

**FACULTAD DE CIENCIAS
GRADO EN QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE CÁDIZ**



2014 / 2015

**Optimización de la Síntesis Química del Precursor “2-(2'-nitrofenoxi)-
acetato de metilo” partiendo del 2-nitrofenol**

Memoria que presenta:

D^a Elena María Gross Sánchez

Para optar al título de Graduada en Química

Puerto Real, Septiembre de 2015

D. JOSÉ MARÍA GONZÁLEZ MOLINILLO Y FRANCISCO ANTONIO MACÍAS DOMÍNGUEZ,
CATEDRÁTICOS DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

HACEN CONSTAR:

Que el Trabajo de Investigación, de Fin de Grado, titulado: **Optimización de la síntesis química del precursor "2-(2'-nitrofenoxi)-acetato de metilo" partiendo del 2-nitrofenol**, constituye la memoria que presenta **D^a Elena María Gross Sánchez**, para optar al título de Graduada en Química. Este trabajo ha sido realizado íntegramente en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica de esta Universidad, bajo nuestra dirección. Ha sido supervisada por nosotros y consideramos que reúne los requisitos para optar al título de Graduada en Química.

Y, para que así conste, expedimos y firmamos el presente informe en Puerto Real, Cádiz, a de Septiembre de 2015.

Fdo: José María González Molinillo

Fdo: Francisco Antonio Macías Domínguez

D. JOSÉ MANUEL IGARTUBURU CHINCHILLA, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA DE LA UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

HACE CONSTAR:

Que el Trabajo de Investigación, de Fin de Grado titulado: **Optimización de la síntesis química del precursor "2-(2'-nitrofenoxi)-acetato de metilo" partiendo del 2-nitrofenol**, constituye la memoria que presenta **D^a Elena María Gross Sánchez**, para optar al título de Graduada en Química. Este trabajo ha sido realizado íntegramente en los laboratorios del Departamento de Química Orgánica de esta Universidad, bajo la dirección de los profesores D. JOSÉ MARÍA GONZÁLEZ MOLINILLO y D. FRANCISCO ANTONIO MACÍAS DOMÍNGUEZ.

Y, para que así conste, expido y firmo el presente informe en Puerto Real, Cádiz, a de Septiembre de 2015.

Fdo: José Manuel Igartuburu Chinchilla
Director del Departamento de Química Orgánica

Agradecimientos

A mis compis de laboratorio y, en general, a todo el grupo de investigación: Antonio, Rondi, Javi Col, David, Jesús, Púa, Ore, Bruna, Carlos, Maite, Álvaro, María, Ana, Rosa, Chon...por impulsarme cuando lo he necesitado y por reír conmigo siempre convirtiendo los días en segundos. En especial, a Sandra, porque tú has sido mi profe, sin tu ayuda continua no estaría donde estoy hoy.

A Francisco Antonio, por contagiar a todas aquellas personas que te rodean, del amor tan grande que sientes por tu trabajo, la química, como nadie en este mundo lo haría. Porque esa pasión fue la que me hizo decidir que quería formar parte de este maravilloso e increíble grupo.

A David, por ser el compi más guay de laboratorio que se pueda tener. No sólo me llevo a un compañero de profesión, sino a un buen amigo de risas y fatigas.

A mis amigos...por todos esos cafés que no nos hemos podido tomar y las veces que no hemos podido salir. Muy especialmente a Gaby, por ser la hermana que nunca tuve y siempre estar ahí, día sí y día también animándome y apoyándome en las distintas etapas que han ocurrido durante estos 4 años, eres la mejor amiga que cualquiera desearía tener.

A mi segunda familia Paco, Isa, Marina...por darme tantísimos ánimos y cariño durante mi última y más dura etapa, no puedo sentirme más afortunada por teneros en mi vida. Porque sin "Los Rodríguez" y "Los Mejías" la vida no tiene "jrasia", sois únicos.

A mi familia. A mi madre, mi tita Mery, y mis hermanos John y Héctor. Gracias por todas las emociones que me dais en la vida porque, si no estuvieran, sería demasiado aburrida. En especial a tí Vicente, porque te has convertido en mi segundo padre y porque básicamente te debo estar donde estoy. Ay! todas esas charlas...

A todos y cada uno de mis profesores, por formarme día a día, por generarme ilusión constante por aprender, he disfrutado increíble pudiendo descubrir un mundo tan gigante como el nuestro de vuestra mano. A mi mami química Loli, a mi papi químico Ayuso y a Mila, porque sin vuestro ánimo cuando comencé, y a lo largo de todos estos años, no hubiera conseguido llegar a la meta.

Particularmente a Chema y a Buru, por no cansaros de mis infinitas preguntas, por ayudarme siempre, vuestra generosidad y amabilidad siempre con todos. Chema, por tu continuo e incansable trabajo conmigo y por tu apoyo cuando las cosas no funcionaban como debían.

A ti Javi....porque eres sin duda lo mejor que me ha dado esta carrera. Porque crecemos juntos cada día y porque sin nuestro EQUIPO P.P. nada tiene sentido ^^

ÍNDICE

1.	Resumen.....	9
2.	Abstract.....	11
3.	Introducción.....	13
3.1.	La Problemática de las Malas Hierbas en Agricultura.....	13
3.1.1.	Métodos de Control de Malas Hierbas y su Eficacia ante Fenómenos de Resistencia.....	13
3.2.	Productos Naturales de Origen Vegetal con Actividad Fitotóxica.....	15
3.2.1.	Metabolitos Secundarios con Esqueleto de 2(H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona. Actividad Biológica.....	16
3.3.	Síntesis de Compuestos con Esqueleto de (2H)-1,4-benzoxacin-3-(4H)-ona.....	18
4.	Objetivos.....	21
5.	Experimental.....	22
5.1.	Reactivos e Instrumentación.....	22
5.2.	Técnicas Experimentales.....	23
5.2.1.	Cromatografía en Capa Fina (CCF)	23
5.2.2.	Cromatografía en Columna(CC)	23
5.2.3.	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia(HPLC)	23
5.2.4.	Espectrometría de Masas.....	25
5.2.5.	Resonancia Magnética Nuclear	25
5.3.	Método de Obtención.....	26
5.3.1.	Diseño de Experimentos.....	26
5.3.2.	Síntesis de 2-(2'-nitrofenoxi)-acetato de metilo.....	27
5.3.3.	Elaboración de las Rectas de Calibrado.....	28
6.	Resultados y Discusión.....	30
6.1.	Caracterización de los Compuestos que intervienen en la Reacción.....	30
6.2.	Tratamiento Estadístico de los Datos.....	31
6.2.1.	Concentraciones a partir de las Rectas de Calibrado.....	31
6.2.2.	Rendimientos de Reacción.....	32
6.2.3.	Ecuación de Velocidad.....	33
6.2.4.	Energía de Activación.....	35
6.3.	Variación del Volumen de Bromoacetato de Etilo.....	37
6.4.	Variación de la Cantidad de 2-nitrofenol	39
6.5.	Variación de la Cantidad de Hidróxido de Potasio	41
6.6.	Variación de la Temperatura	43
6.7.	Variación de la Atmósfera de Reacción.....	45
6.8.	Variación del Tiempo de Reacción.....	47
7.	Conclusiones.....	48
8.	Referencias.....	49
9.	Anexos	

1. Resumen

La **Alelopatía** es: “la ciencia que estudia procesos que implican metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos que influyen en el crecimiento y desarrollo de sistemas cultivados y biológicos” y en el que, por tanto, se incluye cualquier interacción de las plantas con su medio ambiente.

En los últimos años, se viene desarrollando la búsqueda de nuevos herbicidas basados en metabolitos secundarios producidos por plantas que sean respetuosos con el medio ambiente, de buena degradabilidad, atóxicos para el ser humano, y que presenten la mejor respuesta posible ante los actuales, y cada vez más frecuentes, fenómenos de resistencia.

Los productos naturales de origen vegetal se presentan como una fuente atractiva de sustancias agroquímicas, no sólo por su diversidad estructural, sino por su acción biológica específica y su carácter inocuo “*a priori*” para el medio ambiente. Dentro de estos productos naturales vegetales de elevada actividad, se destacan los ácidos benzohidroxámicos (metabolitos secundarios con esqueletos de (2H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona), que además, se trata de uno de los grupos de aleloquímicos mayormente estudiados. Entre los de mayor interés, se encuentra el **D-DIBOA** (4-hidroxi-(2H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona), que presenta elevadas **fitotoxicidad y estabilidad y muy buena degradabilidad** en suelos de cultivo. Además, la producción de 6-Cl-D-DIBOA presenta **alta actividad** y 8-Cl-D-DIBOA **alta selectividad** frente a diferentes especies.

La **síntesis de ácidos benzohidroxámicos (benzoxacinonas)** tiene lugar en dos etapas. La primera de ellas consiste en una reacción de sustitución nucleofílica de los productos comerciales derivados del 2-nitrofenol con diferentes sustituyentes en el anillo bencénico. La segunda etapa se trata de una reacción de reducción del grupo nitro aromático.

Debido al riesgo de explosión que implica la segunda etapa de reacción, que se trata de una reacción de catálisis heterogénea exotérmica con desprendimiento de hidrógeno, se exploraron nuevas alternativas.

La segunda etapa, como se estudió en el Proyecto Colaborativo “P06-TEP-01399 (Producción Biotecnológica de Ácidos Benzohidroxámicos Bioactivos)”, también se puede llevar a cabo mediante una biotransformación con la utilización de *E.coli*.

El presente trabajo se enmarca dentro de un proyecto de excelencia concedido por la Junta de Andalucía en el año 2014, cuyo objetivo general es **la producción biotecnológica de D-DIBOA mediante la mejora genética de *Escherichia coli*, así como la optimización global del proceso de biotransformación.**

Tanto para la síntesis de D-DIBOA a escala de laboratorio, como para su producción biotecnológica mediante el uso de la bacteria *E.coli*, se requiere del precursor **2-(2'-nitrofenoxi)-acetato de metilo.**

En la presente memoria, se estudian las **condiciones óptimas** de la **reacción de síntesis** de dicho precursor con el fin de determinar la forma de alcanzar el **mayor rendimiento posible**. Para ello, se realiza un diseño de experimentos, un posterior tratamiento estadístico de los datos recopilados y se obtiene un modelo matemático que es el que rige la reacción. Se analizan los cambios que provocan en el rendimiento de reacción los siguientes parámetros: **concentración de reactivos, tiempo** de reacción, **temperatura**, y **atmósfera** de reacción.

2. Abstract

Allelopathy is: “the science that studies processes where secondary metabolites produced by plants, algae, bacteria and fungi and that influences the growth and development of cultivated and biological systems” and where we therefore, include whatever interaction between plants and their environment.

During the last years, a search for new herbicides based on plants secondary metabolites, has been developed. These must be eco-friendly, must have a good degradability, and they also have to be non-toxic for human beings and effective against the increasingly resistance phenomena.

Natural products arise as an attractive source of agrochemical substances, not only because of their structural diversity, but because of their specific biological action and their “*a priori*” harmless nature towards their environment. We highlight **benzohydroxamic acids** (secondary metabolites with a (2H)-1,4-benzoxazin-3(4H)-one skeleton) as natural compounds that come from plants and have shown a high activity. They are also one of the larger studied allelochemicals’ group. Within the most interesting ones, we can find **D-DIBOA** (4-hydroxy-(2H)-1,4-benzoxazin-3-(4H)-one), which presents **high phytotoxicity** and **stability**, and also a **very good degradability** in soil. Also, 6-Cl-D-DIBOA has a **high activity** and 8-Cl-D-DIBOA has a **high selectivity** towards different species.

The chemical synthesis of **benzohydroxamic acids** (benzoxacinones) takes place within two steps. The first one consists of a nucleophilic substitution by using commercial derivatives of 2-nitrophenol products with different substituents in the benzenic ring. The second step consists of a reduction reaction of the aromatic nitro group.

Due to the explosion risk that the second step of the reaction implies (it’s an exothermic heterogeneous catalysis with hydrogen releasing), new alternatives were explored.

The second step can be done by the use of *E.coli* in a biotransformation, as it was concluded in the Collaborative Project “P06-TEP-01399 (Producción Biotecnológica de Ácidos Benzohidroxámicos Bioactivos)”.

The present work is part of an excellence project granted by “La Junta de Andalucía” during 2014, which general objective is, **D-DIBOA biotechnological production by the means of**

genetically improving *Escherichia Coli*, as well as the global optimization of the biotransformation process.

Whether at a laboratory scale or for the biotransformation via *E.coli* to obtain D-DIBOA, the precursor **Methyl 2-(2'-nitrophenoxy)acetate**, is required.

In the present memory, we try to determine the **optimal conditions** of the precursor **synthesis reaction** in order to obtain the **best efficiency possible**. With this purpose we design an experimental work plan followed by a statistical treatment of the collected data. This way we are able to obtain the mathematical model that rules the reaction. We analyse the yield depending off the variation of the following parameters: **reagent's concentration**, reaction **time**, **temperature** and reaction's **atmosphere**.

3. Introducción

3.1. La Problemática de las Malas Hierbas en Agricultura

Por mala hierba o, también denominada “planta inoportuna” se entiende como “cualquier planta que es perjudicial o interfiere en las actividades humanas” (definición fijada por la “Weed Science Society of America”) o como “cualquier planta que crece en un lugar y en un momento no deseados.”¹ Las características biológicas comunes de las malas hierbas han sido descritas por Baker H.G.²

Según este autor las malas hierbas “ideales” son capaces de germinar y desarrollarse en una amplia variedad de condiciones ambientales. Su germinación es discontinua, lo cual impide predecir la invasión. La transición desde el estado vegetativo a la floración es muy rápida y, además, producen semillas ininterrumpidamente, lo cual les confiere una buena reproducibilidad. Asimismo, su dispersión se encuentra garantizada mediante propagación gracias al viento o por transporte en el tracto digestivo de animales.

Debido al interés del ser humano de proteger sus cultivos, desde el comienzo de la agricultura, se viene investigando la forma de garantizar las cosechas, de forma que, estos negativos agentes externos generen en ellas el menor impacto posible. Es así, como surgieron los herbicidas. Con ellos, los agricultores pensaban en un período de bonanza que les generaría unos mayores rendimientos y mejoras en la calidad.

3.1.1. Métodos de Control de Malas Hierbas y su Eficacia ante Fenómenos de Resistencia

Sin embargo, a mediados de los años 60, comenzó a observarse un nuevo problema, el fenómeno de la **resistencia**. Este se define como “la capacidad heredada de una planta para sobrevivir y reproducirse después de una exposición a una dosis de herbicida que normalmente sería letal a su especie”.

¹Putnam, A.R. “The Science of Allelopathy”. Putnam, A.R. and Tangs, C.S Eds., **1986**.

²Baker, H.G. “The Characteristics and Modes of origin Weeds”. In: “The genetics of colonizing species”, Baker, H.G.; Stebbins, G.L. Eds., Academic Press, **1965**, 147-162.

A día de hoy, hay descritos 304 biotipos de malas hierbas resistentes a herbicidas en el mundo, con una media de aparición de nueve casos por año.³ Actualmente, el Herbicide Resistance Action Committee (HRAC)* recoge 269 herbicidas que se clasifican sólo en 17 sitios de acción diferentes. De ellos, prácticamente la mitad (todos ellos descubiertos antes de 1985), se agrupan en tres sitios de acción:

- Inhibición de la síntesis del acetolactato.
- Inhibición de la protoporfirinógeno oxidasa.
- Afección del fotosistema II.

Esto pone de manifiesto la escasez de recursos que se poseen para combatir las malas hierbas. Dado que los herbicidas son imprescindibles para la agricultura, incluso en las técnicas integradas de control, es necesario obtener compuestos que posean nuevas estructuras químicas que presenten nuevos, mejores, diferentes y más eficientes modos de acción, además de ser respetuosos con el medio ambiente, atóxicos para el ser humano, y de buena degradabilidad.

Ante esta perspectiva, los productos naturales se presentan como una fuente atractiva de sustancias agroquímicas, no sólo por su diversidad estructural, sino por su acción biológica específica y su carácter inocuo “*a priori*” para el medio ambiente. En este sentido, los pocos herbicidas comerciales basados en productos naturales (tricetonas, bialafos y glufosinato) poseen modos de acción totalmente nuevos. Estos metabolitos secundarios son “herbicidas naturales” potenciales generados por una planta para evitar el crecimiento de las que las circundan.

Por otra parte, para que los resultados y observaciones de los ensayos de laboratorio puedan tener efectos sobre su posible aplicación como agroquímicos, deben considerarse otros factores^{4, 5,6} tales como:

³ Heap, I.M. “The Occurrence of Herbicide Resistance Weeds Worldwide” *Pest. Sci.*, **1997**, *51*, 235-243.

* <http://plantprotection.org/HRAC/>

⁴ Muller C.; Ed. Dr. W; Junk B. “Handbook of Vegetation Science part VI: Vegetation and Environment”. *The Hague*. 1974.

⁵ Romeo J.T.; Weidenhamer J. “Bioassays for Allelopathy in Terrestrial Plants in: Methods in Chemical Ecology. Bioassay Methods”. *Kluwer Academia Publishing*. 1998.

⁶ Romeo J.T. “Raising the Beam: Moving beyond Phytotoxicity”. *Journal of Chemical Ecology*. 2000; *26* (9):2011-2014.

