

ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA Y
AGROINDUSTRIA

UTILIZACIÓN DE LA RADIACIÓN DE MICROONDA PARA LA
SÍNTESIS DE CUATRO CUMARINAS, MEDIANTE
CONDENSACIÓN DE KNOEVENAGEL

PROYECTO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA
QUÍMICA

CUEVA QUIROZ MERCEDES MATILDE
mmcq_87@yahoo.com

DIRECTORA:
Ing. FLORINELLA MUÑOZ BIESTI, PhD.
florinella.munoz@epn.edu.ec

Quito, abril 2013

© Escuela Politécnica Nacional (2013)
Reservados todos los derechos de reproducción

DECLARACIÓN

Yo, Cueva Quiroz Mercedes Matilde, declaro que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Escuela Politécnica Nacional puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su Reglamento y por la normativa institucional vigente.

Cueva Quiroz Mercedes Matilde
C.I. 1717902223

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Cueva Quiroz Mercedes Matilde, bajo mi supervisión.

Ing. Florinella Muñoz Bisesti, PhD.
DIRECTORA DEL PROYECTO

AUSPICIO

La presente investigación contó con el auspicio financiero del Proyecto Semilla PIS-022-2009, "Utilización de la radiación de microonda para la síntesis de cumarinas y compuestos quinolínicos", que se ejecutó en el Departamento de Ciencias Nucleares de la Escuela Politécnica Nacional.

DEDICATORIA

Dedico este arduo trabajo lleno de esfuerzo y sacrificio a lo más bello de mi vida: mi familia, este gran tesoro del corazón que ha sido y será mi fortaleza, con sus pilares principales: mi papito y mi mamita (Lautaro y Dormila). Además, mis ñañitas: La negrita, La doctorcita y La bebé (Sara, Laura y Ruth); y finalmente, mis sobrinitas: Rosita Sarahí y Lizeth Anahí, quienes han iluminado mi vida con su dulzura e inocencia.

Gracias familia, por su amor y paciencia constantes, espero cumplir siempre con todas sus expectativas...

Merceditas

AGRADECIMIENTOS

En mi corazón agradezco infinitamente a Dios porque siempre me ha otorgado todo lo bello de mi vida, mi familia, y a la EPN por la formación integral que logré bajo su cobijo.

Gracias a mi familia politécnica: Dra. Florinella Muñoz, Dra. Catalina Vasco, Ing. Monserrat Cuesta, Dr. Patricio Castillo, M.Sc. Paola Zárate, Ing. Marcos Sinche, M.Sc. Maribel Luna, M.Sc. Roque Santos, Ing. Edison Vera, Ing. Fernanda Muñoz, Ing. María José Cabrera, Ing. Rodrigo Sánchez y Lorena Quinchuela; por su gran colaboración en varios aspectos de mi vida. Además, agradezco la valiosa ayuda extranjera de la Prof. Dorota Janik y de la Dra. Heiddy Márquez.

Muchas gracias a mis amig@s y compañer@s de la travesía en la EPN: Fernanda Luje, Marcelo Cabrera, Javier Yaselga, Jenny Arias, Ricardo Montero y Mejía, Isabel Pazmiño, Janeth Gómez, Tatiana Noboa, Verónica Arcos, Susana Morales, Anael Paredes, Estefanía Orquera y Cristina Villacrés. Además, a muchas más personas que tal vez sólo un día me brindaron su saludo afectuoso o una palabra de aliento, siempre gracias y éxitos en los retos que la vida nos dará.

Es muy grato tener una familia numerosa porque de cada persona, uno puede tomar lo mejor, aprender de sus experiencias, reír y llorar con ellos, compartir y superar sus problemas ha sido lo más enriquecedor de mi vida, por esto y más agradezco a mis 26 tíos: Rosita y Esther Cueva, Rodrigo Cueva y Blanca, Gonzalo y Lucila, Elvia y Ángel, Luis y Anita, Juan y Nancy, Lorgio y Rosita Saldaña, Nery y Rodrigo Martínez, Raquel y Exón, Dilma y Ruber, Dalila y Serge, Lilian y Flavian, Esther Quiroz y Pedro Vicente; y a mis 47 prim@s y anex@s, donde hago una mención especial a mi “primo” Daniel Ernesto Cueva Granda porque él me dio el impulso final para tomar el reto de estudiar en la EPN.

Para terminar, me permito citar una frase que marcó mi vida personal: “Amor es amar” de Mahatma Gandhi, porque... ¿qué sería de la vida sin el amor?... Además otra del famoso escritor brasileño, Paulo Coelho, la cual se presenta en su libro *El Alquimista*: “Cuando una persona desea realmente algo, el Universo entero conspira para que pueda realizar su sueño. Basta con aprender a escuchar los dictados del corazón y a descifrar el lenguaje que está más allá de las palabras”, una idea que me motivó a no huir a las metas difíciles en el ámbito profesional porque tod@ ingenier@ químic@ llevamos a un altruista y utópic@ alquimista en nuestro corazón.

Merceditas

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	PÁGINA
ABREVIATURAS	xvi
GLOSARIO	xvii
RESUMEN	xxi
INTRODUCCIÓN	xxiii
1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1.1 Cumarinas	1
1.1.1 Estructura y propiedades	1
1.1.2 Clasificación	2
1.1.3 Usos	5
1.1.4 Biosíntesis de las cumarinas	6
1.1.5 Métodos de identificación	7
1.1.6 Métodos de obtención	9
1.1.6.1 Obtención de cumarinas por extracción a partir de plantas	9
1.1.6.2 Obtención de cumarinas por síntesis orgánica	10
1.1.7 Reacciones para la síntesis de cumarinas	11
1.1.7.1 Reacción de Pechmann – Duisberg	12
1.1.7.2 Reacción de Perkin	13
1.1.7.3 Reordenamiento de Claisen – Schmidt	14
1.2 Condensación de Knoevenagel	16
1.2.1 Modificación de Doebner	18
1.2.2 Mecanismo de la reacción	19
1.3 Síntesis de cumarinas por microondas	21
1.3.1 Radiación de microondas	21
1.3.2 Historia del horno microondas	23
1.3.3 Fundamentos del funcionamiento del horno de MO	24
1.3.3.1 Generador de la microonda	26
1.3.3.2 Aplicador de la microonda	27
1.3.3.3 Recipientes para la microonda	27
1.3.4 Aplicaciones de la radiación de microondas	28
1.3.5 Efecto microondas	30
1.4 Análisis por HPLC	31
2 PARTE EXPERIMENTAL	33
2.1 Materiales	33
2.2 Caracterización del horno microondas	35
2.2.1 Caracterización de la superficie total del horno microondas	36
2.2.2 Caracterización radial del horno microondas	36

2.3	Caracterización del producto y reactivo involucrados en cada reacción por espectrofotometría UV-Vis	36
2.3.1	Caracterización de la 1,2-Benzopirona y de los reactivos	37
2.3.1.1	Levantamiento de los espectros	37
2.3.1.2	Construcción de las curvas de calibración	38
2.3.2	Caracterización de la Etil 3-Carboxi y de los reactivos	39
2.3.2.1	Levantamiento de los espectros	39
2.3.2.2	Construcción de las curvas de calibración	39
2.3.3	Caracterización de la 4-Hidroxi Cumarina y de los reactivos	40
2.3.3.1	Levantamiento de los espectros	40
2.3.3.2	Construcción de las curvas de calibración	41
2.3.4	Caracterización de la 4-Metil Umbeliferona y de los reactivos	41
2.3.4.1	Levantamiento de los espectros	41
2.3.4.2	Construcción de las curvas de calibración	42
2.4	Desarrollo del método convencional para la síntesis de cumarinas, mediante Condensación de Knoevenagel	43
2.4.1	Síntesis convencional de la 1,2-Benzopirona	44
2.4.2	Síntesis convencional de la Etil 3-Carboxi Cumarina	45
2.4.3	Síntesis convencional de la 4-Hidroxi Cumarina	47
2.4.4	Síntesis convencional de la 4-Metil Umbeliferona	48
2.5	Desarrollo del método de síntesis de cumarinas, mediante Condensación de Knoevenagel, por radiación de microondas	49
2.5.1	Síntesis no convencional de la 1,2-Benzopirona	50
2.5.2	Síntesis no convencional de la Etil 3-Carboxi Cumarina	52
2.5.3	Síntesis no convencional de la 4-Hidroxi Cumarina	53
2.5.4	Síntesis no convencional de la 4-Metil Umbeliferona	54
2.6	Identificación y cuantificación de los productos obtenidos por HPLC	55
2.6.1	Pruebas preliminares con el HPLC	56
2.6.2	Levantamiento de la técnica de análisis	56
2.6.2.1	Identificación de la 1,2-Benzopirona	57
2.6.2.2	Identificación de la Etil 3-Carboxi Cumarina	57
2.6.2.3	Identificación de la 4-Hidroxi Cumarina	58
2.6.2.4	Identificación de la 4-Metil Umbeliferona	58
2.6.3	Cuantificación de las cumarinas sintetizadas	58
2.6.3.1	Construcción de la curva de calibración de la 1,2-Benzopirona por HPLC	58
2.6.3.2	Construcción de la curva de calibración de la Etil 3-Carboxi Cumarina por HPLC	59
2.6.3.3	Construcción de la curva de calibración de la 4-Hidroxi Cumarina por HPLC	59
2.6.3.4	Construcción de la curva de calibración de la 4-Metil Umbeliferona por HPLC	60
2.7	Evaluación de costos	60
2.7.1	Análisis preliminar de costos e inversión	61

