungicidas. Aplicación al desarrollo de técnicas inmunoanalíticas*. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Bernal, J. L., Toribio, L., and Nozal, M. J.** (2002). Separation of antifungal chiral drugs by SFC and HPLC: a comparative study. *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 54, pp. 245-254.
- Ekhon, B. S. S.** (2009). Chiral pesticides. *Pestic. Sci*, vol. 34, n°. 1, pp. 1-12.
- Fernández, V. P.** (2013). Separación enantiomérica y/o determinación de compuestos de interés medioambiental por metodologías analíticas electroforéticas y cromatográficas innovadoras. Universidad de Alcalá, España.
- Fortún Abete, J.** (1998). Antifúngicos: Azólicos, Imidazoles y Triazoles. *Medicine (Baltimore)*, vol. 7, pp. 4231-4241.
- Melgarejo García, J.** (2011). Mecanismos de acción de los fungicidas. En *Manejo Integrado de Enfermedades*. S. E.
- Pérez Fernández, V., García, M. A., and Marina, M. L.** (2011). Chiral separation of agricultural fungicides. *J. Chromatography*, vol. 1218, pp. 6,561-6,582.
- Toribio, L., del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Jiménez, J. J., and Alonso, C.** (2004). Chiral separation of some triazole pesticides by supercritical fluid chromatography, *J. Chromatography. A* vol. 1,046, pp. 249-253.
- Ulrich, E. M., Morrison, C. N., Goldsmith M. R., and Foreman, W. T.** (2012). Chiral pesticides: identification, description, and environmental implications. *Rev. Environ. Contam. Toxicol*, vol. 217, pp. 1-74.

Wade, J. L.G. (2012). *Química Orgánica*, vol. 1, Séptima: México

Williams, A. (1996). Opportunities for chiral agrochemicals. *Pestic. Sci*, vol. 46, nº. 1, pp. 3-9.