- Presencia y posterior liberación de aleloquímicos.
- Inhibición de crecimiento de la planta receptora y la interferencia de los aleloquímicos en procesos fisiológicos fundamentales.
- Destino final del aleloquímico en el suelo.
- La dinámica de este aleloquímico en el suelo y su absorción por la planta receptora.
- Reducción de la toxicidad de los aleloquímicos adsorbidos por la planta receptora.
- Efectos aleloquímicos sobre la ecología microbiana y dinámica de los nutrientes.
- Interacción de estos aleloquímicos con sustancias promotoras (nitratos), inhibidoras (ácidos fenólicos) y neutras (glucosa) en el medio.
- El efecto sobre una tercera planta que participe en detrimento de la receptora.

3.2. Productos Naturales de Origen Vegetal con Actividad Fitotóxica.

Entre los productos naturales de origen vegetal con mayor actividad fitotóxica, se encuentran las lactonas sesquiterpénicas ⁷ como la artemisina y la guayanolida dehidrozaluzanina C ⁸ y diterpénicas, como el quasinoide chaparrinona ⁹.

Existen, además de los terpenoides, muchas otras familias de productos naturales, como los flavonoides y las cumarinas, entre las que cabe destacar Cumarina, Escopoletina y Psoraleno, que presentan interesante actividad fitotóxica¹⁰ y que, por tanto, se presentan como buenas candidatas para el desarrollo de nuevos herbicidas.¹¹

Estos productos naturales de origen vegetal comentados, junto con muchos otros, constituyen una importante fuente de nuevos mecanismos de acción herbicida. ^{12,13}

⁷ Macias, F.A.; Fernandez, A.; Varela, R. M.; Molinillo, J. M. G.; Torres, A.; Alves, Pedro L. C. A. "Sesquiterpene Lactones as Allelochemicals". *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 795-800.

⁸ Macias, F.A.; Galindo, J. C. G.; Molinillo, J. M. G.; Castellano D. "Natural Products as Allelochemicals. 10. Dehydrozaluzanin C: a potent plant growth regulator with potential use as a natural herbicide template". *Phytochemistry*. **2000**, *54*, 165-171.

⁹ Dayan, F. E.; Watson, S. B.; Galindo, J. C. G.; Hernandez, A.; Dou, J.; McChesney, J.D.; Duke, S.O. "Phytotoxicity of quassinoids: Physiological responses and structural requirements". *Pest. Biochem. Physiol.* **1999**, *65*, 15-24.

¹⁰ Alliot, G.; Cafiero, G. En: "Principles and practices in plant ecology". Inderjit, Dakshini K. M. M., Foy, C. L., Eds.; CRC: Boca Raton, FL; **1999**, pp 551-563.

¹¹ Macias, F.A.; Molinillo, J. M. G.; Galindo, J. C. G.; Varela, R. M.; Simonet, A. M.; Castellano, D. "The use of allelopathic studies in the search for natural herbicides". *J. Crop. Prod.* **2001**, *4*, 237-255.

¹² Duke, S.O.; Romagni, J. G.; Dayan, F. E "Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action". *Crop Protection*. **2000**, *19*, 583-589.

¹³ Vyvyan, J.R. "Allelochemicals as lead for new herbicides and agrochemicals". *Tetrahedron*. **2002**, *58*, 1631-1646.

Como se viene analizando a lo largo de los años, los biocomunicadores de origen vegetal ostentan un papel ecológico fundamental que, al influir en el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos (agentes aleloquímicos), constituyen una de las principales fuentes de compuestos para el desarrollo de nuevos modelos de herbicidas naturales.

3.2.1. Metabolitos Secundarios con Esqueleto de 2(H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona. Actividad Biológica.

Las estructuras de los productos naturales bioactivos son habitualmente complicadas debido a la presencia de uno o más centros estereogénicos. Su preparación a escala multigramo, necesaria para bioensayos a nivel de campo o invernadero, es a menudo difícil y costosa. Los benzoxacinoides son una familia de aleloquímicos ampliamente estudiada ¹⁴ que, debido a su simplicidad estructural, en comparación con otros metabolitos secundarios bioactivos, eliminan la necesidad de utilizar fragmentos de la molécula.

En fitoquímica, desde la aparición de la 2,4-dihidroxi-(2H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona (**DIBOA**) y la 2,4-dihidroxi-7metoxi-(2H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona (**DIMBOA**), los **ácidos benzohidroxámicos** (Figura 1) con esqueleto de (2H)-1,4-benzoxacin-3(4H)-ona, han suscitado el interés de los investigadores. Estos compuestos se aislaron por primera vez en 1959 y 1962 de *Secale cereale* L. (centeno) ¹⁵ y *Zea mays* L. (maíz) ¹⁶, respectivamente. También se analizan en raíces de *Triticum aestivum* L. (trigo) ¹⁷, presentándose en ellas el DIMBOA como metabolito mayoritario ¹⁸. Estos ácidos benzohidroxámicos se producen principalmente en especies de la familia Poaceae (trigo, maíz y centeno). Además de aislarse algunos de estos compuestos de otras familias como Acanthaceae ¹⁹, Ranunculaceae ²⁰, Scrophulariaceae ²¹ y Lamiaceae ²².

¹⁴ Macías, F.A.; Marín, D.; Oliveros-Bastidas A.; Molinillo, J. M. G. "Rediscovering the Bioactivity and Ecological Role of 1,4-Benzoxazinones". *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 478-489.

¹⁵ Virtanen, A.I.; Hietala, P.K. "The Structures of the Precursors of Benzoxazolinone in Rye Plants". *II. Suomen Kemistilehti B.* **1959**, *32B*, 252.

¹⁶ Hamilton, R.H.; Bandurski, R.S.; Reusch, W.H. "Isolation and Characterization of a Cyclic Hydroxamate from *Zea Mays*". *Cereal Chem.* **1962**, *39*, 107-113.

¹⁷ Virtanen, A.I.; Hietala, P.K. "Synthesis of Precursor II of Benzoxazolinone formed in Rye Plants and the Enzymic Hydrolysis of Precursor I, the Glucoside". *Acta Chem. Scand.* **1960**, *14*, 504.

¹⁸ Copaja, S.V.; Nicol, D.; Wratten, S.D. "Accumulation of Hydroxamic Acids during Wheat Germination". *Phytochemistry.* **1999**, *50*, 17-24.

¹⁹ Wolf, R.B.; Spencer, G.F.; Plattner, R.D. "Benzoxazolinone, 2,4-Dihydroxi-1,4-Benzoxazin-3-one, and its Glucoside from *Acanthus mollis* Seeds inhibit Velvetleaf Germination and Growth". *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 59-63.

²⁰ Özden, S.; Özden, T.; Attila J.; Kücülkislamoglu, M.; Okatan, A. "Isolation and Identification by High-Performance Liquid Chromatography and Thin-Layer Chromatography of Benzoxazolinone Precursors from *Consolida orientalis* Flowers". *J. Chromatogr.* **1992**, *609*, 402.

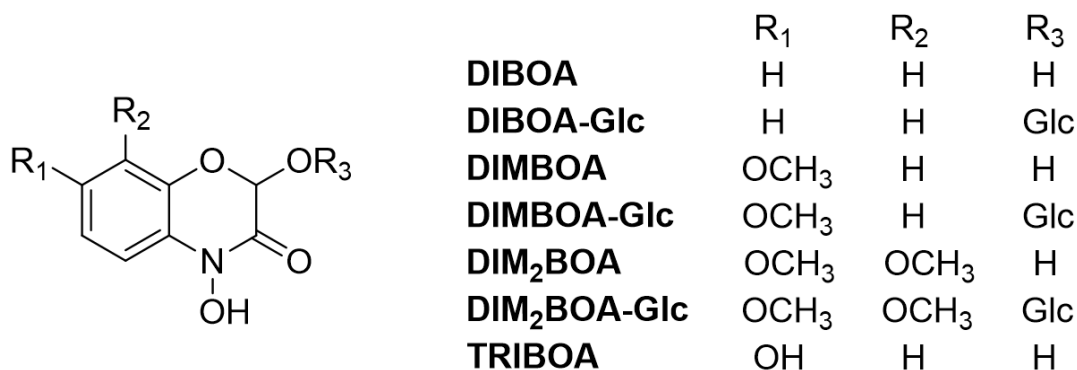


Figura 1.- Ácidos benzohidroxámicos aislados a partir de productos naturales.

La bioactividad de las benzoxacinonas se viene analizando desde diversos puntos de vista, siendo su mayor contribución la relacionada con su papel en las interacciones químico-ecológicas. Los benzoxacinoides participan de la defensa de la planta frente a ataques por parte de hongos,²³ insectos²⁴ y bacterias²⁵, antes de conocer incluso su origen y estructura²⁶, ya se habían descrito sus efectos antimicrobiales. También se han reseñado sus efectos fitotóxicos y antifúngicos²⁷ y, su producción se ha relacionado con situaciones de estrés de la planta ante la presencia de herbívoros.²⁸ Muchas de las revisiones clásicas de la bioactividad de las benzoxacinonas se han relacionado con su papel en las interacciones alelopáticas.^{29,30,31,32}

²¹ Pratt, K.; Kumar, P.; Chilton, W. S. "Cyclic Hydroxamic Acids in Dicotyledonous Plants". *Biochem. Syst. Ecol.* **1995**, *23*, 781.

²² Alipieva, K.I.; Taskova, R.M.; Evstatieva, L.N.; Handjieva, N.V.; Popov, S.S. "Benzoxazinoids and Iridoid Glucosides from *Lamium* Species". *Phytochemistry*. **2003**, *64*, 1413-1417.

²³ Wahlroos, Ö.; Virtanen, I. "The Precursors of 6-Methoxy-Benzoxazolinone in Maize and Wheat Plants, their Isolation and some of their Properties". *Acta Chem. Scand.* **1959**, *13*, 1906-1908.

²⁴ Corcuera, L.J.; Argadoña, V.H.; Zúñiga, G.E. "Allelochemicals in Wheat and Barley: Role in Plant-Insect Interactions". In *Allelopathy: Basic and Applied aspects*; Rizvi, S.J.H., Rizvi, V., Eds.; Chapman & Hall: London, **1992**; pp 120-127.

²⁵ Woodward, M.D.; Corcuera, L.J.; Helgeson, J.P.; Kelman, A.; Upper, C.D. "Factors that influence the Activity of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one on *Erwinia* Species in Growth Essays". *Plant Physiol.* **1978**, *61*, 803-805.

²⁶ Honkanen, E.; Virtanen, A.I. "Synthesis of some 1,4-benzoxazine Derivatives and their Antimicrobial Activity". *Acta Chem. Scand.* **1960**, *14*, 1214-1217.

²⁷ Bravo, R.; Lazo, W. "Antialgal and Antifungal Activity of Natural Hydroxamic acids and Related Compounds". *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1569-1571.

²⁸ Virtanen, A.I.; Hietala, P.K. "Synthesis of Precursor II of Benzoxazolinone in Rye Plants and the Enzymic Hydrolysis of Precursor I, the Glucoside". *Acta Chem. Scand.* **1960**, *14*, 504.

²⁹ Schulz, M.; Friebe, A.; Kueck, P.; Seipel M.; Schnabl, H. "Allelopathic Effects of Living Quack Grass (*Agropyron repens* L.). Identification of Inhibitory Allelochemicals Exuded from Rhizome Borne Roots". *Angew. Bot.* **1994**, *68*, 195-200.

³⁰ Sahi, S.V.; Chilton, M.; Chilton, W.S. "Corn Metabolites affect Growth and Virulence of *Agrobacterium tumefaciens*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1990**, *87*, 3879-3883.

³¹ Frey, M.; Chopmet, P.; Glawischnig, E.; Stettner, C.; Grün, S.; Winklmaier, A.; Eisenreich, W.; Nacher, A.; Meeley, R.B.; Briggs, S.; Simcox, K.; Gierl, A. "Analysis of a Chemical Plant Defense Mechanism in Grasses". *Science.* **1997**, *277*, 696-699.

³² Friebe, A. "Role of Benzoxazinones in Cereals". *J. Crop Prod.* **2001**, *4*, 379-400.

3.3. Síntesis de Compuestos con Esqueleto de (2H)-1,4-benzoxazin-3-(4H)-ona

La **síntesis química** para la obtención de **ácidos benzohidroxámicos** emplea como material de partida un fenol funcionalizado, el cual se derivatiza con una cadena lateral adecuada. El heterociclo de 1,4-oxacina se genera después de una etapa de ciclación reductiva, cuyas condiciones dependen del tipo de cadena lateral que se añade. A su vez, la cadena lateral a emplear depende del compuesto que se desee sintetizar.

La primera síntesis no estuvo basada en esta metodología general, y se debe a Honkanen y Virtanen³³. Sus principales inconvenientes son su bajo rendimiento (3.4 % global para DIBOA), y la necesidad de manipular MOM-Cl, empleado para proteger el fenol de partida durante la etapa de reducción.

El primer método realmente exitoso para la obtención de benzoxacinonas fue patentado en 1975 (Figura 2)³⁴. Este método está basado en el empleo de 2-nitrofenóxidos como materiales de partida, que tras su tratamiento con ésteres etílicos o metílicos de ácido 2-bromo-2-metoxiacético dan lugar a los correspondientes nitrofenoxiacetatos. Tras la ciclación reductiva, incluyendo la ruptura del quelato de zinc, el lactol enmascarado se desprotege usando tricloruro o tribromuro de boro en diclorometano, lo que da lugar a las correspondientes 2,4-dihidroxibenzoxacinonas.

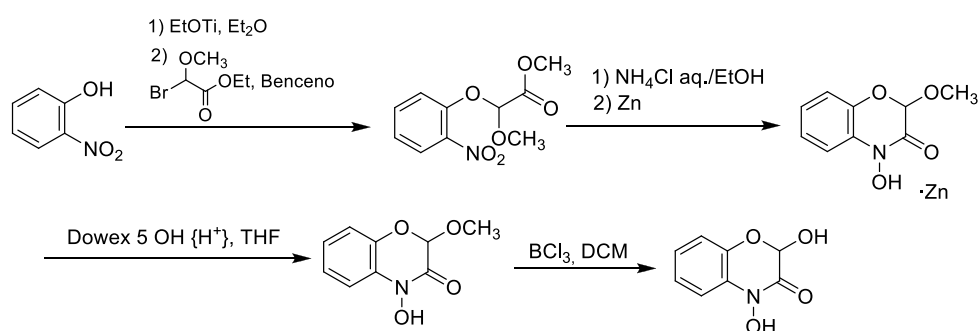


Figura 2.- Síntesis de Benzoxacinonas mediante el uso de 2-nitrofenóxidos como Material de Partida.

³³ Honkanen, E.; Virtanen, A.I. "Synthesis of precursor II of benzoxazolinone formed in rye plants, and the enzymic hydrolysis of precursor I, the glucoside". *Acta Chem. Scand.*, **1960**, *14*, 504-507.

³⁴ Jernow, J.L.; Rosen, P. "2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-ones". United States Patent, **1975**, 3,862,180.

Como alternativa, la patente también sugiere el uso de una ciclación reductiva desarrollada por Coutts en la búsqueda de agentes bactericidas³⁵. Este método tiene como particularidad el empleo de borohidruro de sodio como reductor, y paladio sobre carbón activo como catalizador, dando lugar a la 4-hidroxi-(2*H*)-1,4-benzoxacin-3(4*H*)-ona con un 84 % de rendimiento (Figura 3).

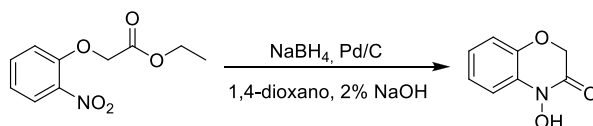


Figura 3.- Ciclación Reductiva para la Síntesis de Benzoxacinonas con empleo de NaBH₄ como reductor, y Pd sobre carbón activo como catalizador.

Este método se ha convertido en general para la obtención de benzoxacinonas³⁵. Los 2-nitrofenoxiacetatos se reducen a sus correspondientes hidroxilaminas, que sustituyen el grupo etoxi por ataque nucleofílico intramolecular generando los correspondientes ácidos benzohidroxámicos. De esta forma, se ha conseguido la preparación de muchos análogos utilizados en diversos estudios de bioactividad^{36,37}.

Como fruto de trabajos previos de nuestro grupo de investigación,³⁸ se consigue la obtención de elevados rendimientos si la etapa de ciclación reductiva se realiza mediante adición-eliminación intramolecular sobre el éster de la cadena lateral en un solo paso (Figura 4).

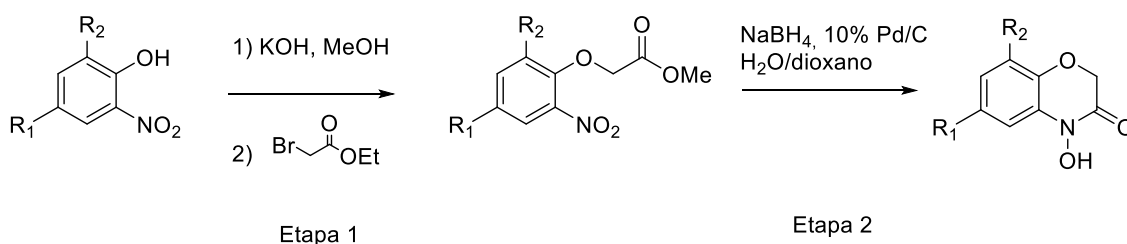


Figura 4.- Etapas de transformación química para la obtención de D-DIBOA, 6-Cl-D-DIBOA y 8-Cl-D-DIBOA a partir de compuestos derivados de 2-nitrofenol.

³⁵ Coutts, R.T.; Noble, D.; Wibberley, D.G. "Some cyclic hydroxamic acids". *J. Pharm. Pharmacol.*, **1964**, *16*, 773-778.

³⁶ Macías, F.A.; Marín, D.; Oliveros-Bastidas, A.; Molinillo, J.M.G. "Optimization of benzoxazinones as natural herbicide models by lipophilicity enhancement". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006c**;54(25):9357-9365.