2.7.2	Comparación económica entre el método convencional y la síntesis por radiación de microondas	62
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
3.1	Caracterización del horno microondas	64
3.1.1	Caracterización de la superficie total del horno microondas	66
3.1.2	Caracterización radial del horno microondas	66
3.2	Caracterización del producto y reactivo involucrados en cada reacción por espectrofotometría UV-Vis	67
3.2.1	Caracterización de la 1,2-Benzopirona y de los reactivos	68
3.2.1.1	Levantamiento de los espectros	68
3.2.1.2	Construcción de las curvas de calibración	69
3.2.2	Caracterización de la Etil 3-Carboxi y de los reactivos	70
3.2.2.1	Levantamiento de los espectros	70
3.2.2.2	Construcción de las curvas de calibración	71
3.2.3	Caracterización de la 4-Hidroxi Cumarina y de los reactivos	72
3.2.3.1	Levantamiento de los espectros	72
3.2.3.2	Construcción de las curvas de calibración	73
3.2.4	Caracterización de la 4-Metil Umbeliferona y de los reactivos	74
3.2.4.1	Levantamiento de los espectros	74
3.2.4.2	Construcción de las curvas de calibración	75
3.3	Identificación y cuantificación de los productos obtenidos por HPLC	76
3.3.1	Resultados preliminares con el HPLC	76
3.3.2	Levantamiento de la técnica de análisis	77
3.3.2.1	Identificación de la 1,2-Benzopirona	77
3.3.2.2	Identificación de la Etil 3-Carboxi Cumarina	78
3.3.2.3	Identificación de la 4-Hidroxi Cumarina	79
3.3.2.4	Identificación de la 4-Metil Umbeliferona	80
3.3.3	Cuantificación de las cumarinas sintetizadas	80
3.3.3.1	Construcción de la curva de calibración de la 1,2-Benzopirona por HPLC	81
3.3.3.2	Construcción de la curva de calibración de la Etil 3-Carboxi Cumarina por HPLC	82
3.3.3.3	Construcción de la curva de calibración de la 4-Hidroxi Cumarina por HPLC	83
3.3.3.4	Construcción de la curva de calibración de la 4-Metil Cumarina por HPLC	84
3.4	Desarrollo del método convencional para la síntesis de cumarinas, mediante Condensación de Knoevenagel	85
3.4.1	Síntesis convencional de la 1,2-Benzopirona	85
3.4.2	Síntesis convencional de la Etil 3-Carboxi Cumarina	86
3.4.3	Síntesis convencional de la 4-Hidroxi Cumarina	92
3.4.4	Síntesis convencional de la 4-Metil Umbeliferona	93

3.5	Desarrollo del método de síntesis de cumarinas, mediante Condensación de Knoevenagel, por radiación de microondas	94
3.5.1	Síntesis no convencional de la 1,2-Benzopirona	95
3.5.2	Síntesis no convencional de la Etil 3-Carboxi Cumarina	95
3.5.3	Síntesis no convencional de la 4-Hidroxi Cumarina	104
3.5.4	Síntesis no convencional de la 4-Metil Umbeliferona	105
3.6	Evaluación de costos	105
3.6.1	Análisis preliminar de costos e inversión	105
3.6.2	Comparación económica entre el método convencional y la síntesis por radiación de microondas	108
4	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	111
4.1	Conclusiones	111
4.2	Recomendaciones	113
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
	ANEXOS	122

ÍNDICE DE TABLAS

		PÁGINA
Tabla 1.1.	Descripción de las algunas cumarinas con sus propiedades útiles y tóxicas	6
Tabla 1.2.	Algunas cumarinas simples y complejas con la principal fuente natural	10
Tabla 1.3.	Permisividad dieléctrica y factores de dispersión a 3 GHz y 25 °C de ciertas sustancias	23
Tabla 1.4.	Factores de dispersión de materiales sólidos a 25 °C y una frecuencia de 3 GHz	28
Tabla 2.1.	Principal información de los reactivos utilizados para la síntesis de cumarinas por Condensación de Knoevenagel	34
Tabla 2.2.	Principales reactivos para la síntesis de cada cumarina mediante Condensación de Knoevenagel	37
Tabla 2.3.	Concentraciones de las soluciones de los reactivos involucrados en la síntesis de la 1,2-Benzopirona para su caracterización	38
Tabla 2.4.	Concentraciones de los estándares preparados de la 1,2-Benzo pirona para construir la curva de calibración	38
Tabla 2.5.	Concentraciones de las soluciones de los reactivos involucrados en la síntesis de la ECC para su caracterización	39
Tabla 2.6.	Concentraciones de los estándares preparados de la ECC para construir la curva de calibración	40
Tabla 2.7.	Concentraciones de las soluciones de los reactivos involucrados en la síntesis de la 4-Hidroxi Cumarina para su caracterización	40
Tabla 2.8.	Concentraciones de los estándares preparados de la 4-Hidroxi Cumarina para construir la curva de calibración	41
Tabla 2.9.	Concentraciones de las soluciones de los reactivos involucrados en la síntesis de la 4-Metil Umbeliferona para su caracterización	42
Tabla 2.10.	Concentraciones de los estándares preparados de la 4-Metil Umbeliferona para construir la curva de calibración	42
Tabla 2.11.	Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la 1,2-Benzopirona, mediante reflujo	45

Tabla 2.12.	Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la ECC , mediante reflujo	47
Tabla 2.13.	Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la 4-Hidroxi Cumarina, mediante reflujo	48
Tabla 2.14.	Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la 4-Metil Umbeliferona, mediante reflujo	49
Tabla 2.15.	Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la 1,2-Benzopirona por radiación de microondas	51
Tabla 2.16.	Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la ECC por MO	52
Tabla 2.17.	Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la 4-Hidroxi Cumarina por radiación de microondas	53
Tabla 2.18.	Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la 4-Metil Umbeliferona por radiación de microondas	54
Tabla 2.19.	Condiciones generales del análisis HPLC para la identificación de las cumarinas seleccionadas	57
Tabla 2.20.	Estándares preparados de la 1,2-Benzopirona para su curva de calibración en HPLC-UV	58
Tabla 2.21.	Estándares preparados de la ECC para su curva de calibración en HPLC-UV	59
Tabla 2.22.	Estándares preparados de la 4-Hidroxi Cumarina para su curva de calibración en HPLC-UV	60
Tabla 2.23.	Estándares preparados de la 4-Metil Umbeliferona para su curva de calibración en HPLC-UV	60
Tabla 2.24.	Precios de los reactivos involucrados en la síntesis convencional y por MO de las cumarinas seleccionadas	62
Tabla 3.1.	Tiempos de irradiación resultantes de la caracterización final del horno convencional de microondas	65
Tabla 3.2.	Datos de las distancias de las franjas de coloración para cada nivel de potencia	67
Tabla 3.3.	Absorbancias reportadas mediante espectrofotometría UV de las soluciones estándares de la 1,2-Benzopirona a $\lambda = 274$ nm	69