³⁷ Macías, F.A.; Marín, D.; Oliveros-Bastidas, A.; Chinchilla, D.; Simonet, A.M.; Molinillo, J.M.G. "Isolation and synthesis of allelochemicals from Gramineae: Benzoxazinones and related compounds". *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 991-1000.

³⁸ Macías, F.A.; Marín, D.; Oliveros-Bastidas, A.; Castellano, D.; Simonet, A.M.; Molinillo, J.M.G. "Structure-activity relationships (SAR) studies of benzoxazinoids, their degradation products and analogues. Phytotoxicity on problematic weeds *Avena fatua* L. and *Lolium rigidum* Gaud". *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 1040-1048.

Debido al riesgo de explosión que implica la segunda etapa de reacción, que se trata de una reacción de catálisis heterogénea exotérmica con desprendimiento de hidrógeno, y a la necesidad de obtener estos productos bioactivos en mayor cantidad para poder ser estudiados a nivel de campo, se exploraron nuevas alternativas.

Fruto del proyecto colaborativo con el Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Cádiz “P06-TEP-01399 (Producción Biotecnológica de Ácidos Benzohidroxámicos Bioactivos)”, se consiguió avanzar en la síntesis de D-DIBOA mediante la realización de la segunda etapa de reacción por medio una biotransformación, con la utilización de *E. Coli*.

4. Objetivos

Los ácidos benzohidroxámicos procedentes de plantas, son productos naturales vegetales que presentan elevada actividad fitotóxica. Uno de estos compuestos, el D-DIBOA (4-hidroxi-(2H)-1,4-benzoxacin-3-(4H)-ona), presenta elevada actividad y alta estabilidad, además de muy buena degradabilidad en suelos de cultivo.

La síntesis de D-DIBOA se lleva a cabo en dos etapas. En la primera etapa se lleva a cabo una reacción de sustitución nucleofílica sobre bromoacetato de etilo con 2-nitrofenol.

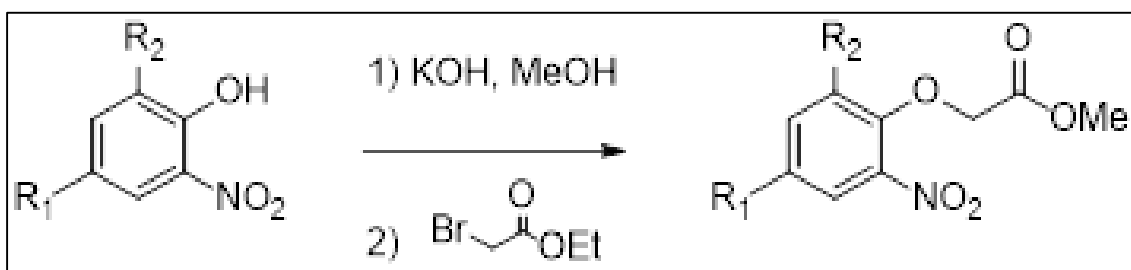


Figura 5.- Síntesis Química del 2-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo a partir de 2-nitrofenol

Tanto para la síntesis de D-DIBOA a escala de laboratorio, como para su obtención mediante biotransformación en el proyecto colaborativo con el Departamento de Ingeniería Química y Tecnología de los Alimentos, se requiere del precursor 2-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo.

El objetivo del presente trabajo de investigación es la Optimización de la Síntesis Química del precursor "2-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo" a partir del reactivo 2-nitrofenol.

Se pretenden optimizar los siguientes parámetros: **concentración** de reactivos: 2-nitrofenol, bromoacetato de etilo e hidróxido potásico, el **tiempo** de reacción, y **temperatura**; todo ello dirigido a mejorar el rendimiento global de esta reacción.

Para este proceso se emplea como técnica estadística el diseño de experimentos.

5. Experimental

5.1. Reactivos e Instrumentación

- 2-nitrofenol: Fluka Chemie GmbH, M.M.: 139.11g/mol, Riqueza: $\geq 98\%$ (HPLC), Punto de Fusión: 45°C.
- Bromoacetato de Etilo: Fluka Chemie GmbH, M.M.: 167.01g/mol, Riqueza: $\geq 97\%$ (GC), Punto de Ebullición: 159°C.
- Benzofenona: Merck, M.M.: 182.22g/mol, Riqueza: $\geq 99\%$ (GC), Punto de Fusión: 48°C.
- Hidróxido de Potasio: Panreac, M.M.: 56,11g/mol, Riqueza: 85%, Punto de Fusión: 361°C.
- Metanol HiPerSolv CHROMANORM M.M.: 32.04g/mol, $\rho = 0,79$ kg/L, filtrado a 0,2 μ m (calidad HPLC). Riqueza: 100%, Punto de Ebullición: 64,7°C, Acidez: 0,0002 meq/g, Alcalinidad: 0,0001 meq/g, Residuo por evaporación: < 1ppm, Agua: 0,01%, Transmitancia a 240 nm: 94%.
- Agua destilada tipo II de grado analítico proporcionada por un sistema de purificación de agua Wasserlab Ecomatic.
- Ácido Acético Glacial: Panreac, M.M.: 60,05g/mol, Riqueza: 99,5-100%, Punto de Fusión: 117°C, $\rho = 1,052$ kg/L.
- Micropipetas; Marca: VWR: volúmenes: 1-5 mL, 100-1000 μ L, 20-200 μ L, Marca: eppendorf: volumen: 1-10 mL.
- Balanza: Marca: OHAUS, Modelo: Adventurer Pro AV264C, $d = \pm 0.0001$ g, 10°C-30°C, Máx: 260g.
- Placas Calefactoras: Selecta, Agimatic-N, IKA[®] RCT classic.
- Termopares: IKA[®] -WERKE ETS-D4 fuzzy.
- Rotavapor: IKA[®] RV 10 basic.
- Baño Rotavapor: IKA[®] HB 10 basic.
- Equipo de Refrigeración Digital Rotavapor: VWR, RC-10.
- Bomba Rotavapor: Fisher Scientific. ILMVAC GmbH.
- Ultrasonido: VWR.

5.2. Técnicas Experimentales

5.2.1. Cromatografía en Capa Fina (CCF)

La cromatografía en capa fina se llevó a cabo sobre placas de gel de sílice (fase estacionaria) Merck Kiesegel 60 F₂₅₄ de 0,25 mm de espesor con indicador fluorescente. Las placas se revelaron por tratamiento con óleum seguido de calentamiento a 150°C durante unos 5 a 10 segundos. Este revelador fue preparado mediante disolución de ácido sulfúrico, agua y ácido acético (en proporciones 1:4:20 respectivamente, v/v). Las marcas dejadas por las muestras en las placas fueron observadas mediante el uso de una lámpara UV a 254 ó 360 nm.

Como fase móvil, el eluyente seleccionado para la separación fue Hexano/Acetato de Etilo (desde ahora Hex/AcOEt) al 20%.

5.2.2. Cromatografía en Columna (CC)

Para la purificación del compuesto sintetizado se prepararon columnas cromatográficas a presión atmosférica. Como fase estacionaria se utilizó gel de sílice Merck de grano 60-200 µm. Como fase móvil, para la recuperación del 2-nitrofenol que queda sin reaccionar, Hex/ AcOEt 5% y, para la elución del producto deseado, los mismos disolventes pero con una proporción del 20%.

5.2.3. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)

El análisis de las alícuotas extraídas de las distintas reacciones se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia en fase inversa. Se llevó a cabo en un equipo Varian ProStar 210 dotado de dos bombas de gradiente en alta presión, un detector diodo-array Varian 335, y un autoinyector Varian 410 que tomaba, invariablemente, 10µL de muestra. Los datos fueron recogidos y procesados mediante el uso de un sistema de control Varian Star versión 5.0.

Las condiciones instrumentales fueron: uso de una columna de fase estacionaria inversa Phenomenex® Gemini C18 (4.6mm x 250 mm) a 25°C.

La fase móvil, a la cual se le impone un flujo volumétrico 1 mL/min, se trata de una mezcla de disolventes, **(A)**: H₂O/1%AcOH y **(B)**: MeOH/1%AcOH.

Para la separación se usó el siguiente gradiente:

Minuto	%B
0	50
3	50
15	100
20	100
22	50
30	50

Tabla 1.- Programa de Variación en la Relación de Disolventes en función del Tiempo.

Se comparan los **tiempos de retención relativos** entre los tres compuestos presentes en la reacción: 2-nitrofenol, 2-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo y benzofenona. Este último se introduce como patrón interno.

Se obtienen cromatogramas para cada reacción realizada y para cada alícuota tomada. Se miden **áreas bajo las curvas** de cada uno de los picos para así poder determinar sus respectivas concentraciones.

Al mismo tiempo, se recogen los **espectros UV/Vis** a dos longitudes de onda diferentes, **254 nm** y **300 nm**. En todos los casos, los tres compuestos absorben más a **254 nm**, así que esa es la longitud de onda en la que se presentan los cromatogramas.

En cuanto a **patrón interno** se refiere, se probó con varios compuestos posibles: 1,4-dimetoxibenceno (1,4-dmb), 2,5-dimetoxitolueno (2,5-dmt), 3-nitroacetofenona y benzofenona.

Las sustancias 1,4-dmb y 2,5-dmt quedaron descartadas porque, aunque no generaban subproductos, presentaban tiempos de retención prácticamente indistinguibles del reactivo 2-nitrofenol. Esto se comprobó porque se observaba una banda ancha producida por el solapamiento de sus respectivos picos.

Por otro lado, aunque la 3-nitroacetofenona presentó un tiempo de retención con una diferencia de casi un minuto respecto del reactivo, en este caso sí que se generaba un compuesto no deseado que conducía a una disminución de la cantidad de producto.

Se eligió la benzofenona pues, esta sustancia como patrón interno resulta inerte en la reacción y tiene un tiempo de retención parecido pero bien diferenciado tanto de reactivo como de producto.

5.2.4. Espectrometría de Masas (EM)

Se han llevado a cabo en un equipo WATERS SYNAPT G2 Mass Spectrometer (70 eV) de los Servicios Centrales de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz.

5.2.5. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los experimentos se realizaron en los Servicios Centrales de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz en equipos AGILENT- 400, AGILENT- 500 y AGILENT- 600 MHz. Se llevaron a cabo a una temperatura de 25°C. Las constantes de acoplamiento se expresan en hertzios (Hz) y los desplazamientos químicos (δ) en ppm. Los disolventes utilizados fueron metanol y cloroformo deuterado (CD_3OD y CDCl_3). Se realiza el calibrado de los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento con referencia a los picos de los disolventes: 3,30 ppm para CD_3OD y 7,25 ppm para CDCl_3 (en los espectros ^1H -RMN) y 49,05 ppm para CD_3OD y 77,00 ppm para CDCl_3 (en los espectros ^{13}C -RMN). El disolvente elegido para solubilizar los compuestos depende de sus respectivas solubilidades. La multiplicidad de las señales se indica con las siguientes abreviaturas: singlete (s), doblete (d), triplete (t), cuartete (c), doblete de doblete (dd), doblete de doblete de doblete (ddd), triplete de doblete (td), multiplete (m), etc.

Los tipos de espectros monodimensionales realizados fueron los siguientes:

- ^1H -RMN
- ^{13}C -RMN

5.3. Método de Obtención

5.3.1. Diseño de Experimentos

El primer paso en el procedimiento para el estudio de la reacción es la elaboración del plan de trabajo. Así, posteriormente se realiza el análisis estadístico de los datos y, por último, se obtiene un modelo matemático que representa el funcionamiento del sistema.

Los factores **cuantitativos** que se varían son: **cantidad de 2-nitrofenol** y de **hidróxido potásico**, **volumen de bromoacetato de etilo**, **temperatura** y **tiempo**. Como factor **cualitativo** se varía la **atmósfera de reacción**. La cantidad de patrón interno que se añade es siempre la misma, ¼ de equivalente.

La **variable respuesta** que se pretende optimizar es el **rendimiento de reacción**.

Se ha elegido un **método univariante**, es decir, se establecen comparaciones entre las respuestas por la variación de uno sólo de los factores mencionados anteriormente.

Reacción	2-nitrofenol (Eq)	Bromoacetato de Etilo (Eq)	Hidróxido Potásico (Eq)	T ^a (°C)	Atmósfera
1	1	0,9	1	75	N ₂
2	1	0,6	1	75	N ₂
3	1	0,3	1	75	N ₂
4	0,75	1,2	1	75	N ₂
5	0,50	1,2	1	75	N ₂
6	0,25	1,2	1	75	N ₂
7	1	1,2	2	75	N ₂
8	1	1,2	1	75	N ₂
9	1	1,2	0,50	75	N ₂
10	1	1,2	0,25	75	N ₂
11	1	1,2	1	55	O ₂
12	1	1,2	1	60	N ₂
13	1	1,2	1	55	N ₂
14	1	1,2	1	45	N ₂
15	1	1,2	1	25	N ₂

Tabla 2.- Diseño de Experimentos. Color azul: variación de Concentración. Color amarillo: variación de Temperatura. Color verde: variación de atmósfera.

5.3.2. Síntesis de 2-(2'-nitrofenoxi)-acetato de metilo

El grupo de Alelopatía de la Universidad de Cádiz, partiendo del método general para la obtención de benzoxacinonas, llevó a cabo una **metodología estándar** para la primera etapa de reacción ³⁹ para lograr como objetivo final la síntesis de D-DIBOA, 6-Cl-D-DIBOA y 8-Cl-D-DIBOA.

Para ello, a una disolución de 500 mg de 2-nitrofenol en 50 mL de metanol bajo atmósfera inerte de N₂ y a temperatura ambiente, se le añade en primer lugar, 1 eq. de hidróxido de potasio para producir la desprotonación del grupo hidroxilo del reactivo.

Una vez está todo el hidróxido de potasio disuelto, se añade 1,2 eq. de bromoacetato de etilo y se eleva la temperatura hasta los 75°C, se mantiene a esta T^a y con agitación magnética durante 24h. Para impedir el sobrecalentamiento de la misma, se usa un sistema de refrigeración por agua.

Se toma como principio de la reacción, el momento en que el metanol empieza a ebullición y a condensar. En este mismo instante se toma la primera alícuota de 100 µL con una microjeringa Hamilton SYR de 100 µL. Se extraen sendos volúmenes de reacción a los 15 min., 30 min., 45 min., 60 min., 90min, 2h, y desde este punto, de hora en hora hasta las 8h. La última se tomará a las 24h de reacción. En algunas reacciones, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos más allá de 24h para analizar el efecto del tiempo.

Cada alícuota se añade a un vial HPLC donde existe un volumen de disolvente de la siguiente composición: MeOH/H₂O-1%AcOH (70:30) y, a continuación, se homogeneiza el contenido.

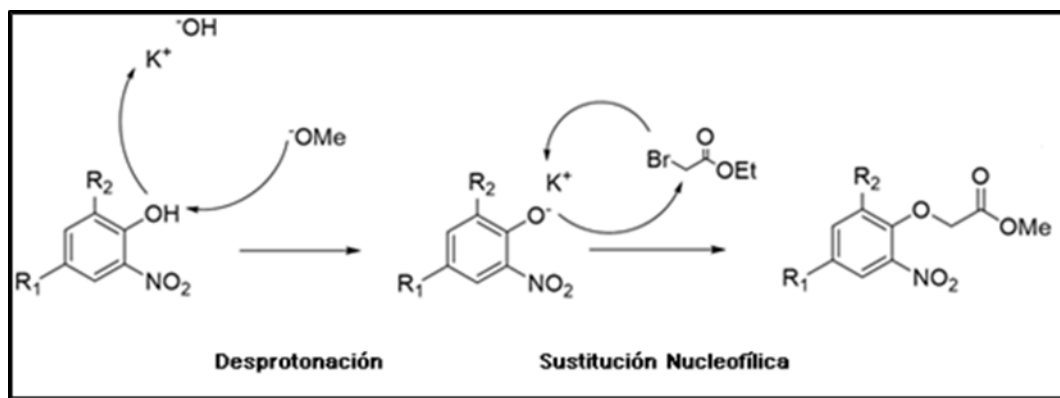


Figura 6.- Mecanismo de Reacción de Sustitución Nucleofílica generándose el correspondiente 2-ariloxi-éster.

³⁹ Macías, F.A.; De Siqueira, J.M.; Chinchilla, N.; Martín, D.; Varela, R.M.; Molinillo, J.M.G. "New herbicide models from benzoxazinones: Aromatic ring functionalization effects". *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54 (26), 9843-9851

A continuación se detallan las cantidades y volúmenes exactos añadidos a cada reacción, su temperatura y su atmósfera.