Tabla 3.4.	Absorbancias reportadas mediante espectrofotometría UV de las soluciones estándares de la ECC a $\lambda = 275$ nm	71
Tabla 3.5.	Absorbancias reportadas mediante espectrofotometría UV de los estándares de la 4-Hidroxi Cumarina a $\lambda = 260$ nm	73
Tabla 3.6.	Absorbancias reportadas mediante espectrofotometría UV de las soluciones estándares de la 2,4-Dihidroxi Acetofenona* a $\lambda = 260$ nm	75
Tabla 3.7.	Absortividades molares (ϵ) calculadas de las sustancias seleccionadas mediante espectrofotometría UV	76
Tabla 3.8.	Condiciones de análisis en el equipo HPLC Agilent para la construcción de la curva de calibración de la 1,2-Benzopirona	77
Tabla 3.9.	Condiciones de análisis en el equipo HPLC Agilent para la construcción de la curva de calibración de la ECC	78
Tabla 3.10.	Condiciones de análisis en el equipo HPLC Agilent para la construcción de la curva de calibración de la 4-Hidroxi Cumarina	79
Tabla 3.11.	Condiciones de análisis en el equipo HPLC Agilent para la construcción de la curva de calibración de la 4-Metil Umbeliferona	80
Tabla 3.12.	Datos generados en HPLC para la construcción de la curva de calibración de la 1,2-Benzopirona a $\lambda = 274$ nm	81
Tabla 3.13.	Datos generados en HPLC para la construcción de la curva de calibración de la ECC a $\lambda = 290$ nm	82
Tabla 3.14.	Datos generados en HPLC para la construcción de la curva de calibración de la 4-Hidroxi Cumarina a $\lambda = 260$ nm	83
Tabla 3.15.	Datos generados en HPLC para la construcción de la curva de calibración de la 4-Metil Umbeliferona a $\lambda = 330$ nm	84
Tabla 3.16.	Parámetros del diseño experimental desarrollado para la síntesis convencional de la ECC mediante reflujo	87
Tabla 3.17.	Resultados de las dos variables de salida para cada réplica del diseño experimental aplicado a la síntesis convencional de la ECC por reflujo a $t = 100$ min	87
Tabla 3.18.	ANOVA para la Variación de la Conversión por la Cantidad de piperidina para la síntesis de la ECC , mediante reflujo	88

Tabla 3.19.	ANOVA para la Conversión total por la Cantidad de piperidina para la síntesis de la ECC , mediante reflujo	88
Tabla 3.20.	Conversiones alcanzadas para la síntesis de la Etil 3-Carboxi Cumarina por reflujo durante 100 min	89
Tabla 3.21.	Disminución de la concentración del Salicilaldehído mediante el método convencional de reflujo durante 100 min	91
Tabla 3.22.	Parámetros del diseño experimental desarrollado para la síntesis de la ECC por radiación de microondas	96
Tabla 3.23.	Datos de cada réplica de todas las combinaciones generadas por el diseño experimental para la síntesis por MO de la ECC	97
Tabla 3.24.	ANOVA para la Variación de la Conversión para la síntesis de la ECC por radiación de microondas	98
Tabla 3.25.	ANOVA para la Conversión total para la síntesis de la ECC por radiación de microondas	99
Tabla 3.26.	Valores alcanzados de la Variación de Conversión y de la Conversión Total en la síntesis de la ECC por MO para cada combinación del diseño experimental, con los valores de los parámetros estadísticos considerados	100
Tabla 3.27.	Consumo del Salicilaldehído en la síntesis por MO para cada combinación del diseño experimental, con los valores de los parámetros estadísticos considerados	102
Tabla 3.28.	Densidad de los reactivos y cantidades utilizadas para la mejor conversión en la síntesis convencional y no convencional de la ECC	106
Tabla 3.29.	Tiempos para cada subproceso experimental de la síntesis de la ECC , mediante Condensación de Knoevenagel	107
Tabla 3.30.	Costos del consumo diario de los reactivos para la síntesis de la ECC , mediante Condensación de Knoevenagel	107
Tabla 3.31.	Rendimientos evaluados con la consideración de la recristalización del producto sintetizado, la ECC , mediante Condensación de Knoevenagel	108
Tabla 3.32.	Periodos totales de la síntesis convencional y en MO de la ECC , mediante Condensación de Knoevenagel	108

Tabla 3.33.	Evaluación del beneficio económico de la técnica no convencional frente a la convencional para la síntesis de la ECC , mediante Condensación de Knoevenagel	109
Tabla AII.1.	Pesos de las piezas de papel usadas para cada nivel de potencia del horno convencional de microondas	125

ÍNDICE DE FIGURAS

		PÁGINA
Figura 1.1.	Estructura molecular de la Cumarina (1,2-Benzopirona) con su grupo lactona característico	1
Figura 1.2.	Estructura molecular de la Umbeliferona, cumarina simple con un sustituyente oxigenado en la posición 7	3
Figura 1.3.	Estructura molecular del Sposoleno, furanocumarina lineal	3
Figura 1.4.	Estructura molecular de la Angelicina, furanocumarina angular	3
Figura 1.5.	Estructura molecular de la Xantiletina, piranocumarina lineal	4
Figura 1.6.	Estructura molecular de la Sesilina, piranocumarina angular	4
Figura 1.7.	Estructura molecular del Dicumarol (bishidroxicumarina), cumarina diversa	4
Figura 1.8.	Estructura molecular del Cumestrol, cumarina prenilada	5
Figura 1.9.	Mecanismo de reacción de la biosíntesis de una cumarina simple, la Umbeliferona, desde el ácido shikímico	7
Figura 1.10.	Proceso de fragmentación en MS de la 1,2-Benzopirona	8
Figura 1.11.	Esquema de la reacción de Pechmann para la obtención de la β -Metil Umbeliferona, con el uso del imidazolio-SO ₃ H funcionalizado ILs	13
Figura 1.12.	Mecanismo de la condensación del ácido cinámico mediante la Reacción de Perkin, con un catalizador básico	13
Figura 1.13.	Mecanismo del Reordenamiento de Claisen - Schmidt entre un éster y una cetona o aldehído en presencia de una base fuerte	15
Figura 1.14.	Esquema de la condensación de Claisen para la síntesis del acetoacetato de etilo y etanol como subproducto en medio ácido con etóxido de sodio como catalizador	15
Figura 1.15.	Esquema de la síntesis de cumarinas por Condensación de Knoevenagel	17
Figura 1.16.	Comparación entre la Condensación de Knoevenagel simple y la misma con la Modificación de Doebner	18

Figura 1.17.	Estructura molecular de los ácidos <i>o</i> -hidroxicinámicos, isómeros <i>cis</i> y <i>trans</i> , ácido cumarínico y ácido cumárico	19
Figura 1.18.	Esquema simplificado de un mecanismo de reacción posible de la Condensación de Knoevenagel	20
Figura 1.19.	Diagrama del espectro electromagnético: tipo de onda con su frecuencia y acción, y la tendencia de ϵ' y ϵ''	22
Figura 1.20.	Diagrama comparativo entre el calentamiento producido por el baño de aceite y por la radiación de microondas	25
Figura 1.21.	Esquema de un magnetrón y sus cuatro partes principales	26
Figura 2.1.	Diagrama de bloques de la síntesis convencional para la producción de una cumarina, mediante Condensación de Knoevenagel	43
Figura 2.2.	Diagrama de flujo de la síntesis por radiación de microondas, para la producción de una cumarina, por Condensación de Knoevenagel	50
Figura 3.1.	Diagrama de bloques de los pasos principales de cada técnica de síntesis con la técnica analítica y el resultado de cada uno	64
Figura 3.2.	Tiempo de irradiación aplicado hasta el cambio de coloración de las piezas de papel en función de la potencia del horno MO	65
Figura 3.3.	Absorbancia de la 1,2-Benzopirona, el Salicilaldehído y la Piperidina, en función de la longitud de onda	68
Figura 3.4.	Curva de calibración para la 1,2-Benzopirona (Cumarina) a $\lambda = 274$ nm mediante espectrofotometría UV	69
Figura 3.5.	Absorbancia de la ECC, Salicilaldehído, Malonato de Dietilo y Piperidina, en función de la longitud de onda	70
Figura 3.6.	Curva de calibración para la ECC a $\lambda = 275$ nm mediante espectrofotometría UV	71
Figura 3.7.	Absorbancia de la 4-Hidroxi Cumarina, el Ácido Salicílico y la Piperidina, en función de la longitud de onda	72
Figura 3.8.	Curva de calibración para la 4-Hidroxi Cumarina a $\lambda = 260$ nm mediante espectrofotometría UV	73
Figura 3.9.	Absorbancia de la 4-Metil Umbeliferona, la 2,4-Dihidroxi Acetofenona y la Piperidina, en función de la longitud de onda	74