Reacción	2-nitrofenol (mg)	Bromoacetato de Etilo (mL)	Hidróxido Potásico (mg)	T ^a (°C)	Atmósfera
1	498,6	0,36	287,2	75	N ₂
2	500,8	0,24	279,2	75	N ₂
3	500,7	0,12	292,0	75	N ₂
4	373,6	0,48	303,4	75	N ₂
5	249,2	0,48	296,2	75	N ₂
6	126,3	0,48	290,0	75	N ₂
7	502,4	0,48	431,2	75	N ₂
8	496,5	0,48	240,9	75	N ₂
9	498,3	0,48	96,9	75	N ₂
10	499,5	0,48	282,1	75	N ₂
11	495,8	0,48	310,9	55	O ₂
12	500,7	0,48	294,5	75	N ₂
13	500,7	0,48	304,5	55	N ₂
14	499,7	0,48	276,4	45	N ₂
15	501,4	0,48	278,5	25	N ₂

Tabla 3.- Cantidades y volúmenes añadidos, temperaturas y atmósferas de los Experimentos

5.3.3. Elaboración de las Rectas de Calibrado

Para poder cuantificar los compuestos que se encuentran presentes en la reacción, es necesario, en primer lugar, la elaboración de las rectas de calibrado correspondientes a las tres sustancias, 2-nitrofenol, 2-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo y benzofenona. Para ello se prepararon los siguientes patrones (denominados P, tabla 4) dentro del rango de concentraciones que van a ser detectadas mediante HPLC. El primero se trata de la disolución madre y, los siguientes, se obtienen por sucesivas diluciones

Sustancia	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7
2-nitrofenol	0,99200	0,74400	0,49600	0,24800	0,09920	0,04960	0,00992
2-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo	1,01000	0,75750	0,50500	0,25250	0,10100	0,05050	0,01010
Benzofenona	0,93800	0,70350	0,46900	0,23450	0,09380	0,04690	0,00938

Tabla 4.- Patrones para las Rectas de Calibrado de Reactivo, Producto y Patrón Interno. El disolvente se trata de una mezcla MeOH/H₂O-1%AcOH (70:30). Las **unidades** de concentración son **mg/mL**

Se analizan mediante HPLC y por triplicado los patrones para la obtención de sus correspondientes áreas promedio. Representando en una gráfica Área Promedio bajo la Curva en unidades de área (UA), frente a Concentración en mg/mL, se obtienen las correspondientes Rectas de Calibrado (éstas se encuentran en el apartado anexos).

6. Resultados y Discusión

6.1. Caracterización de los Compuestos que intervienen en la Reacción

En la **cromatografía en capa fina en fase inversa** (figura 7), se puso un punto del reactivo por un lado y, otro punto tras haberse completado las 24h de reacción (R, la estándar sin realizar variaciones en ninguno de los factores y sin la presencia de patrón interno). A partir del análisis de las placas de cromatografía, se establece que se ha generado un producto más polar que el reactivo de partida y que, además aún existe este en el medio, es decir, la reacción no ha transcurrido al 100%.

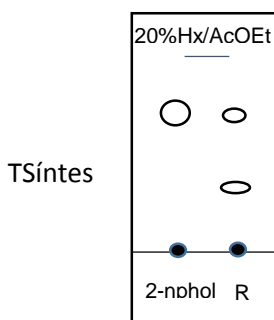


Figura 7.- Placa cromatográfica modelo tras 24h de reacción.

Tras la **cromatografía en columna** al 5% el compuesto que se ha recogido de todas las fracciones es de **color amarillo**, mientras que el que se ha obtenido con la elución al 20%, proporciona un **compuesto diferente** en forma de **finas hebras de color blanco**.

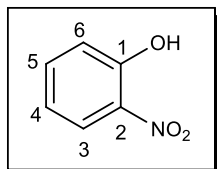
La **cromatografía líquida de alta eficacia** no sólo nos proporciona todos los análisis cuantitativos que se analizarán posteriormente, sino también los tiempos de retención relativos de reactivo y producto, que se hallan dividiendo el correspondiente entre el del patrón interno; $t_r(2\text{-nitrofenol}) = 0.907$ y $t_r(2\text{-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo}) = 0.950$

De los anexos de espectroscopía UV/Vis se extrae que son compuestos diferentes pues absorben a diferentes longitudes de onda y tienen diferente número de máximos y diferentes porcentajes de absorción. El más polar y, por tanto, primero en salir es el producto, 2-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo. A continuación el reactivo y, por último, la benzofenona.

De los experimentos de **Espectrometría de Masas** y **Resonancia Magnética Nuclear** se obtuvieron los siguientes datos (los espectros se encuentran en el apartado de anexos):

2-nitrofenolFórmula Molecular: C₆H₅O₃N

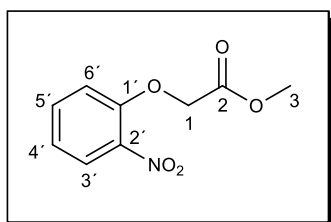
M.M.= 139,11 g/mol



Posición	¹ H δ (ppm)	Mult. J (Hz)	¹³ C δ (ppm)
1	--	--	155,1
2	--	--	131,6
3	8,11	dd (1,6; 8,5)	125,0
4	6,99	td (1,3; 7,2)	120,2
5	7,58	td (1,7; 8,5)	137,5
6	7,16	dd (1,3; 8,0)	119,9
OH	10,58	s	--

Tabla 5.- ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) y ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃)**2-nitrofenoxiacetato de metilo**Fórmula Molecular: C₉H₉O₅N

M.M.= 211,2 g/mol



Posición	¹ H δ (ppm)	Mult. J (Hz)	¹³ C δ (ppm)
1	4,78	s	66,4
2	--	--	168,2
3	3,80	s	52,5
1'	--	--	151,2
2'	--	--	140,6
3'	7,86	dd (1,7; 8,1)	125,8
4'	7,10	td (1,1; 7,5)	121,8
5'	7,52	td (1,7; 7,5)	134,0
6'	6,99	dd (1,1; 8,4)	115,1

Tabla 6.- ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃) y ¹³C-RMN (100 MHz, CDCl₃)**6.2. Tratamiento Estadístico de los Datos****6.2.1. Concentraciones a partir de las Rectas de Calibrado**

Las medidas por análisis mediante cromatografía de alta eficacia de los patrones de las tres sustancias proporcionaron los siguientes promedios de áreas en (UA).

Sustancia	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7
2-nitrofenol	117093536	87633099	59831740	29908371	11859445	5447932	1064623
2-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo	82054091	60894331	41263969	20405757	7944903	3557563	614145
Benzofenona	314554608	264467957	190338560	104370256	41665509	19713565	3843688

Tabla 7.- Área bajo las Curvas Promedio de los diferentes Patrones en Unidades de Área (UA)

Las gráficas de las correspondientes rectas de calibrado de 2-nitrofenol, 2-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo y benzofenona se encuentran en el apartado anexos. En los tres casos los datos se ajustan a ecuaciones lineales con $R^2 = 0,9998$, $R^2 = 0,9999$ y $R^2 = 0,9876$, respectivamente.

Una vez conocidas las concentraciones (en mg/mL) de producto y de patrón interno presentes en el vial HPLC mediante las correspondientes ecuaciones, se procede al cálculo de la concentración del producto en el matraz. Esto se realiza de la siguiente manera, siendo: Concentración Producto en el Matraz (P_M), Concentración Producto en el Vial HPLC (P_V), Concentración Patrón Interno Benzofenona en el Matraz (B_M) y Concentración Patrón Interno Benzofenona en el vial HPLC (B_V).

Como se cumple la relación:

$$\frac{P_M}{P_V} = \frac{B_M}{B_V}$$

Entonces:

$$P_M = \frac{B_M}{B_V} \cdot P_V$$

6.2.2. Rendimientos de Reacción

Conocidos el volumen de disolvente en el matraz (50 mL de MeOH) y la concentración del producto en el mismo, es fácil calcular la **cantidad realmente obtenida** de éste:

$$P_M \text{ (mg/mL)} \cdot 50 \text{ mL} = \text{Cantidad en mg de Producto en el Matraz de Reacción}$$

Sabiendo que, la masa molar de 2-nitrofenol es 139.11mg/mmol y la del 2-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo 211mg/mmol, el **rendimiento teórico** se halla de la siguiente forma:

$$\text{mg pesados de Reactivo} \cdot \frac{\text{mmol}}{139,11 \text{ mg}} \cdot \frac{211 \text{ mg}}{\text{mmol}} = \text{mg teóricos Producto}$$

El rendimiento de la reacción se trata de la relación porcentual que hay entre la cantidad realmente producida y la que se debería de haber producido si éste hubiese sido del 100%:

$$\eta = \frac{\text{mg reales de producto}}{\text{mg teóricos de producto}} \cdot 100$$

6.2.3. Ecuación de Velocidad

A partir de las mediciones de concentración de producto en función del tiempo, es posible determinar el orden de la reacción γ , una vez conocido éste, el valor de la constante de velocidad.

El método que se ha utilizado es el Método de Velocidades Iniciales. Este método se basa en la realización de varios experimentos en los que se mide la velocidad inicial de la reacción para diferentes concentraciones iniciales de todos los reactivos. Si v_0 es la velocidad inicial, entonces, la **ecuación de velocidad para esta reacción** es:

$$v_0 = k \cdot [\text{BrAcOEt}]^\alpha \cdot [2\text{-nitrofenol}]^\beta \cdot [\text{KOH}]^\gamma$$

Siendo v_0 : velocidad inicial de reacción ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), k : constante de velocidad de reacción ($\text{L}^2/\text{mol}^2\cdot\text{min}$), α , β y γ : órdenes parciales de reacción con respecto a cada uno de los reactivos Bromoacetato de etilo, 2-nitrofenol, e hidróxido de potasio, respectivamente. Y los términos entre corchetes las **concentraciones** de los respectivos reactivos.

El orden total de reacción δ , se calcula mediante la suma de los órdenes parciales con respecto a cada uno de los reactivos de la siguiente manera:

$$\delta = \alpha + \beta + \gamma$$

Para calcular las **velocidades iniciales de reacción** se representa la concentración del producto en mol/L (sólo se debe dividir la concentración en mg/ mL por la masa molar del producto que es 211 g/ mol) frente al tiempo de reacción en minutos. Se obtiene el siguiente modelo de gráfica:

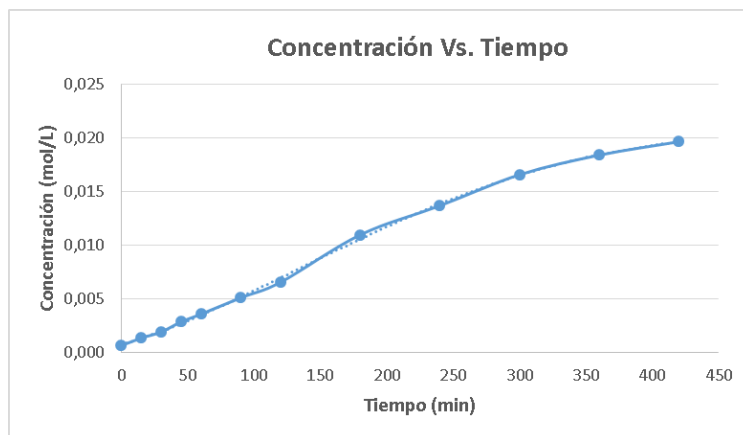


Figura 8.- Concentración Vs. Tiempo.

$$y = o \cdot x^4 - p \cdot x^3 + q \cdot x^2 + r \cdot x + s$$

$$R^2 = t$$

En todos los casos, los datos se ajustaron a ecuaciones polinómicas de cuarto orden con un R² que varía entre 0,9957 a 0,9999.

A continuación, para calcular la pendiente de la curva en el origen, se realiza la derivada de la función **y**, y se iguala **x** a 0. Así, se halla la **velocidad inicial**, el término que en la derivada multiplica a **x**.

Se realiza una discusión de las velocidades iniciales en las comparaciones entre las distintas reacciones.

Conocidas las velocidades iniciales de reacción, se eligen 2 reacciones en las que se hayan puesto las mismas concentraciones de dos de los reactivos y sólo se haya variado la de uno de ellos, por ejemplo:

Reacción	Concentración de 2-nitrofenol (mol/L)	Concentración de Bromoacetato de Etilo (mol/L)	Concentración de KOH (mol/L)
1	a	b	a
2	a	c	a

Tabla 7.- Concentraciones Modelo de los Distintos Reactivos.

Según este método:

$$\frac{V_{10}}{V_{20}} = \frac{k \cdot [a]^{\alpha} \cdot [b]^{\beta} \cdot [a]^{\gamma}}{k \cdot [a]^{\alpha} \cdot [c]^{\beta} \cdot [a]^{\gamma}}$$

Y así:

$$\log \left\langle \frac{V_{10}}{V_{20}} \right\rangle = \log \left\langle \frac{b}{c} \right\rangle^{\beta} = \beta \cdot \log \left\langle \frac{b}{c} \right\rangle$$

Y despejamos el orden parcial de reacción β :

$$\beta = \frac{\log \left\langle \frac{V_{10}}{V_{20}} \right\rangle}{\log \left\langle \frac{b}{c} \right\rangle}$$

Los órdenes parciales de reacción para Bromoacetato de etilo (α), para 2-nitrofenol (β) y para hidróxido potásico (γ) son:

α	β	γ	δ
1,3	1,1	1,5	4

Tabla 8.- Órdenes Parciales de Reacción.

Y el **orden total de reacción** es: $1,1 + 1,3 + 1,5 = 4$.

Por tanto, la **ecuación de velocidad** para esta reacción, por tanto, es la siguiente:

$$v_0 = k \cdot [BrAcOEt]^{1,3} \cdot [2 - nitrofenol]^{1,1} \cdot [KOH]^{1,5}$$

6.2.4. Energía de Activación

Una vez conocidos los órdenes parciales de reacción, para el cálculo de la energía de activación, el primer paso es el cálculo de la constante de velocidad para cada temperatura estudiada, a partir de las concentraciones iniciales de los reactivos, de la siguiente forma:

$$k = \frac{v_0}{[BrAcOEt]_0^{1,1} \cdot [2 - nitrofenol]_0^{1,3} \cdot [KOH]_0^{1,5}}$$

Las constantes de velocidad según la temperatura de la reacción fueron las siguientes:

k (L ² /mol ² ·min)	T ^a (°C)	ln (k)	1/T (K ⁻¹)
2,213E-06	75	13,021	0,013
2,601E-06	60	12,860	0,017
4,452E-06	55	12,322	0,018
2,868E-06	45	12,762	0,022

Tabla 9.- Valores de constante de velocidad, temperatura, lnk y 1/T para distintas reacciones.

De la Ecuación de Arrhenius se conoce que la constante de velocidad:

$$k = A \cdot e^{-\frac{E_A}{RT}}$$

Si tomamos logaritmos neperianos en ambos términos:

$$\ln(k) = \ln A - \frac{E_A}{R} \cdot \left(\frac{1}{T}\right)$$

Ahora se representa el logaritmo neperiano de la constante de velocidad frente a $1/T$ (figura 9):

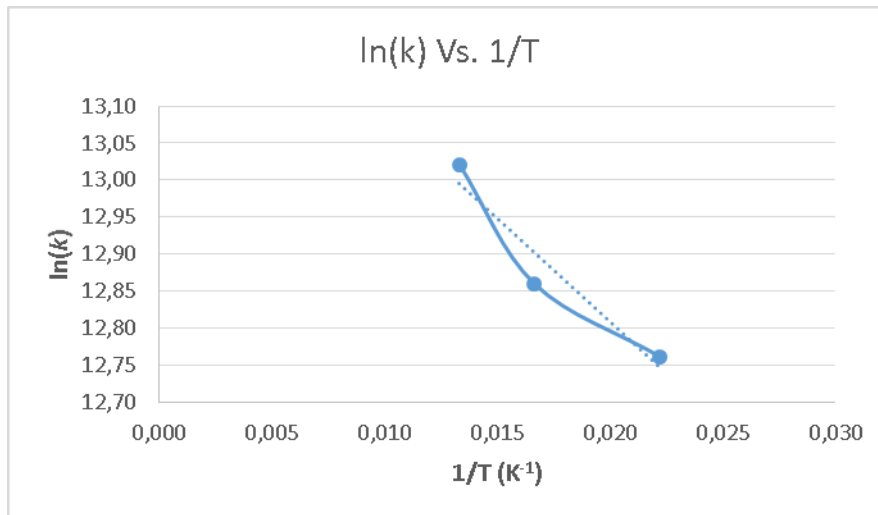


Figura 9.- Gráfico $\ln(k)$ Vs. $1/T$.

$$y = -27,979x + 13,368$$

$$R^2 = 0,9213$$

De donde se obtiene que:

$$-\frac{E_A}{R} = \text{Pendiente de signo negativo}$$

$$-\frac{E_A}{R} = -27,979 \text{ K}$$

Tomando $R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$

$$E_A = 8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1} \cdot 27,979 \text{ K}$$

$$E_A = 232,62 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$$

6.3. Variación del Volumen del Bromoacetato de Etilo

En las reacciones 1,2 y 3 se fue disminuyendo progresivamente el volumen de Bromoacetato de Etilo añadido para observar el efecto que esto provocaba.