Figura 3.10.	Curva de calibración para la 2,4-Dihidroxi Acetofenona a $\lambda = 260$ nm mediante espectrofotometría UV	75
Figura 3.11.	Curva de calibración de la 1,2-Benzopirona a $\lambda = 274$ nm en el HPLC-UV	81
Figura 3.12.	Curva de calibración de la ECC a $\lambda = 290$ nm en el HPLC-UV	82
Figura 3.13.	Curva de calibración de la 4-Hidroxi Cumarina a $\lambda = 260$ nm en el HPLC-UV	83
Figura 3.14.	Curva de calibración de la 4-Metil Umbeliferona a $\lambda = 330$ nm en HPLC-UV	84
Figura 3.15.	Rendimiento del método convencional para la producción de ECC, en función de la cantidad de catalizador añadida	90
Figura 3.16.	Consumo del Salicilaldehído en función de la cantidad de piperidina, por la técnica de reflujo	92
Figura 3.17.	Esquema de la Condensación de Knoevenagel para la síntesis de la ECC	96
Figura 3.18.	Variación de la conversión de la ECC en función del tiempo de irradiación para diferentes concentraciones de catalizador para la síntesis por radiación de MO	101
Figura 3.19.	Conversión total de ECC en función del tiempo de irradiación para cada cantidad de catalizador por síntesis en MO	101
Figura 3.20.	Consumo del Salicilaldehído para cada tiempo de irradiación para diferentes concentraciones de piperidina, por el método no convencional para la síntesis de la ECC	103
Figura AI.1.	Fotografía de la caracterización de la superficie total del horno microondas sin el plato giratorio	123
Figura AI.2.	Fotografía de la caracterización de la superficie total del plato giratorio	124
Figura AI.3.	Fotografía de la caracterización radial del horno de MO	124
Figura AIII.1.	Cromatogramas HPLC-UV de las soluciones estándares de la 1,2-Benzopirona y del Salicilaldehído a $\lambda = 274$ nm	126
Figura AIV.1.	Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 1,0 % mol de piperidina y sin/con 0,5 min de irradiación	128

Figura AIV.2.	Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 1,5 % mol de piperidina y sin/con 0,5 min de irradiación	129
Figura AIV.3.	Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 2,0 % mol de piperidina y sin/con 0,5 min de irradiación	130
Figura AIV.4.	Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 1,0 % mol de piperidina y sin/con 1,0 min de irradiación	131
Figura AIV.5.	Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 1,5 % mol de piperidina y sin/con 1,0 min de irradiación	132
Figura AIV.6.	Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 2,0 % mol de piperidina y sin/con 1,0 min de irradiación	133
Figura AIV.7.	Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 1,0 % mol de piperidina y sin/con 2,0 min de irradiación	134
Figura AIV.8.	Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 1,5 % mol de piperidina y sin/con 2,0 min de irradiación	135
Figura AIV.9.	Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 2,0 % mol de piperidina y sin/con 2,0 min de irradiación	136
Figura AV.1.	Cromatogramas HPLC-UV de las soluciones estándares de la 4-Hidroxi Cumarina y del Ácido Salicílico a $\lambda = 260$ nm	137
Figura AVI.1.	Cromatogramas HPLC-UV de las soluciones estándares de la 4-Metil Umbeliferona y de la 2,4-Dihidroxi Acetofenona a $\lambda = 330$ nm	138
Figura AVII.1.	Fotografía de la síntesis de la 1,2-Benzopirona con el uso de un catalizador básico (la piperidina), mediante la Condensación de Knoevenagel	139
Figura AVII.2.	Fotografía de la síntesis de la 1,2-Benzopirona con el uso de un catalizador ácido (ácido clorhídrico), mediante la reacción de Pechmann	139

Figura AVII.3.	Fotografía de la síntesis convencional de la ECC con el uso de la piperidina, mediante la Condensación de Knoevenagel	140
Figura AVII.4.	Fotografía de la síntesis convencional de la ECC con el uso de ácido clorhídrico, mediante la reacción de Pechmann	140
Figura AVII.5.	Fotografía de las mezclas reactivas frías de la síntesis convencional de la ECC con el uso de piperidina y ácido clorhídrico como catalizadores	141
Figura AIX.1.	Fotografía de las mezclas reactivas resultantes de la síntesis por MO de la 1,2-Benzopirona al nivel 10 de potencia y 1 min de irradiación, sin sílica gel, a 2/3 como relación molar entre reactivos y al 0,1y 1,2 % mol del catalizador básico	145
Figura AIX.2.	Fotografía de las mezclas reactivas resultantes de la síntesis por MO de la 1,2-Benzopirona al nivel 10 de potencia y 1 min de irradiación, sin sílica gel, a 2/3 como relación molar entre reactivos y al 5,9 y 11,8 % mol del catalizador básico	145
Figura AX.1.	Comandato. (2009). <i>Factura No. 131 – 001 – 0004561</i> . Beatriz Párraga (V2277), Fecha de emisión: 2009 – 12 – 17	148
Figura AX.2.	Escuela Politécnica Nacional. (2011). <i>Acta de Entrega - Recepción No. 5167 – Ingreso de Activos Fijos</i> . Proveedor: César Vásconez, Fecha de emisión: 2011 - 06 - 15: DCN - LIA	149
Figura AX.3.	Labomersa S.A., Distribuidor autorizado MERCK C.A. (2010). Cotización No. 77148433 – 758. Fecha de emisión: 2009 – 09 – 25, Fecha de validez: 2009 – 10 – 10: Representante con el código 77148433	149
Figura AX.4.	ESPECTROCROM, Distribuidor autorizado Sigma – Aldrich (2010). Cotización No. 464A LN 10. Fecha de emisión: 2010 – 03 – 25, Fecha de validez: 2010 – 04 – 25: Ing. Leonardo Nolivos	150
Figura AX.5.	Saville Corporation. (2009). COMPROBANTE DE PAGO de la Factura No. 1005. Orden # W001650 y Orden # W001547. Fecha de emisión: 2010 – 05 – 27: Ing. Margoth Cifuentes	151
Figura AXI.1.	Fotografías de 3 mezclas reactivas frías de la síntesis de la Etil 3-Carboxi Cumarina con 2,0 % mol de piperidina y 0,5; 1,0 o 2,0 min de irradiación MO	153

ÍNDICE DE ANEXOS

	PÁGINA
ANEXO I	
Fotografías de la caracterización del horno microondas utilizado	123
ANEXO II	
Datos de las piezas de papel utilizadas para la caracterización radial del horno microondas	125
ANEXO III	
Cromatogramas HPLC-UV de los estándares de la 1,2-Benzopirona y su reactivo limitante, Salicilaldehído	126
ANEXO IV	
Cromatogramas HPLC-UV de la mezcla reactiva resultante de la síntesis de la Etil 3-Carboxi Cumarina, mediante radiación de MO	127
ANEXO V	
Cromatogramas HPLC-UV de los estándares de la 4-Hidroxi Cumarina y su reactivo limitante, Ácido Salicílico	137
ANEXO VI	
Cromatogramas HPLC-UV de los estándares de la 4- Metil Umbeliferona y su reactivo limitante, 2,4-Dihidroxi Acetofenona	138
ANEXO VII	
Fotografías de las pruebas preliminares realizadas para la síntesis de las cumarinas seleccionadas con el método convencional de reflujo	139
ANEXO VIII	
Análisis y discusión del coeficiente de error del 25 % adoptado en la estadística	142
ANEXO IX	
Fotografías de las pruebas preliminares realizadas para la síntesis de la 1,2-Benzopirona por radiación de MO con hidróxido de sodio como catalizador	145
ANEXO X	
Ejemplo de cálculo de la evaluación de costos para la síntesis de la ECC y respaldos de proformas y facturas de equipos y reactivos utilizados	146
ANEXO XI	
Propuesta de una práctica para el Laboratorio de Química Orgánica II de la síntesis no convencional de la ECC	152

ABREVIATURAS

ACO: Anti-coagulante oral

ANOVA: Análisis de varianza

DC: Corriente directa

DCN: Departamento de Ciencias Nucleares

ECC: Etil 3-Carboxi Cumarina

EPN: Escuela Politécnica Nacional

GC: Cromatografía de gases

GL: Grados de libertad

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)

IR: Infrarrojo

MO: Microondas

MS: Espectrometría de masas

RMN: Resonancia magnética nuclear

UV-Vis: Ultravioleta y Visible

GLOSARIO

Ácido Shikímico: Ácido carboxílico derivado del ácido salicílico con dos grupos hidróxido adicionales; es decir es el ácido benzoico con tres grupos – OH en las posiciones 3, 4 y 5 del anillo. Es el principal precursor de la biosíntesis de metabolitos secundarios tales como compuestos fenólicos (entre ellos, las cumarinas), alcaloides y compuestos nitrogenados (Lock de Ugaz, 2001, p. 50).

Catálisis: Reacción que se produce con la intervención de una sustancia llamada catalizador que acelera o retarda la velocidad de la misma sin alterar el equilibrio, porque el catalizador no se transforma, ni inicia la reacción, solo facilita la formación de los compuestos intermedios necesarios para la producción de los compuestos esperados (Bruice, 2008, p. 1 063).

Compuestos cíclicos: Compuestos orgánicos cuya estructura es un anillo cerrado. Si todos los átomos que forman el anillo son de la misma especie, por lo general el carbono, se denomina compuesto homocíclico, por ejemplo el ciclohexano (Morrison y Boyd, 1990, p. 469) y si existen uno o más átomos de otra especie en el anillo, como el nitrógeno, el oxígeno o el azufre, se llama heterocíclico (Bruice, 2008, p. 82; Potapov y Tatarinchik, 1983, p. 428).

Condensación de Knoevenagel: Reacción de la química orgánica que se desarrolla entre un aldehído alifático o aromático con un grupo metileno activo y un éster con un H- α reactivo, en presencia de una base orgánica como catalizador, que es una amina. Por definición, toda condensación elimina moléculas de pequeño tamaño molecular, como en este caso: agua y etanol (El Khatib, Porta y Prieto, 2006, p. 1).

Conjugación: Fenómeno por el que tres o más orbitales p paralelos participan en el solapamiento del tipo π (p_i), porque los electrones en estos orbitales están deslocalizados, es decir son compartidos por tres o más centros atómicos. Esta deslocalización determina el apareamiento alterno de enlaces simples y dobles (Vollhardt y Schore, 2007, p. 602).

Constante dieléctrica: (ϵ') Propiedad física que determina la permisividad dieléctrica de un material debido a la polarización dada por la acción de energía electromagnética de alta frecuencia. La constante dieléctrica se opone a la propagación de la onda electromagnética en un medio por la estática del material para obstruir el paso a través del mismo de la energía (Kingston y Jassie, 1988, p. 9; Loupy, 2003, p. 4).

Conversión Total: En el presente estudio, este término se refiere a la cantidad de producto obtenido por el efecto combinado entre la acción del catalizador y el mecanismo de calentamiento, como el reflujo para la síntesis convencional y la radiación de MO para el método no convencional de síntesis (Loupy, 2003, p. 368).

Cromóforo: Grupo dentro de una molécula capaz de absorber fotones en la región UV-Vis (200–700 nm) por la presencia de energía de transición. En los compuestos orgánicos, los grupos cromóforos se identifican con grupos funcionales no saturados con orbitales π que pasan a su estado excitado. En compuestos metálicos, la propiedad de absorción de la luz está vinculada con la presencia y transición de orbitales d . (Skoog, Holler y Crouch, 2008, p. 369; Angenault, 1998, p. 123).

Cumarinas: Lactonas insaturadas, cuyo heteronúcleo es el benzo α -pirona, que poseen un sustituyente oxigenado con excepción de la 1,2-Benzopirona. Estos metabolitos secundarios se encuentran en gramíneas y en plantas superiores. La propiedad física más usada para su detección es la fluorescencia generada con la luz ultravioleta a $\lambda = 365$ nm (Arango, 2010, p. 34).

Factor de pérdida dieléctrica: (ϵ'') Propiedad física asociada a un material aislante, que es inversamente proporcional a la permisividad eléctrica y su magnitud depende de la habilidad de disipar la energía. Este factor sirve para estudiar el tiempo de vida útil de un material dieléctrico usado en un medio provisto de corriente eléctrica, como por ejemplo el aceite aislante de un transformador de alta potencia. (Kingston y Jassie, 1988, p. 9; Loupy, 2003, p. 4).

Factor de disipación: ($\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon'$) Propiedad física que determina la capacidad de un material de absorber la energía aplicada y aprovechar el calor entregado. La magnitud de la disipación depende directamente de la resistencia e inversamente de la permisibilidad del material (Kingston y Jassie, 1988, pp. 9, 12).

Horno microondas: Equipo en el cual se utiliza la radiación electromagnética de MO para producir el calentamiento de un producto. La MO es generada por un magnetrón, que es una lámpara de alta frecuencia. La MO viaja a través de una guía de ondas hasta la zona donde se encuentra el producto. En el horno MO se debe procurar que la carga absorba toda la radiación. La MO, por ser una onda electromagnética, produce movimiento de las moléculas polares y en este proceso de rotación y fricción molecular, se da una dispersión de energía que se traduce en un calentamiento del sistema (Kingston y Jassie, 1988, pp. 28-31).

HPLC: Es una técnica de separación de sustancias químicas en una columna. La muestra en análisis es arrastrada por una fase móvil líquida que se mueve a presión a través de la columna. La separación se basa en la interacción que se establece entre las sustancias a separar, el material de la columna y la fase móvil. Las sustancias separadas se caracterizan por sus diferentes tiempos de retención. Esta técnica tiene innumerables aplicaciones en el campo farmacéutico, de alimentos, en química forense, ambiental, medicina clínica, etc. (Skoog et al., 2008, p. 816).

Isomería: Relación de ciertos compuestos químicos que poseen los mismos componentes, en número y especie, pero tienen diferentes propiedades físicas o químicas. Se pueden tener isómeros constitucionales, si los compuestos poseen la misma fórmula molecular, pero la unión de los átomos que forman parte de la estructura es diverso. Existen estereo isómeros que corresponden a compuestos que difieren en la posición que los átomos ocupan en el espacio aunque se encuentren enlazados de la misma manera entre sí (Bruice, 2008, p. 188).

Lactonas: Son ésteres cíclicos formados por la condensación interna de un grupo carboxílico con un grupo hidroxilado de la misma molécula, con eliminación de

agua. Las lactonas de los γ -hidroxiácidos y de los δ -hidroxiácidos se forman fácilmente (Bruice, 2008, p. 727).

Mezcla Reactiva: Combinación homogénea o heterogénea entre las sustancias químicas involucradas en una reacción específica. En el presente estudio se han definido tres tipos de mezclas reactivas: inicial, teórica y final. La mezcla reactiva **inicial** es aquella generada por combinación de las sustancias químicas denominadas “reactivos” sin conversión alguna en los “productos”; la mezcla reactiva **teórica** es la que se obtiene por la adición de los “reactivos” y de los “productos” en las cantidades calculadas y la mezcla reactiva **final** es aquella generada experimentalmente por la conversión de los “reactivos” en los “productos” esperados (Ballini, Clark y Kraus, 2009, p. 12; Loupy, 2003, p. 406).

Piperidina: Compuesto heterocíclico alifático, $C_5H_{11}N$, producto de la hidrogenación catalítica de la piridina que es un compuesto heterocíclico aromático ($K_b = 1,5 \times 10^{-9}$, C_5H_5N , piridina). Por la basicidad que posee la piperidina como amina alifática secundaria ($K_b = 2 \times 10^{-3}$), se la usa como catalizador básico en reacciones como la de Knoevenagel (Morrison y Boyd, 1990, p. 932). El radical monovalente de la piperidina se denomina piperidilo, como su análogo el piridilo de la piridina (Bruice, 2008, p. 960).

Reacciones de condensación: Son combinaciones de dos o más moléculas o partes de la misma molécula, con la eliminación de moléculas pequeñas, como por ejemplo: agua o alcoholes de bajo peso molecular. Si la reacción se da entre dos elementos separados, la condensación es externa, y si la combinación se da entre dos átomos de la misma molécula, la condensación se denomina interna (Bruice, 2008, p. 878).

Variación de la Conversión: Para el presente estudio, corresponde a la diferencia de la conversión que se obtiene solo por efecto del catalizador de la conversión total. Esta variable mide el efecto del calentamiento sobre conversión de la síntesis (Ballini et al., 2009, p. 4; Loupy, 2003, p. 185).

RESUMEN

Para la síntesis de las cumarinas se seleccionó como reacción modelo la Condensación de Knoevenagel, la cual se puede desarrollar con un horno de radiación microondas (MO) doméstico. Los cuatro compuestos seleccionados fueron: 1,2-Benzopirona, Etil 3-Carboxi Cumarina (**ECC**), 4-Hidroxi Cumarina y 4-Metil Umbeliferona.