Rendimientos de Reacción (%)

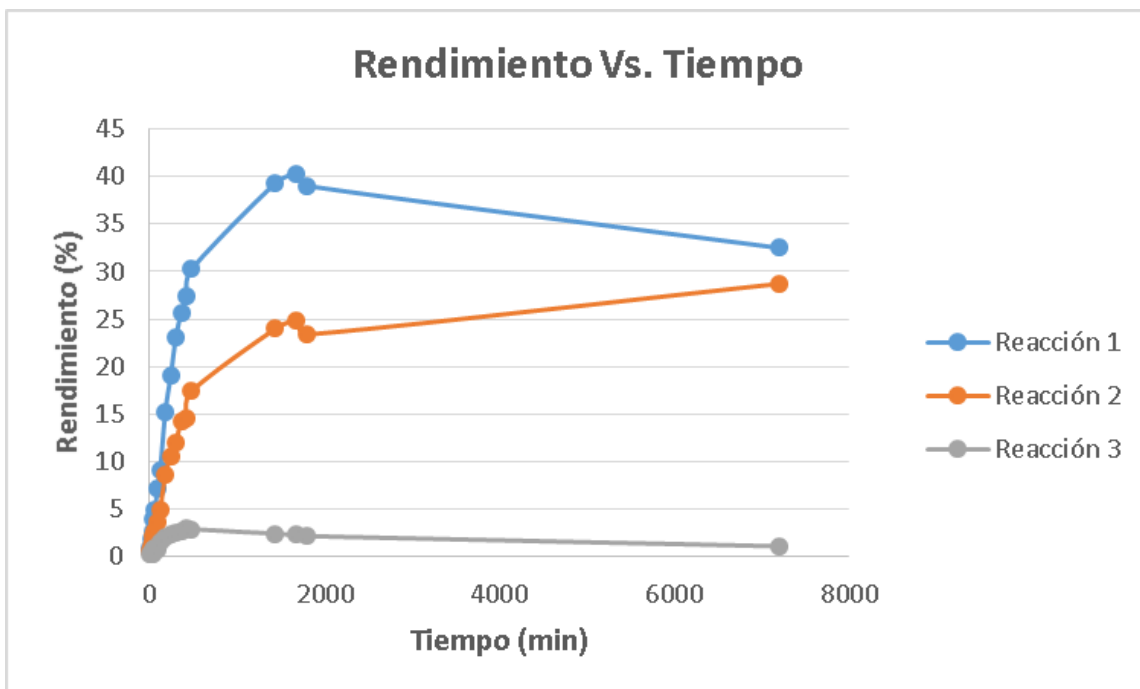
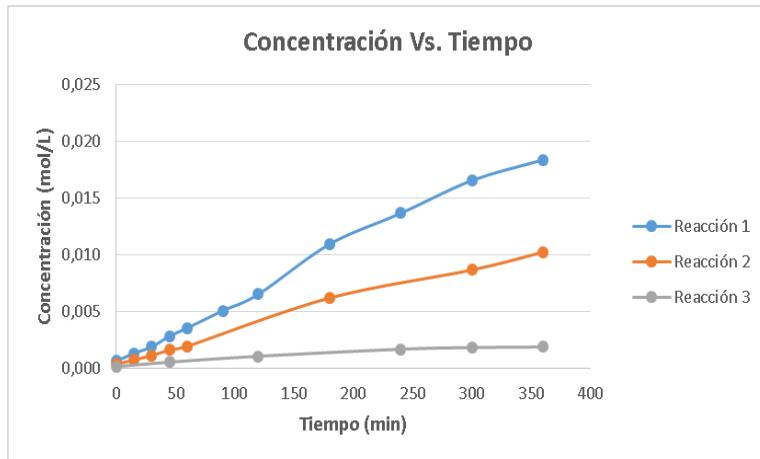


Figura 10.- Rendimientos de Reacción 1, 2 y 3 (%) en función del Tiempo. Disminución progresiva del Volumen de Bromoacetato de Etilo.

Reacción	(0min)	(1h)	(5h)	(8h)	(24h)	(28h)	(30h)	(5 Días)
1	0,90	4,98	23,08	30,23	39,30	40,21	39,00	32,48
2	0,55	2,73	12,06	17,41	23,99	24,82	23,38	28,71
3	0,25	0,96	2,57	2,93	2,44	2,30	2,19	1,12

Tabla 10.- Rendimientos más significativos de las Reacciones 1, 2 y 3 (%) en función del Tiempo.



Reacción	Velocidad (mol / L·min)	R ²
1	3,00E-05	0,9992
2	2,00E-05	0,9998
3	9,00E-06	0,9999

Tabla 11.- Velocidades de las Reacciones 1, 2 y 3.

Figura 11.- Gráfico Comparativo de Concentración Vs. Tiempo Reacciones 1, 2 y 3.

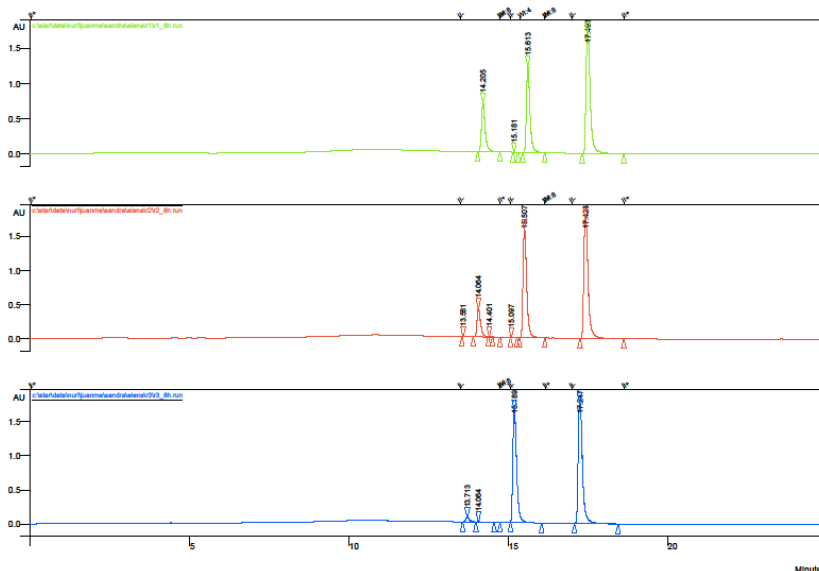


Figura 12.- Comparativa de los Cromatogramas de las Reacciones 1, 2 y 3 a las 8h.

Disminuir en un 20% la concentración de bromoacetato de etilo supone una disminución del rendimiento de reacción de aproximadamente un 10%.

Por otro lado, la velocidad de reacción también disminuye en aproximadamente un 20% a partir de la disminución de la concentración de este reactivo.

Esto se confirma atendiendo a los cromatogramas realizados. La cantidad de producto sintetizado que detecta el diodo-array, se reduce en función de la disminución del volumen de reactivo añadido.

6.4. Variación de la Cantidad de 2-nitrofenol

En las reacciones 4, 5 y 6 se fue disminuyendo progresivamente la cantidad de 2-nitrofenol para observar el efecto que esto provocaba.

Rendimientos de Reacción (%)

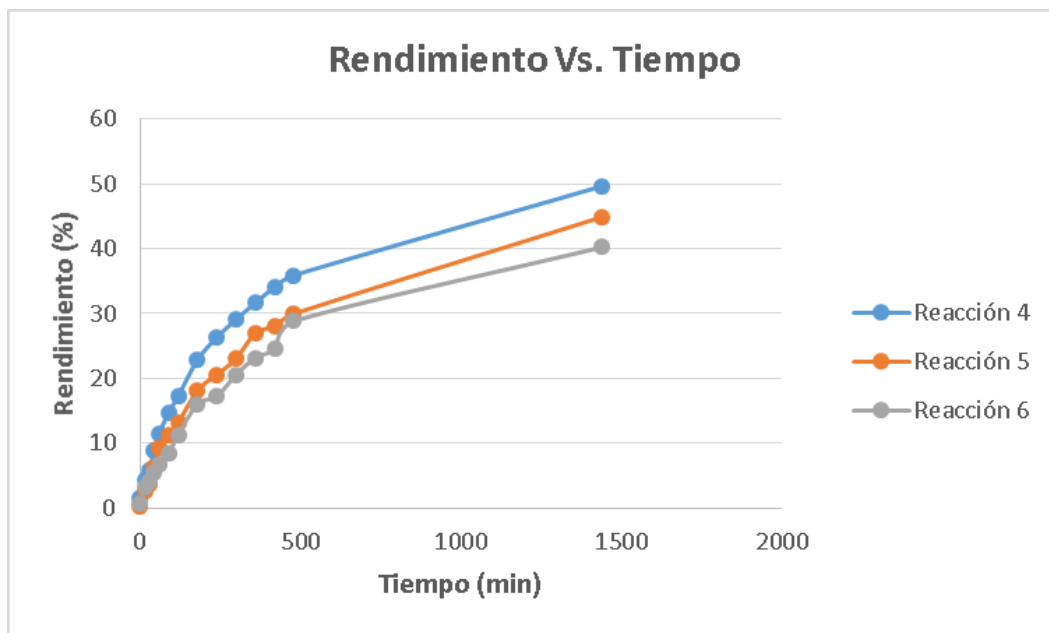
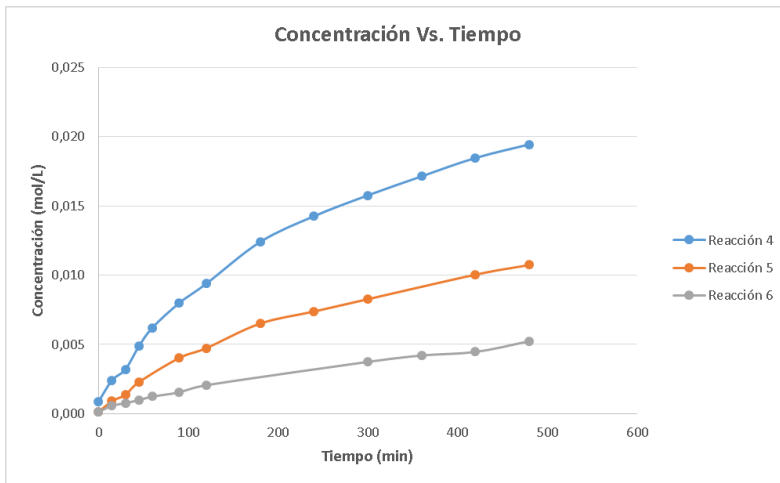


Figura 13.- Rendimientos de Reacción 4, 5 y 6 (%) en función del Tiempo. Disminución progresiva de la cantidad de 2-nitrofenol.

Reacción	(0min)	(1h)	(5h)	(8h)	(24h)
4	1,60	11,46	29,09	35,88	49,60
5	0,34	9,32	23,07	29,95	44,84
6	0,71	6,83	20,61	28,82	40,19

Tabla 12.- Rendimientos de Reacción 4, 5 y 6 (%) en función del Tiempo. Disminución progresiva de la cantidad de 2-nitrofenol.



Reacción	Velocidad (mol / L·min)	R ²
4	1,00E-04	0,9993
5	5,00E-05	0,9991
6	2,00E-05	0,9984

Tabla 13.- Velocidades de las Reacciones 4, 5 y 6.

Figura 14.- Gráfico Comparativo de Concentración Vs. Tiempo Reacciones 4, 5 y 6.

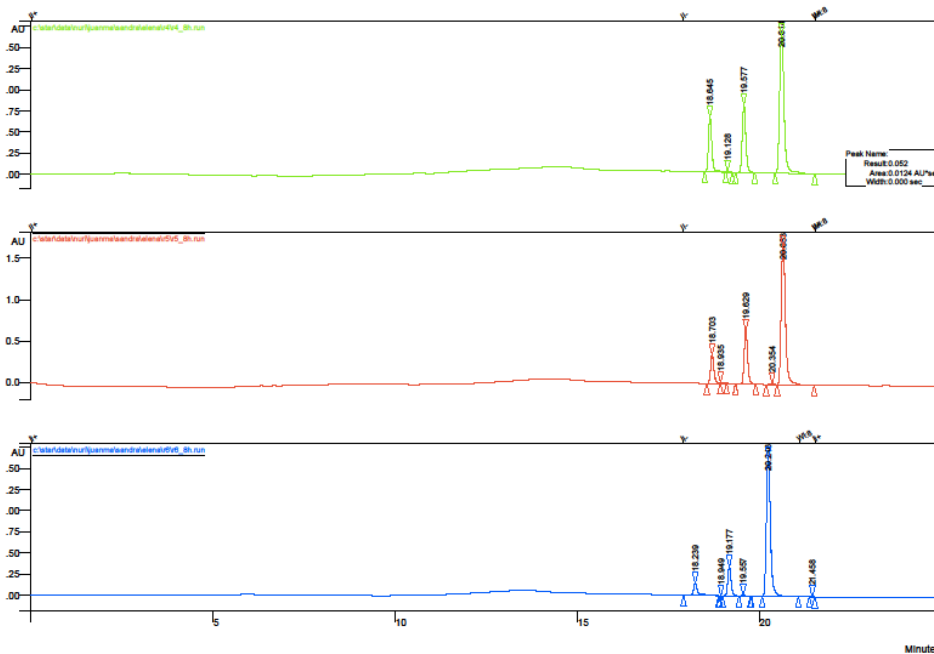


Figura 15.- Comparativa de los Cromatogramas de las Reacciones 4, 5 y 6 a las 8h.

El descenso en la concentración de 2-nitrofenol en un 20% se traduce en una muy suave caída del rendimiento de reacción en torno a un 4%. Los análisis cromatográficos efectuados así lo confirman.

Por otro lado, la velocidad de reacción también disminuye en un orden de magnitud.

Comparando los rendimientos, al disminuir la cantidad de bromoacetato de etilo y de 2-nitrofenol al 50%, la disminución en la síntesis es menos significativa para el caso del 2-nitrofenol, esto es lógico de acuerdo con los órdenes de reacción calculados anteriormente.

6.5. Variación de la Cantidad de Hidróxido de Potasio.

En las reacciones 7, 8 y 9 se fue disminuyendo progresivamente la cantidad de hidróxido de potasio para observar el efecto que esto provocaba.

Rendimientos de Reacción (%)

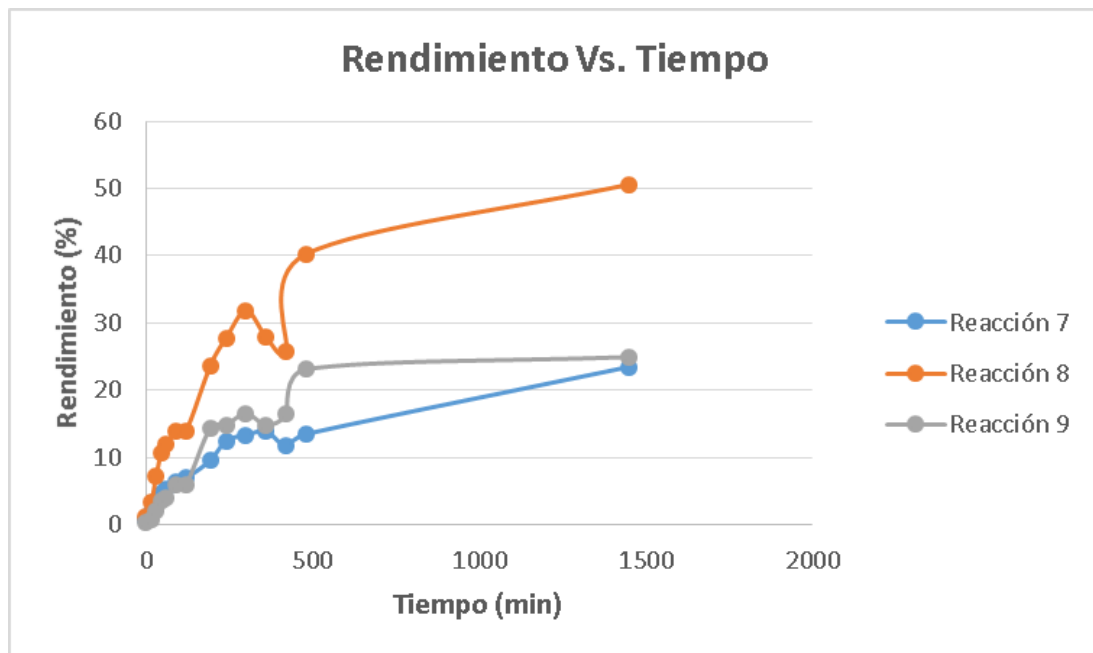


Figura 16.- Rendimientos de Reacción 7, 8 y 9 (%) en función del Tiempo. Disminución progresiva de la cantidad de hidróxido de potasio.

Reacción	(0min)	(1h)	(5h)	(8h)	(24h)
7	0,81	5,26	13,35	13,49	23,48
8	1,20	11,93	31,83	40,23	50,56
9	0,33	3,96	16,57	23,11	24,93

Tabla 14.- Rendimientos de Reacción 7, 8 y 9 (%) en función del Tiempo. Disminución progresiva de la cantidad de hidróxido de potasio.

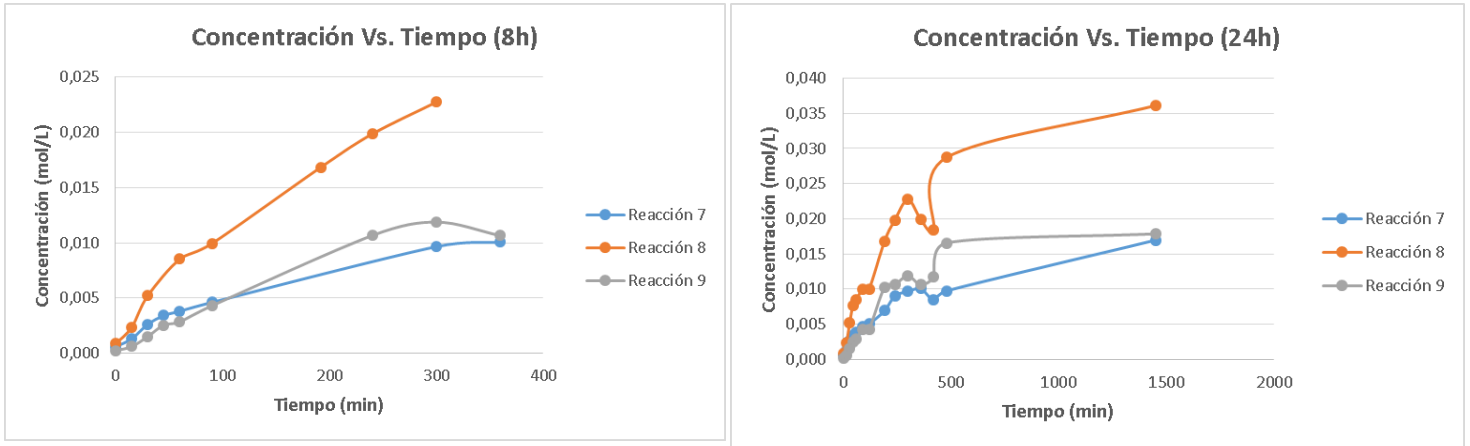


Figura 17.- Gráfico Comparativo de Concentración Vs. Tiempo Reacciones 7, 8 y 9 a las 8h y a las 24h.