El horno de MO utilizado se caracterizó mediante una técnica colorimétrica sencilla, con una solución acuosa de cloruro de cobalto, que permitió establecer las zonas de mayor incidencia de la radiación mediante el cambio de color del papel impregnado con la solución indicada. Esta superficie fue la comprendida en el intervalo radial de 10 a 15 cm del plato giratorio.

La técnica analítica utilizada para la caracterización preliminar de los reactivos y productos fue la espectrofotometría UV-Vis, con la cual se determinó la mejor longitud de onda para la posterior identificación y cuantificación de cada cumarina en la mezcla reactiva resultante mediante la técnica de HPLC.

Por un lado, la 1,2-Benzopirona, la 4-Hidroxi Cumarina y la 4-Metil Umbeliferona no pudieron ser sintetizadas mediante Condensación de Knoevenagel, ni por el método convencional, ni por el método no convencional. Por otro lado, la **ECC** sí fue sintetizada, mediante la reacción modelo, tanto por reflujo como por radiación de microondas.

En la síntesis convencional de **ECC** se alcanzó la mayor conversión con 1 % molar de piperidina y 100 min de reflujo, mientras que en la síntesis no convencional de **ECC** se logró el mejor rendimiento con 2 % molar de catalizador y 1 min de irradiación. Estos resultados permitieron comparar los dos métodos y analizar la influencia de la cantidad de catalizador y del tiempo de irradiación en la conversión.

Mediante este estudio se confirmaron las ventajas tecnológicas de la síntesis por microondas para la **ECC**, puesto que con 1 min de irradiación se obtuvo un 90 % de conversión, mientras que con 100 min de reflujo se alcanzó un 80 %. Además, se evaluaron los costos de los dos métodos, con lo cual se determinó que el monto total disminuye en un 73 % respecto al método convencional bajo las condiciones operativas de la presente investigación.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, el uso de la microonda se ha extendido a varios campos de interés industrial. Uno de ellos es la síntesis orgánica que se ha desarrollado, especialmente vinculada con el área farmacéutica. La aplicación de la MO en esta área permite reducir los tiempos y aumentar el rendimiento de las reacciones. Estas ventajas presentan particular interés cuando los productos a obtenerse tienen un alto valor económico (Ballini et al., 2009, p. 281; Loupy, 2003, pp.1, 430).

A lo largo de la historia se han utilizado ciertas plantas en las cuales existen principios activos que les confieren propiedades medicinales, aromáticas, cosméticas, etc. (Noller, 1968, p. 387). Entre los metabolitos secundarios que se pueden encontrar en algunas plantas están las cumarinas, que hasta hace unas décadas se obtenían solo por extracción con el uso de solventes (Arango, 2010, p. 34). Estos compuestos se conocen por su acción antibacterial, antibiótica, anticoagulante, estrogénica y fotosensibilizadora (Murray, Méndez y Brown, 1982, pp. 25, 32-40).

El uso de la microonda ha permitido sintetizar cumarinas con aumentos de rendimientos y disminución de desechos. Es así que esta técnica no convencional ha favorecido el desplazamiento de las técnicas de extracción, sobre todo en el campo farmacéutico y por la tendencia mundial del uso de tecnologías amigables con el ambiente (Ballini et al., 2009, p. 1).

Por esta razón se planteó esta investigación como parte del Proyecto Semilla PIS-022-2009, "Utilización de la radiación de microonda para la síntesis de cumarinas y compuestos quinolínicos", como un proyecto pionero de síntesis orgánica no convencional en el Ecuador.

1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 CUMARINAS

1.1.1 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

Las cumarinas son lactonas insaturadas, cuyo heteroátomo es el oxígeno. La estructura molecular básica de una cumarina se muestra en la figura 1.1. Las cumarinas son otra clase de compuestos orgánicos del tipo C_6C_3 (Arango, 2010, p. 34), cuyo heteronúcleo se denomina benzo 2-pirona o benzo α -pirona y su formación es clave en la síntesis de ciclación de toda cumarina (Finar, 1975, p. 888).

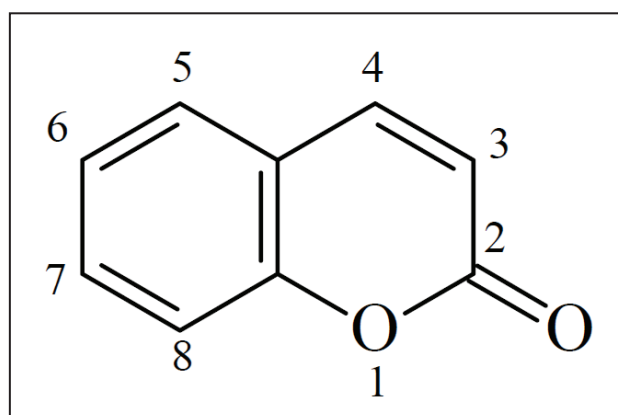


Figura 1.1. Estructura molecular de la Cumarina (1,2-Benzopirona) con su grupo lactona característico
(Arango, 2010, p. 35)

Las cumarinas pertenecen al grupo de los metabolitos secundarios sintetizados por la acción del ácido shikímico mediante el metabolismo intermediario de la función metabólica específica del ácido cinámico (Arango, 2010, p. 34).

En general, las cumarinas presentan las siguientes propiedades físicas:

- a) Se presentan en forma de cristales a temperatura ambiente (Pérez, 2009, p. 1)

- b) Su coloración presenta una gama del blanco al amarillo (Pérez, 2009, p. 1)
- c) Son solubles en metanol, etanol y agua (Lock de Ugaz, 1994, p. 80)
- d) Su estabilidad en solución es alta a menos de 20 °C, mientras que algunas son sublimables con la presencia de bases fuertes como el NaOH (Pérez, 2009, p. 2)
- e) Presentan fluorescencia por efecto de la luz UV a los 325 nm (Arango, 2010, p. 34)

El nombre de cumarinas proviene del término común “Coumarou” referido al haba tonca (*Dipteryx odorata*), árbol tropical sudamericano de cuya semilla se aisló el primer perfume procesado que contenía la 1,2-Benzopirona o Cumarina (Noller, 1968, p. 387).

Las cumarinas biosintetizadas en las plantas son almacenadas en el interior de las vacuolas al igual que los alcaloides, los taninos y los lignanos. Estos metabolitos secundarios se encuentran en plantas superiores y en algunos microorganismos en forma libre, en mezclas o como glicósidos, en todas las partes de la planta desde la raíz hasta las flores, pero principalmente en los frutos y semillas (Arango, 2010, p. 34).

1.1.2 CLASIFICACIÓN

De acuerdo con la naturaleza del sustituyente en las posiciones 3, 4, 6, 7 y 8 del heteronúcleo de la cumarina como se indica en la figura 1.1., las cumarinas se clasifican principalmente de la siguiente manera:

- a) **Cumarinas simples.** Presentan derivados oxigenados en las posiciones 6, 7 y 8 del núcleo bencénico y en las posiciones 3 y 4 del núcleo lactona. Son los derivados (**hidroxilados**, **alcoxilados** y **alquilados**) y glicósidos de la 1,2-Benzopirona. En la naturaleza, un 95 % de las cumarinas poseen un radical oxigenado en la posición 7 (Lock de Ugaz, 2001, p. 53).

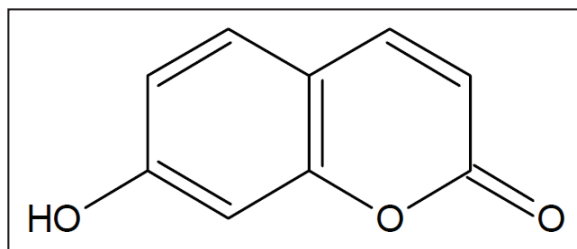


Figura 1.2. Estructura molecular de la Umbeliferona, cumarina simple con un sustituyente oxigenado en la posición 7
(Arango, 2010, p. 35)

- b) **Cumarinas complejas.** Se dividen en furanocumarinas y piranocumarinas, por la posición de fusión del anillo furano y del anillo pirano. Esta división se subclasifica en **lineales**, como las que se indican en las figuras 1.3 y 1.5 o **angulares** como las que se muestran en las figuras 1.4 y 1.6 (Arango, 2010, pp. 36-37).