Reacción	Velocidad (mol / L·min)	R ²
7	9,00E-05	0,9984
8	2,00E-04	0,9980
9	5,00E-05	0,9990

Tabla 15.- Velocidades de las Reacciones 7, 8 y 9.

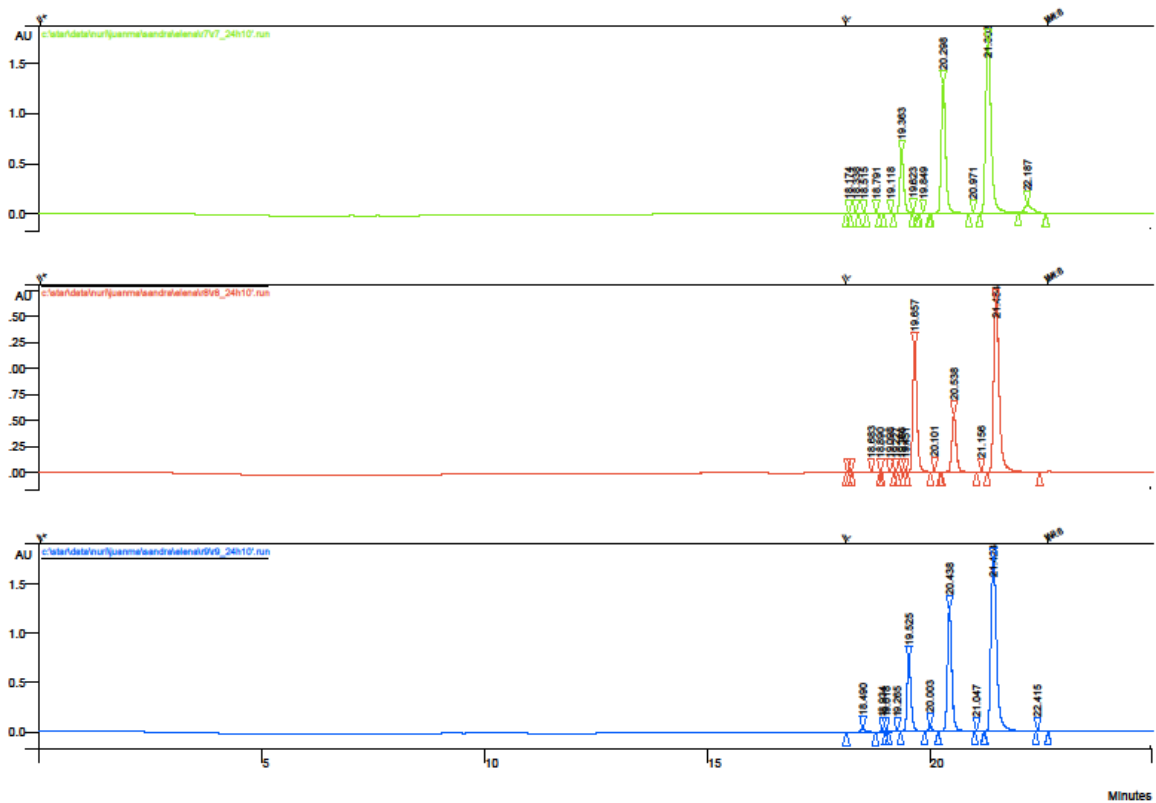


Figura 18.- Comparativa de los Cromatogramas de las Reacciones 7, 8 y 9 a las 24h.

En este caso, la situación difiere de las anteriores, aparece una nueva sustancia. Doblar el número de equivalentes de esta base significa una gran disminución tanto de la velocidad (un orden de magnitud que, además se equipara a reducir a la mitad la concentración de la base) como de la obtención de producto (que se ve mermada porque es éste el que se transforma en el nuevo compuesto). En los cromatogramas se sitúa a la derecha de la benzofenona, por lo que es un compuesto más apolar que esta (cromatograma verde de la Figura 18). No se pudo saber su composición puesto que no se aisló ni se realizó elucidación estructural.

Por otro lado, cuando se reduce a la mitad la concentración del hidróxido, el rendimiento cae en un 50%.

6.6. Variación de la Temperatura.

En las reacciones 12, 13, 14 y 15 se fue disminuyendo progresivamente la temperatura para observar el efecto que esto provocaba.

Rendimientos de Reacción (%)

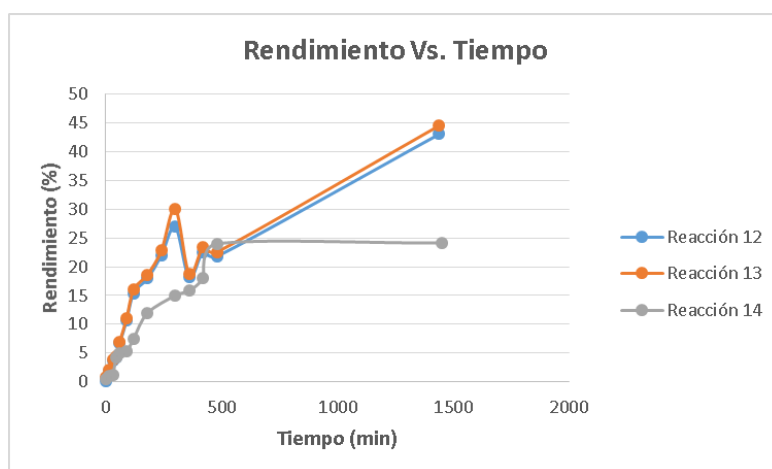


Figura 19.- Rendimientos de Reacción a 75°C (12), 55°C (13) y 45°C (14) (%) en función del Tiempo.

Disminución progresiva de la Temperatura.

Reacción	(0min)	(1h)	(5h)	(8h)	(24h)
12	0,17	6,68	26,92	21,78	42,97
13	0,81	6,91	30,05	22,54	44,46
14	0,46	4,89	14,99	23,96	24,10
15	-	-	-	-	19,02

Tabla 16.- Rendimientos de Reacción 12, 13 y 14 (%) en función del Tiempo. Disminución progresiva de la Temperatura. Para la reacción a 25°C sólo se realizó análisis a las 24h.

Reacción	Velocidad (mol / L·min)	R ²
12	9,00E-05	0,9975
13	5,00E-05	0,9961
14	5,00E-05	0,9957

Tabla 17.- Velocidades de las Reacciones a 75°C (12), 55°C (13) y 45°C (14).

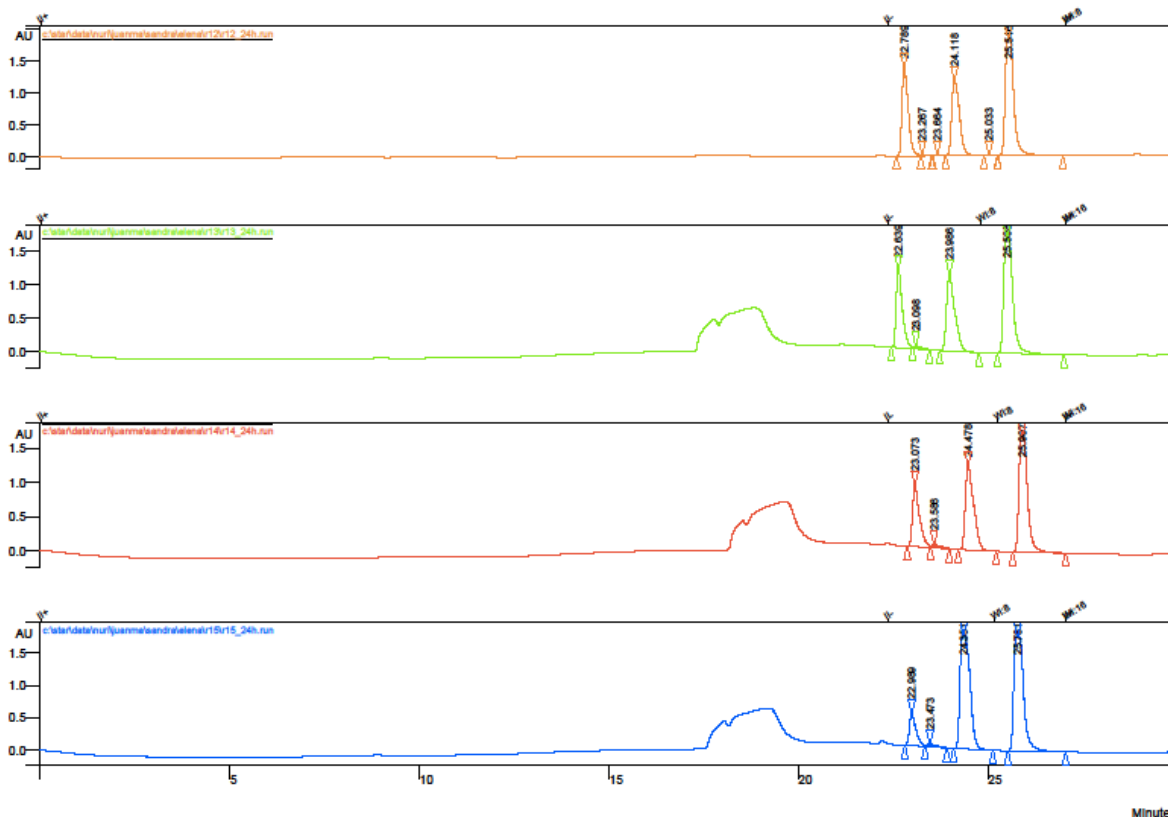


Figura 20.- Comparativa de los Cromatogramas de las Reacciones a 75°C, 55°C, 45°C y 25°C a las 24h.

Este estudio se realizó con la intención de comprobar si era posible realizar la reacción en condiciones menos energéticas (recordar que nos encontramos dentro de un proyecto en el que se pretende escalar la síntesis a nivel industrial y, altas temperaturas suponen elevados costes energéticos).

La temperatura de ebullición del MeOH se sitúa en los 64,7°C. La reacción estándar se realizaba a 75°C con el fin de estar seguros de que el disolvente se encontraba en ebullición.

Los experimentos a 75°C y a 55°C generan rendimientos finales prácticamente iguales. La reacción a 55°C tiene un rendimiento final un 2% mayor que la reacción a 75°C. Así, se establece que es posible realizar estos experimentos a bastante menor temperatura (en torno a 20°C menos).

Sin embargo, cuando se trata de disminuir 30°C con respecto a la reacción estándar, se observa que el rendimiento desciende a la mitad, prácticamente igual que al realizarlo a temperatura ambiente (sólo existe un 5% de variación entre ellos).

6.7. Variación de la Atmósfera de Reacción.

En las reacciones 11 y 13 se varió de una atmósfera inerte de nitrógeno a una atmósfera oxidante de oxígeno para observar el efecto que esto provocaba.

Rendimientos de Reacción (%)

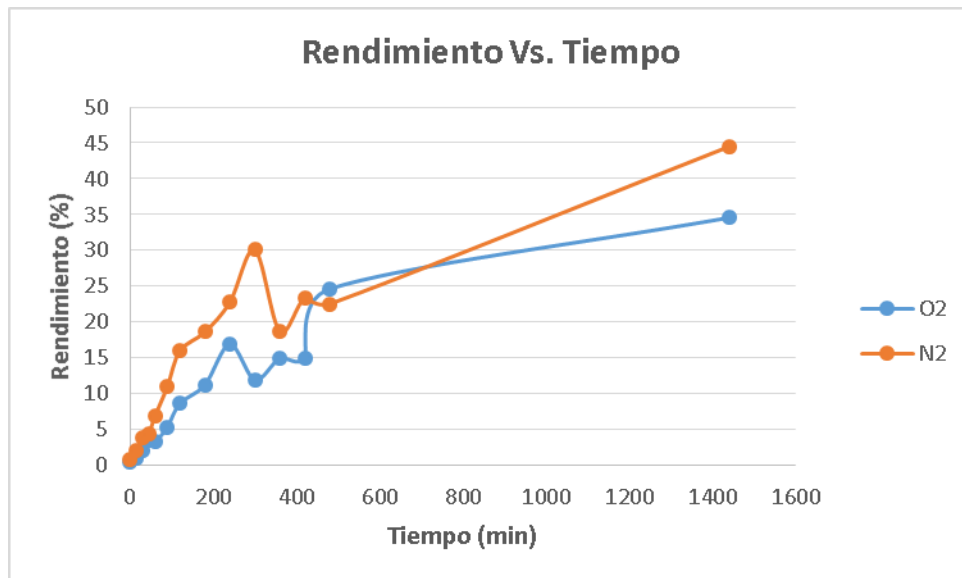


Figura 21.- Rendimientos de Reacción en O₂ (11) y en N₂ (13) (%) en función del Tiempo.

Reacción	(0min)	(1h)	(5h)	(8h)	(24h)
11	0,52	3,34	11,97	24,63	34,55
13	0,81	6,91	30,05	22,54	44,46

Tabla 18.- Rendimientos de Reacción en O₂ (11) y en N₂ (13) (%) en función del Tiempo.

Reacción	Velocidad (mol / L·min)	R ²
11	5,00E-05	0,9964
13	5,00E-05	0,9961

Tabla 19.- Velocidades de las Reacciones en O₂ (11) y en N₂ (13).

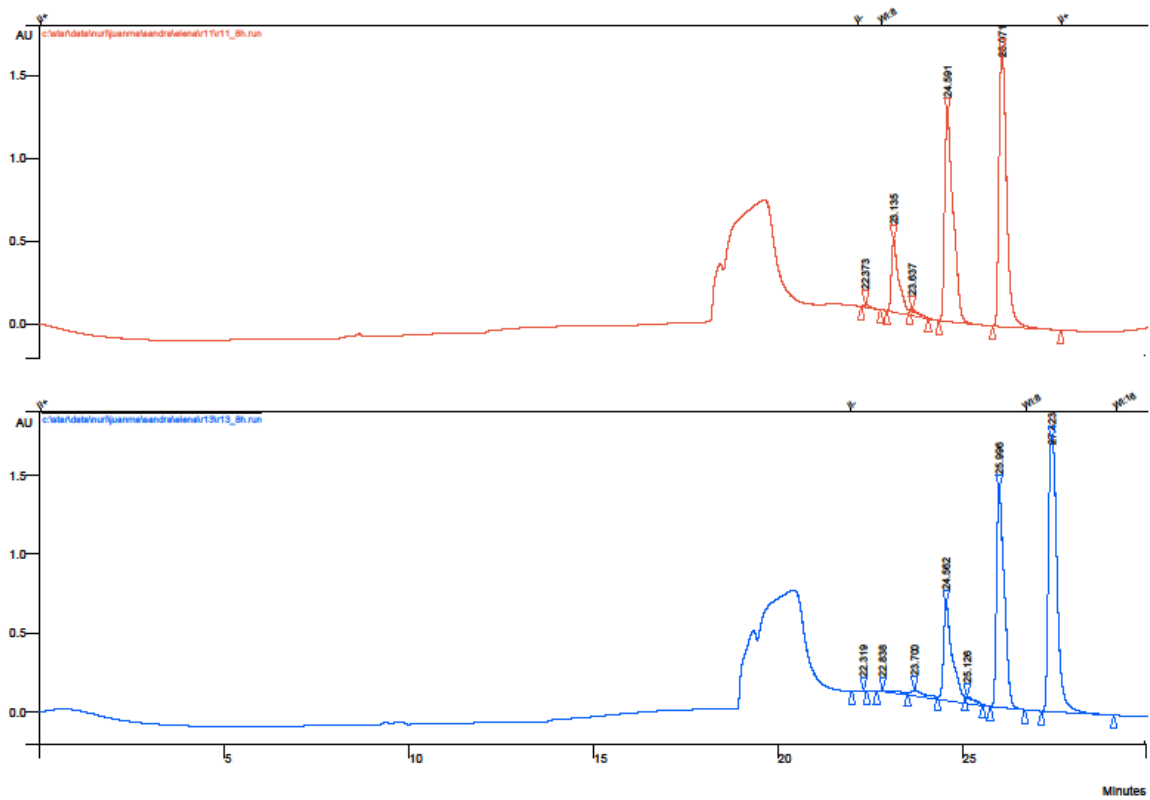


Figura 22.- Comparativa de los Cromatogramas de las Reacciones 11(O₂) y 13(N₂) a las 8h.

Se pensó en hacer este experimento comparativo, una vez más, debido a la importancia del escalamiento de este proceso. Si fuera posible realizarlo sin necesidad de atmósfera inerte, la industria se ahorraría el gasto en este gas.

Aunque existe un pico de rendimiento máximo para la reacción en oxígeno a las 8 horas, se comprueba que, en general, la reacción se da mejor en atmósfera inerte de nitrógeno. Al fin de la reacción el rendimiento es de un 10% mayor en el caso del nitrógeno.

6.8. Variación del Tiempo de Reacción.

Los datos gráficos y numéricos de rendimientos, concentración Vs tiempo y velocidades son los mismos que para el caso en que se varía la concentración de bromoacetato de etilo, es decir, los de las reacciones 1, 2 y 3. Pero se decidió además, dejarlas durante más tiempo y observar el efecto del paso de varios días.