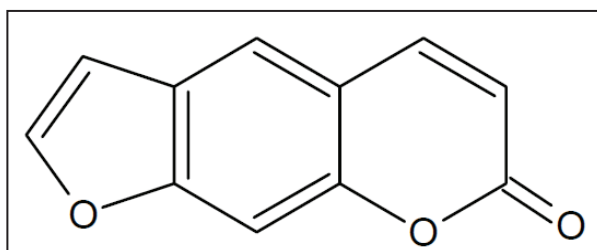


Figura 1.3. Estructura molecular del Sposoleno, furanocumarina lineal
(Arango, 2010, p. 36)

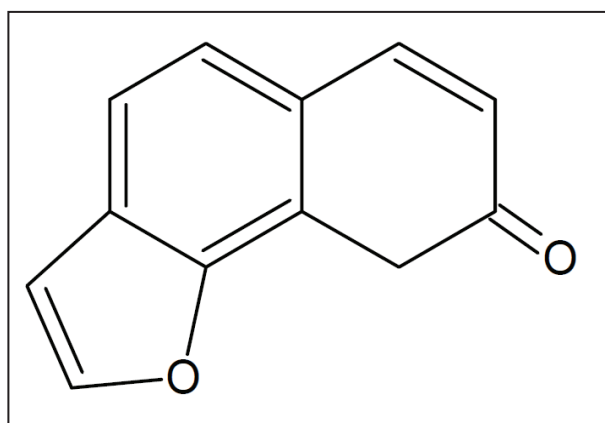


Figura 1.4. Estructura molecular de la Angelicina, furanocumarina angular
(Arango, 2010, p. 36)

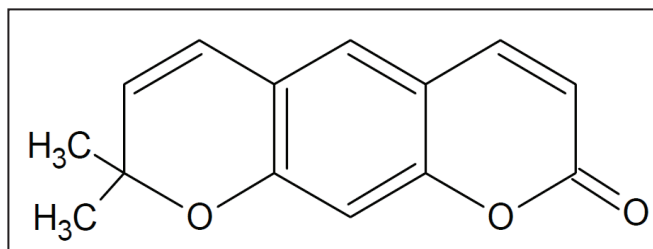


Figura 1.5. Estructura molecular de la Xantiletina, piranocumarina lineal
(Arango, 2010, p. 37)

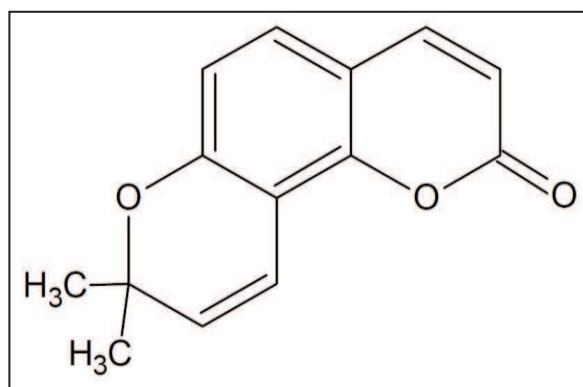


Figura 1.6. Estructura molecular de la Sésilina, piranocumarina angular
(Arango, 2010, p. 37)

- c) **Cumarinas diversas.** Son cumarinas que presentan las variaciones de las cumarinas complejas en el anillo piranósico y furanósico. Se denominan cumarinas preniladas por la presencia de sustituyentes en el anillo pirano o furano como se observa en las figuras 1.7 y 1.8 (Arango, 2010, p. 37; Hall, Rocha y Rodríguez, 2002, p. iii).

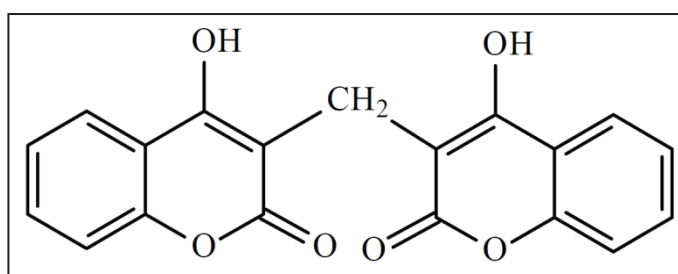


Figura 1.7. Estructura molecular del Dicumarol (bishidroxicumarina), cumarina diversa
(Arango, 2010, p. 38)

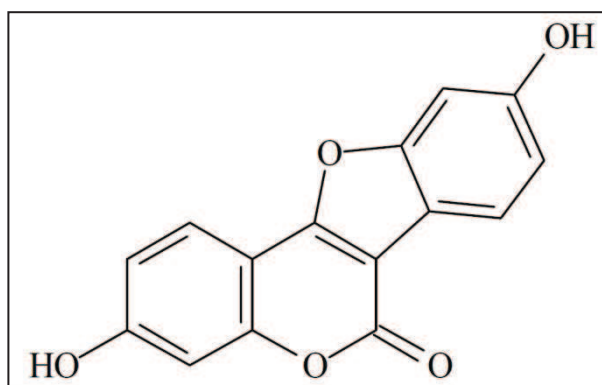


Figura 1.8. Estructura molecular del Coumestrol, cumarina prenilada
(Arango, 2010, p. 38)

1.1.3 USOS

El interés en las cumarinas se originó en los primeros años del siglo XX, cuando granjeros de Norteamérica observaron que su ganado presentaba hemorragias después de comer cierto forraje. Posteriormente, estas plantas fueron analizadas y se determinó que la disminución en la coagulación se debía a ciertas cumarinas presentes en este pasto (Robert, Reyes y Loyola, 1993, p. 217).

Las primeras cumarinas fueron extraídas a partir del trébol dulce y una de las primeras en sintetizarse fue el acenocumarol, que es el ACO más usado en España, puesto que este metabolito secundario constituye el tratamiento de mayor elección para la profilaxis de la enfermedad trombo-embólica en pacientes de alto riesgo (Aguilera, 2002, p. 700).

En la actualidad, las cumarinas son consideradas como principios activos de una serie de medicamentos de gran importancia, como por ejemplo, en el tratamiento posterior a las intervenciones quirúrgicas o en el tratamiento de flebitis y trombosis coronaria (Carretero, 2000, p. 432; Noller, 1968, p. 387).

El interés por las cumarinas se debe al rango de actividad biológica que varias de ellas han mostrado, como se puede observar en la tabla 1.1 donde se presenta un listado de estos metabolitos y su acción biológica (Lock de Ugaz, 2001, p. 50).

Tabla 1.1. Descripción de las algunas cumarinas con sus propiedades útiles y tóxicas

Cumarina	Acción	Cumarina	Acción
Aflatoxinas	Hepatotoxicidad aguda y carcinogenicidad	Dicumarol (<i>Dicumarina</i>)	Anticoagulante y antibacterial
Cumadina (<i>Warfarina</i>)	Anticoagulante y vaso dilatador (raticida)	4-Hidroxi Cumarina	Cardio-estimulador
1,2-Benzopirona	Perfume natural y saborizante (uso cesado)	Furanocumarinas	Fotosensibilizadora (bergapteno y xantotoxina)
1,2-Benzopirona	Inhibidora de la germinación (semillas)	Novobiocina	Antibiótica
Cumestrol	Astrogénica	Surangin A y B	Insecticida

(Arango, 2010, pp. 34-38; Gilchrist, 1995, p. 181; Lock de Ugaz, 2001, pp. 51-52; Noller, 1968, p. 387)

Otra aplicación de las cumarinas fue desarrollada por el científico alemán Richard Willstätter en 1914, quien sintetizó las antocianinas a partir de la 1,2-Benzopirona y del bromuro de fenil magnesio con ácido clorhídrico (Finar, 1980, p. 776). El interés por los pigmentos antociánicos se ha intensificado por sus propiedades antitumorales, antiinflamatorias, antidiabéticas y de agregación de plaquetas, porque las antocianinas permanecen intactas en los mamíferos (Pérez, 2009, pp. 5, 35).

1.1.4 BIOSÍNTESIS DE LAS CUMARINAS

Se han identificado y aislado unas 1 000 cumarinas de fuentes naturales, que son plantas de unas 150 especies distribuidas en casi 30 familias, de las cuales las principales son *Umbeliferae*, *Apiaceae* y *Rutaceae* (Lock de Ugaz, 2001, p. 50).

Estas cumarinas se biosintetizan por derivación del ácido shikímico y por vía del ácido cinámico (Arango, 2010, p. 35). La especificidad del proceso consiste en la hidroxilación del C- α , que produce un rompimiento (β -oxidación) de la cadena

lateral o una isomerización de la cadena y posterior lactonización que genera la Umbeliferona (Lock de Ugaz, 2001, p. 54). Esta reacción se muestra en la figura 1.9.