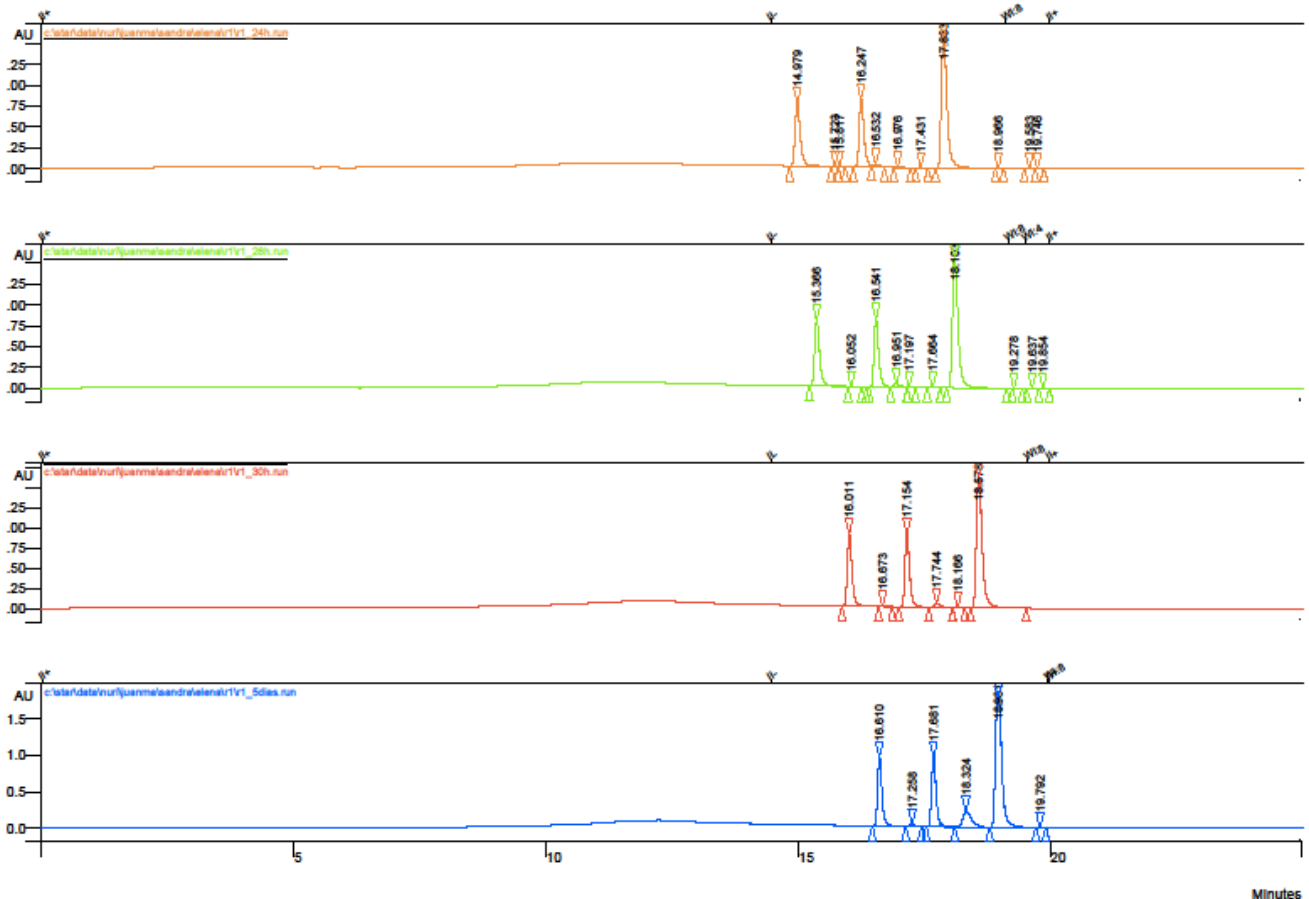


Figura 23.- Comparativa de los Cromatogramas de la Reacción 1a las 24h, 28h, 30h y 5 días.

Se comprueba que hay un pico máximo de rendimiento entre las 24 y las 28 horas, de ahí en adelante, dependiendo de la reacción, se eleva o desciende ligeramente, o se mantiene estable, pero no hay cambios significativos.

7. Conclusiones

- Al elegir la realización del diseño de experimentos mediante un método univariante no se pueden establecer correlaciones entre las distintas variables. Se proponen posteriores estudios analizando la correlación entre factores.
- La variación en las cantidades de los reactivos provocan efectos parecidos aunque, siempre, una disminución en la cantidad de 2-nitrofenol provoca menor disminución en el rendimiento que un descenso en el volumen de bromoacetato.
- De forma general, la reacción progresa mejor en atmósfera inerte de nitrógeno. Al finalizar la reacción el rendimiento es aproximadamente un 10% mayor en el caso de este último gas. La elección o no de esta atmósfera dependerá de la cantidad de producto que se desee generar. Pero es segura su utilización ya que no implica la aparición de ningún producto secundario no deseado.
- Los factores analizados más importantes que deben ser tenidos en cuenta a la hora de la realización de esta reacción son: cantidad de base utilizada y temperatura de reacción. Con los datos de temperatura se concluyen dos cosas. Por un lado, se puede disminuir la temperatura de trabajo a 55°C porque se consigue un rendimiento prácticamente igual al de la reacción estándar a 75°C. Por otro, que bajar demasiado la temperatura, por debajo de 45°C, es improductivo puesto que la obtención del compuesto desciende a más de la mitad.
- Como factor secundario pero importante, se encuentra el tiempo. Se comprueba que hay un pico máximo de rendimiento entre las 24 y las 28 horas, de ahí en adelante, dependiendo de la reacción, cae o sube un poco o se mantiene estable, pero no hay cambios significativos. Se recomienda seguir con la metodología usada en la reacción estándar de 24h. Si se desea se puede alargar algunas horas más, pero no es recomendable apartarla durante varios días pues, no se van a conseguir cambios significativos.
- Como **condiciones óptimas** se recomiendan: trabajar con 1equivalente de 2-nitrofenol por cada 1,2 equivalentes de bromoacetato de etilo y por cada 1 equivalente KOH, T^a=55°C, atmósfera inerte y tiempo de reacción entre 24 y 28 horas.

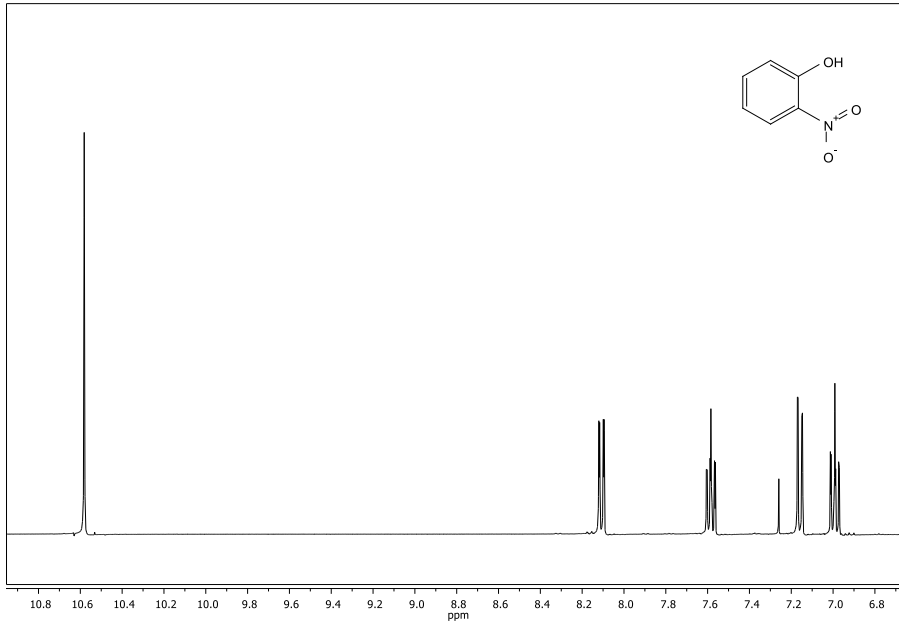
8. Referencias

- ¹ Putnam, A.R. "The Science of Allelopathy". Putnam, A.R. and Tangs, C.S Eds., **1986**.
- ² Baker, H.G. "The Characteristics and Modes of origin Weeds". In: "The genetics of colonizing species", Baker, H.G.; Stebbins, G.L. Eds., Academic Press, **1965**, 147-162.
- ³ Heap, I.M. "The Occurrence of Herbicide Resistance Weeds Worldwide" *Pest. Sci.*, **1997**, *51*, 235-243.
- * <http://plantprotection.org/HRAC/>
- ⁴ Muller C.; Ed. Dr. W; Junk B. "Handbook of Vegetation Science part VI: Vegetation and Environment". *The Hague*. 1974.
- ⁵ Romeo J.T.; Weidenhamer J. "Bioassays for Allelopathy in Terrestrial Plants in: Methods in Chemical Ecology. Bioassay Methods". *Kluwer Academia Publishing*. 1998.
- ⁶ Romeo J.T. "Raising the Beam: Moving beyond Phytotoxicity". *Journal of Chemical Ecology*. 2000; 26 (9):2011-2014.
- ⁷ Macias, F.A.; Fernandez, A.; Varela, R. M.; Molinillo, J. M. G.; Torres, A.; Alves, Pedro L. C. A. "Sesquiterpene Lactones as Allelochemicals". *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 795-800.
- ⁸ Macias, F.A.; Galindo, J. C. G.; Molinillo, J. M. G.; Castellano D. "Natural Products as Allelochemicals. 10. Dehydrozalanin C: a potent plant growth regulator with potential use as a natural herbicide template". *Phytochemistry*. **2000**, *54*, 165-171.
- ⁹ Dayan, F. E.; Watson, S. B.; Galindo, J. C. G.; Hernandez, A.; Dou, J.; McChesney, J.D.; Duke, S.O. "Phytotoxicity of quassinoids: Physiological responses and structural requirements". *Pest. Biochem. Physiol.* **1999**, *65*, 15-24.
- ¹⁰ Alliota, G.; Cafiero, G. En: "Principles and practices in plant ecology". Inderjit, Dakshini K. M. M., Foy, C. L., Eds.; CRC: Boca Raton, FL; **1999**, pp 551-563.
- ¹¹ Macias, F.A.; Molinillo, J. M. G.; Galindo, J. C. G.; Varela, R. M.; Simonet, A. M.; Castellano, D. "The use of allelopathic studies in the search for natural herbicides". *J. Crop. Prod.* **2001**, *4*, 237-255.
- ¹² Duke, S.O.; Romagni, J. G.; Dayan, F. E "Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action". *Crop Protection*. **2000**, *19*, 583-589.
- ¹³ Vyvyan, J.R. "Allelochemicals as lead for new herbicides and agrochemicals". *Tetrahedron*. **2002**, *58*, 1631-1646.
- ¹⁴ Macias, F.A.; Marín, D.; Oliveros-Bastidas A.; Molinillo, J. M. G. "Rediscovering the Bioactivity and Ecological Role of 1,4-Benzoxazinones". *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 478-489.
- ¹⁵ Virtanen, A.I.; Hietala, P.K. "The Structures of the Precursors of Benzoxazolinone in Rye Plants". *II. Suomen Kemistilehti B.* **1959**, *32B*, 252.
- ¹⁶ Hamilton, R.H.; Bandurski, R.S.; Reusch, W.H. "Isolation and Characterization of a Cyclic Hydroxamate from *Zea Mays*". *Cereal Chem.* **1962**, *39*, 107-113.
- ¹⁷ Virtanen, A.I.; Hietala, P.K. "Synthesis of Precursor II of Benzoxazolinone formed in Rye Plants and the Enzymic Hydrolysis of Precursor I, the Glucoside". *Acta Chem. Scand.* **1960**, *14*, 504.
- ¹⁸ Copaja, S.V.; Nicol, D.; Wratten, S.D. "Accumulation of Hydroxamic Acids during Wheat Germination". *Phytochemistry*. **1999**, *50*, 17-24.
- ¹⁹ Wolf, R.B.; Spencer, G.F.; Plattner, R.D. "Benzoxazolinone, 2,4-Dihydroxi-1,4-Benzoxazin-3-one, and its Glucoside from *Acanthus mollis* Seeds inhibit Velvetleaf Germination and Growth". *J. Nat. Prod.* **1985**, *48*, 59-63.
- ²⁰ Özden, S.; Özden, T.; Attila J.; Kücükislamoglu, M.; Okatan, A. "Isolation and Identification by High-Performance Liquid Chromatography and Thin-Layer Chromatography of Benzoxazolinone Precursors from *Consolida orientalis* Flowers". *J. Chromatogr.* **1992**, *609*, 402.
- ²¹ Pratt, K.; Kumar, P.; Chilton, W. S. "Cyclic Hydroxamic Acids in Dicotyledonous Plants". *Biochem. Syst. Ecol.* **1995**, *23*, 781.

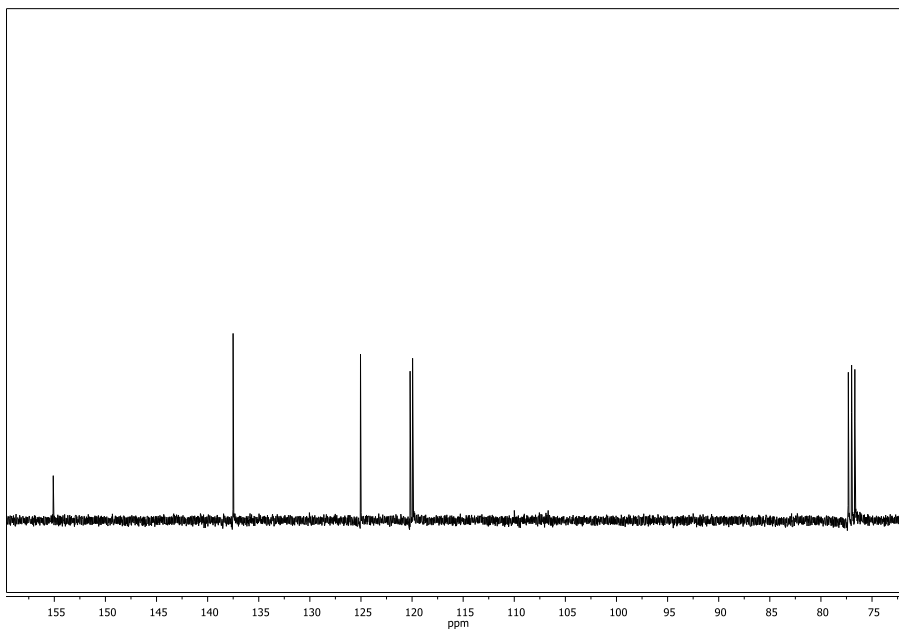
- ²² Alipieva, K.I.; Taskova, R.M.; Evstatieva, L.N.; Handjieva, N.V.; Popov, S.S. "Benzoxazinoids and Iridoid Glucosides from *Lamium* Species". *Phytochemistry*. **2003**, *64*, 1413-1417.
- ²³ Wahlroos, Ö.; Virtanen, I. "The Precursors of 6-Methoxy-Benzoxazolinone in Maize and Wheat Plants, their Isolation and some of their Properties". *Acta Chem. Scand.* **1959**, *13*, 1906-1908.
- ²⁴ Corcuera, L.J.; Argadoña, V.H.; Zúñiga, G.E. "Allelochemicals in Wheat and Barley: Role in Plant-Insect Interactions". In *Allelopathy: Basic and Applied aspects*; Rizvi, S.J.H., Rizvi, V., Eds.; Chapman & Hall: London, **1992**; pp 120-127.
- ²⁵ Woodward, M.D.; Corcuera, L.J.; Helgeson, J.P.; Kelman, A.; Upper, C.D. "Factors that influence the Activity of 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one on *Erwinia* Species in Growth Essays". *Plant Physiol.* **1978**, *61*, 803-805.
- ²⁶ Honkanen, E.; Virtanen, A.I. "Synthesis of some 1,4-benzoxazine Derivatives and their Antimicrobial Activity". *Acta Chem. Scand.* **1960**, *14*, 1214-1217.
- ²⁷ Bravo, R.; Lazo, W. "Antialgal and Antifungal Activity of Natural Hydroxamic acids and Related Compounds". *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 1569-1571.
- ²⁸ Virtanen, A.I.; Hietala, P.K. "Synthesis of Precursor II of Benzoxazolinone in Rye Plants and the Enzymic Hydrolysis of Precursor I, the Glucoside". *Acta Chem. Scand.* **1960**, *14*, 504.
- ²⁹ Schulz, M.; Friebe, A.; Kueck, P.; Seipel M.; Schnabl, H. "Allelopathic Effects of Living Quack Grass (*Agropyron repens* L.). Identification of Inhibitory Allelochemicals Exuded from Rhizome Borne Roots". *Angew. Bot.* **1994**, *68*, 195-200.
- ³⁰ Sahi, S.V.; Chilton, M.; Chilton, W.S. "Corn Metabolites affect Growth and Virulence of *Agrobacterium tumefaciens*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1990**, *87*, 3879-3883.
- ³¹ Frey, M.; Chopmet, P.; Glawischnig, E; Stettner, C.; Grün, S.; Winklmaier, A.; Eisenreich, W.; Nacher, A.; Meeley, R.B.; Briggs, S.; Simcox, K.; Gierl, A. "Analysis of a Chemical Plant Defense Mechanism in Grasses". *Science.* **1997**, *277*, 696-699.
- ³² Friebe, A. "Role of Benzoxazinones in Cereals". *J. Crop Prod.* **2001**, *4*, 379-400.
- ³³ Honkanen, E.; Virtanen, A.I. "Synthesis of precursor II of benzoxazolinone formed in rye plants, and the enzymic hydrolysis of precursor I, the glucoside". *Acta Chem. Scand.*, **1960**, *14*, 504-507.
- ³⁴ Jernow, J.L.; Rosen, P. "2H-1,4-Benzoxazin-3(4H)-ones". United States Patent, **1975**, 3,862,180.
- ³⁵ Coutts, R.T.; Noble, D.; Wibberley, D.G. "Some cyclic hydroxamic acids". *J. Pharm. Pharmacol.*, **1964**, *16*, 773-778.
- ³⁶ Macías, F.A.; Marín, D.; Oliveros-Bastidas, A.; Molinillo, J.M.G. "Optimization of benzoxazinones as natural herbicide models by lipophilicity enhancement". *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* **2006**; *54*(25):9357-9365.
- ³⁷ Macías, F.A.; Marín, D.; Oliveros-Bastidas, A.; Chinchilla, D.; Simonet, A.M.; Molinillo, J.M.G. "Isolation and synthesis of allelochemicals from Gramineae: Benzoxazinones and related compounds". *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 991-1000.
- ³⁸ Macías, F.A.; Marín, D.; Oliveros-Bastidas, A.; Castellano, D.; Simonet, A.M.; Molinillo, J.M.G. "Structure-activity relationships (SAR) studies of benzoxazinoids, their degradation products and analogues. Phytotoxicity on problematic weeds *Avena fatua* L. and *Lolium rigidum* Gaud". *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 1040-1048.
- ³⁹ Macías, F.A.; De Siqueira, J.M.; Chinchilla, N.; Martin, D.; Varela, R.M.; Molinillo, J.M.G. "New herbicide models from benzoxazinones: Aromatic ring functionalization effects". *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54* (26), 9843-9851

Anexos

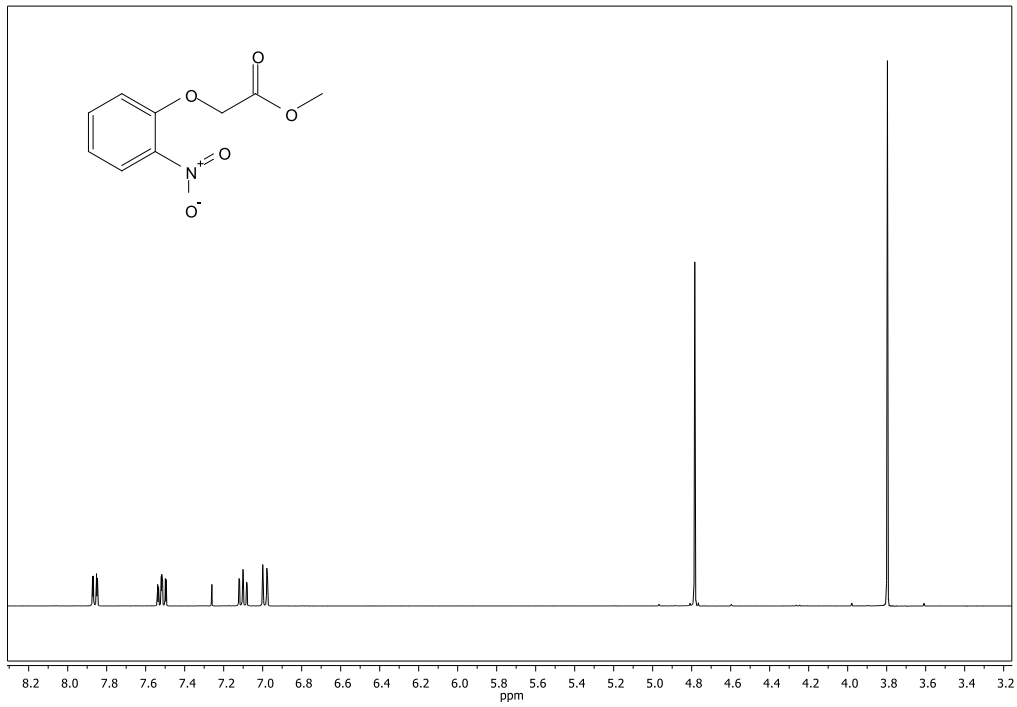
Espectros de Resonancia Magnética Nuclear



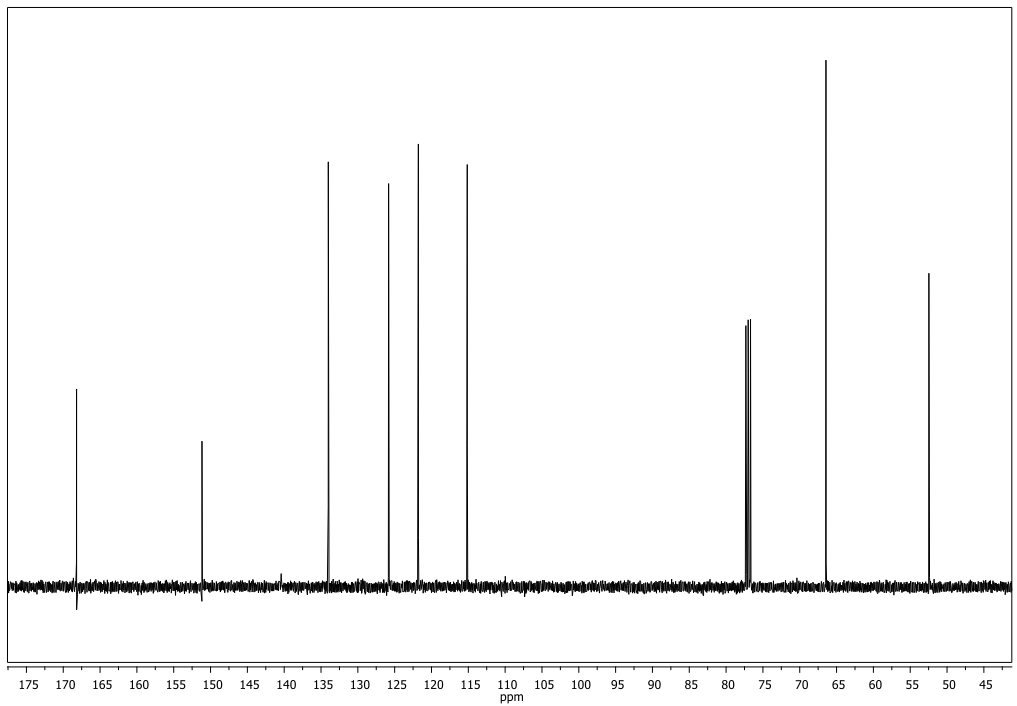
Espectro de ¹H-RMN de 2-nitrofenol (400 MHz, CDCl₃)



Espectro de ¹³C-RMN de 2-nitrofenol (100 MHz, CDCl₃)

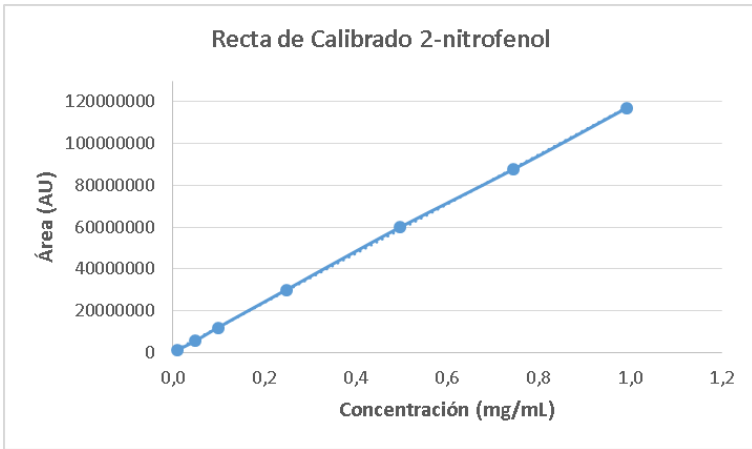


Espectro de ¹H-RMN de 2-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo (400 MHz, CDCl₃)



Espectro de ¹³C-RMN de 2-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo (100 MHz, CDCl₃)

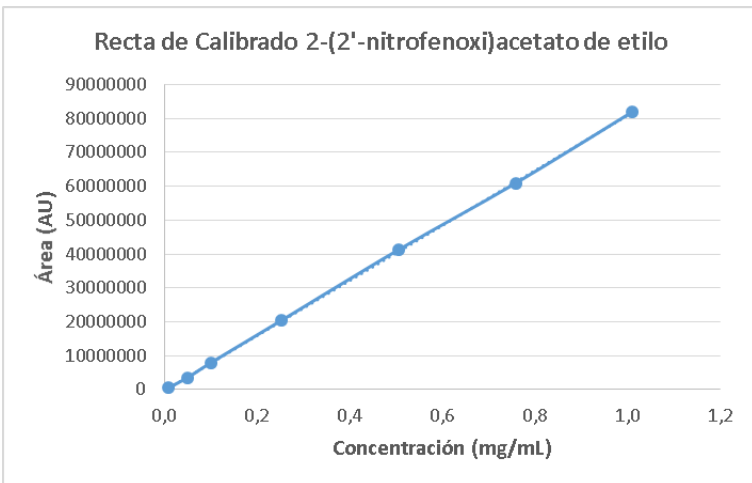
Rectas de Calibrado



Recta de Calibrado 2-nitrofenol

$$y = 1E+08x + 137642$$

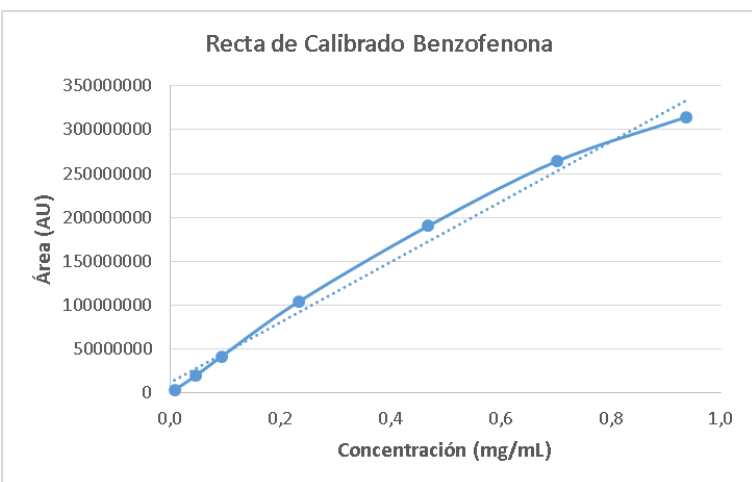
$$R^2 = 0,9998$$



Recta de Calibrado 2-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo

$$y = 8E+07x - 275887$$

$$R^2 = 0,9999$$



Recta de Calibrado Benzofenona

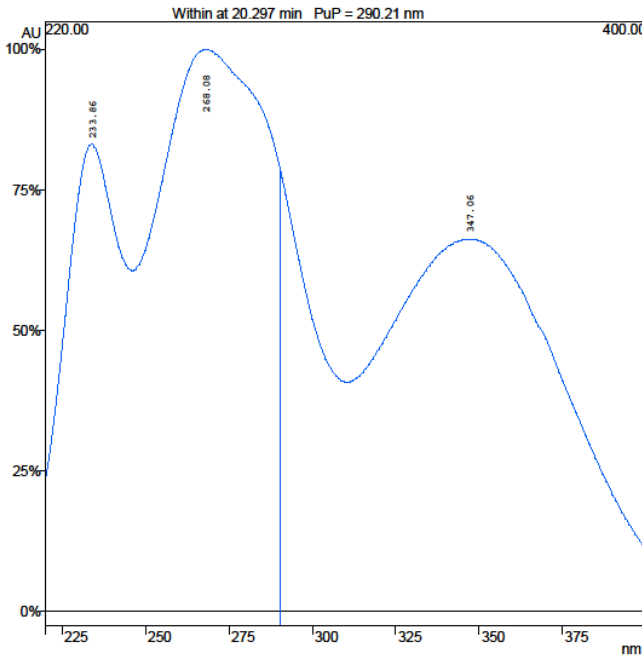
$$y = 3E+08x + 1E+07$$

$$R^2 = 0,9876$$

Espectroscopía UV/Vis

Channel Range: 220.00 to 400.00 nm Absorbance Range: 0.1987 to 1.7967 AU

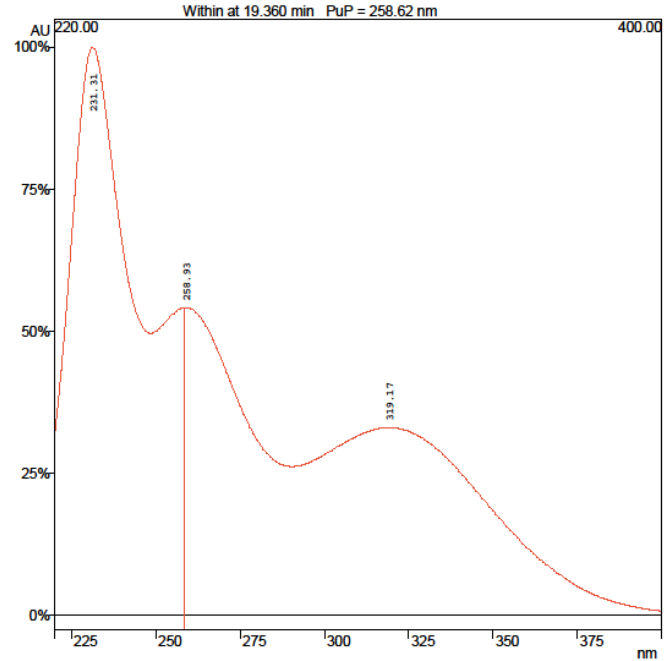
Max Wavelength(nm):	233.86	268.08	347.06
Percent of Max Abs.:	83.1%	100.0%	66.3%



2-nitrofenol

Channel Range: 220.00 to 400.00 nm Absorbance Range: 0.0091 to 1.1843 AU

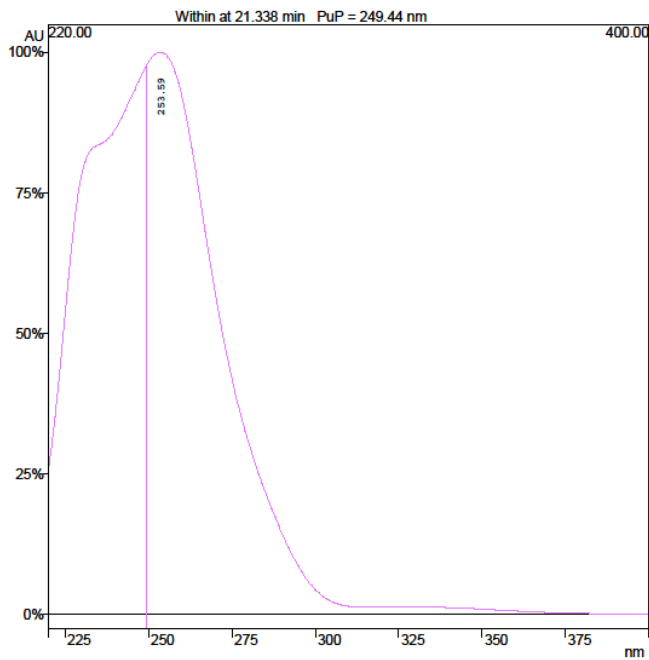
Max Wavelength(nm):	231.31	258.93	319.17
Percent of Max Abs.:	99.9%	54.2%	33.1%



2-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo

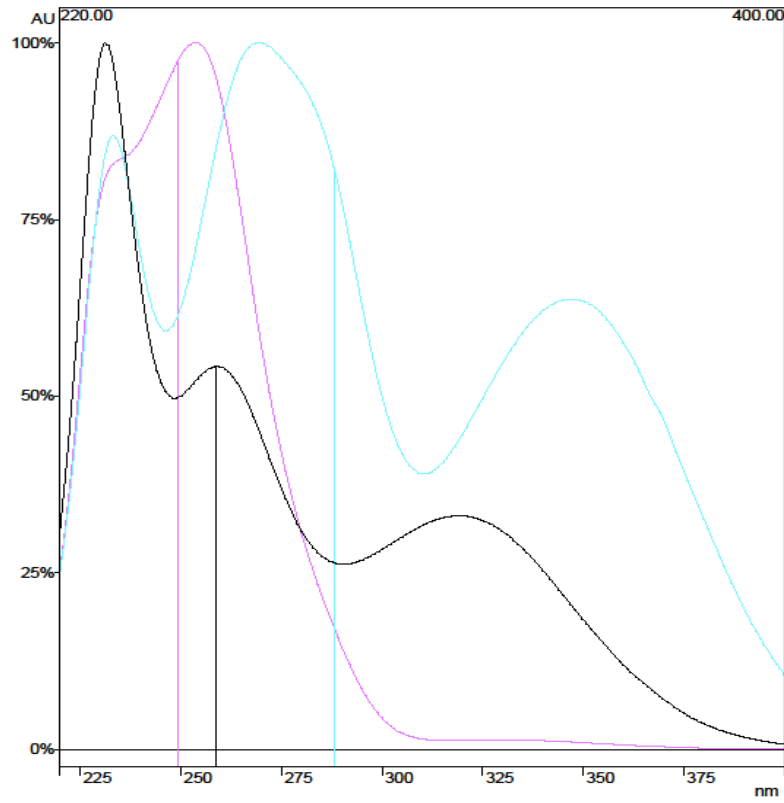
Channel Range: 220.00 to 400.00 nm Absorbance Range: 0.0016 to 1.4522 AU

Max Wavelength(nm):	253.59
Percent of Max Abs.:	100.0%



Benzofenona

No.	Name PuP (nm)	tR (min)	Spectrum Type	Correction	Filename
5	r7_24h10'				
	249.445	21.338	Within	Start	r7_24h10'.run
6	r7_24h10'				
	288.283	20.275	Within	Start	r7_24h10'.run
7	r7_24h10'				
	258.618	19.360	Within	Start	r7_24h10'.run



2-nitrofenol (celeste), 2-(2'-nitrofenoxi)acetato de metilo (negro) y Benzofenona (morado)