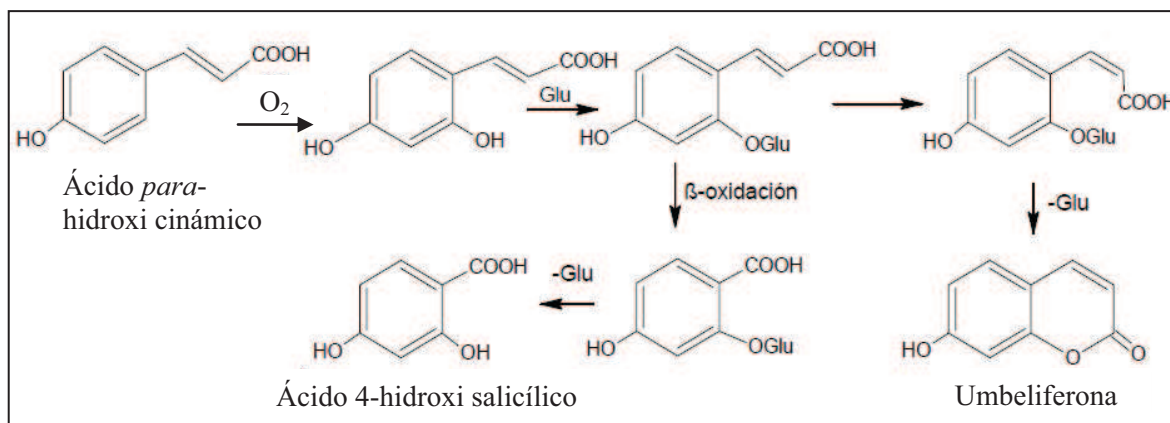


Figura 1.9. Mecanismo de reacción de la biosíntesis de una cumarina simple, la Umbeliferona, desde el ácido shikímico (Arango, 2010, p. 35)

La biosíntesis de las cumarinas simples a partir del ácido shikímico, también ocurre para las llamadas cumarinas piránicas y furánicas. Estas cumarinas complejas pueden ser lineales o angulares, según la posición donde se condense el isopentenil pirofosfato para luego ciclarse y formar el heterociclo, que corresponde a un grupo lactona como el que se muestra en la figura 1.1 (García, González, Márquez y Martínez, 2003, p. 153).

1.1.5 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN

La estructura de las cumarinas permite su identificación mediante espectrofotometría UV-Vis y HPLC-UV (Celeghini, Vilegas y Lanças, 2001, 2do. párrafo). Las cumarinas simples absorben de 274 a 311 nm debido a los anillos bencénico y a la α -pirona (grupo lactona), respectivamente y presentan variaciones según sus sustituyentes (Arango, 2010, p. 35).

La mayoría de las cumarinas presentan sustituciones oxigenadas en la posición 7 y en espectrofotometría UV, esta condición puede generar un desplazamiento de las bandas por la posible conjugación entre el grupo hidroxilo con otros agentes cromóforos (Arango, 2010, p. 34).

Por ello, para diferenciar las cumarinas de las cromonas simples se debe recordar que el grupo lactona de las cumarinas da una fuerte absorbanza a 325 nm mientras que el grupo γ -pirona de las cromonas presenta una mayor absorción entre 240 y 250 nm (Arango, 2010, p. 35; Gilchrist, 1995, p. 180).

Las cumarinas por sus características de estabilidad térmica y sus puntos de ebullición pueden ser separadas por GC y analizadas con MS. Además por su estructura puede analizarse a través de IR y RMN (Bogdal, 1998, 10mo. párrafo).

En la técnica de MS la típica fragmentación de la cumarina base, que sirve para la cuantificación es la que se muestra en la figura 1.10.

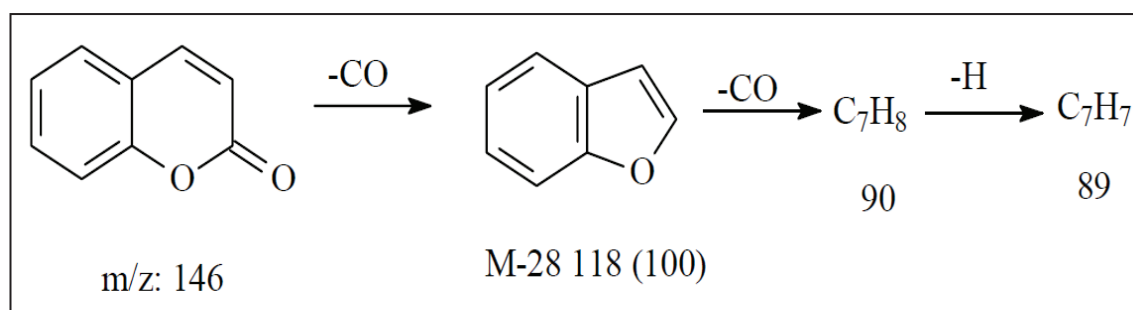


Figura 1.10. Proceso de fragmentación en MS de la 1,2-Benzopirona (Arango, 2010, p. 40)

Para el análisis de las cumarinas por IR, se debe tener presente que el grupo $C=O$ (carbonilo) de la α -pirona (lactona conjugada), cuyo carbono se enlaza con un oxígeno y otro carbono, presenta dos bandas características a $1\ 715$ y $1\ 745\ cm^{-1}$ (Arango, 2010, p. 40).

Los hidrógenos o carbonos de la estructura de la cumarina presentan señales diferentes de ^1H o ^{13}C en el análisis de RMN, según los sustituyentes que posea la molécula (Arango, 2010, p. 40; Martínez, 2002, p. 147).

1.1.6 MÉTODOS DE OBTENCIÓN

En los años 80's los remedios naturales y las plantas medicinales fueron un importante recurso del que disponían los médicos para el tratamiento de ciertas enfermedades. Entre estas plantas se pueden mencionar algunas gramíneas donde se encuentran cumarinas simples (Pérez, 2009, p. 2).

Se ha determinado que las cumarinas son metabolitos secundarios que se encuentran presentes en algunas plantas y microorganismos. Por las importantes aplicaciones asociadas a estos principios activos, desde su descubrimiento, se han investigado métodos para su obtención (Carretero, 2000, p. 433; Noller, 1968, p. 387).

Por ser compuestos que se encuentran en fuentes naturales, existen métodos de extracción, pero la elucidación de su estructura ha permitido que se desarrollen también métodos de síntesis a partir de otros reactivos orgánicos (Arango, 2010, p. 39; Bogdal, 1998, 5to. párrafo).

1.1.6.1 Obtención de cumarinas por extracción a partir de plantas

La técnica de extracción de las cumarinas puede realizarse con material seco y fresco, con solventes de polaridades diferentes, en función de las estructuras químicas que posean los compuestos de interés. La mayoría de las cumarinas son solubles en solventes apolares y pueden cristalizar directamente en ellos por enfriamiento o concentración del solvente (Lock de Ugaz, 2001, p. 53).

En la tabla 1.2, se presenta un listado de algunas cumarinas con su principal fuente natural de extracción.

Tabla 1.2. Algunas cumarinas simples y complejas con la principal fuente natural

Cumarina	Fuente natural	Cumarina	Fuente natural
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavum</i> y <i>A. versicolor</i>	Furanocumarinas	<i>Pimpinella anisum</i> (anís) y <i>Citrus aurantium</i> (naranja amarga)
Cumarina	<i>Mikania glomerata</i> Spreng. (guaco), <i>Lavandula officinalis</i> (lavanda), <i>Justicia pectoralis</i> Jacq. y haba tonca <i>Leguminosae/Fabaceae</i>	Herniarina	Compuesta <i>Lavandula</i> sp., <i>Ruta graveolens</i> , y <i>Artemisia drancunculus</i> L. (estragón)
Dicumarol	<i>Melilotus albus</i> , <i>Leguminosae</i>	Hidrangetina	<i>Hydrangea macrophylla</i> (Hortensia)
Escopoletina	Tabaco, Bella dona <i>Solanaceae</i>	Hidroxicummarinas	<i>Matricaria chamomilla</i> , <i>M. recutita</i> (manzanilla)
Esculetina	Castaño de indias <i>Rosaceae</i>	Umbeliferona	<i>Solanaceae</i> , <i>Thymeliaceae</i>
Franxetina	<i>Apocinaceae</i> (<i>Echites ursuta</i>), <i>Oleaceae</i>	Xantotoxina	<i>Ammi majus</i> , Umbeliferae (apio cimarrón)

(Arango, 2010, pp. 34-38; Celeghini et al., 2001, 2do. párrafo; Hall, Rocha y Rodríguez, 2002, p. 97; Pérez, 2009, p. 88)

Por la baja concentración de las cumarinas en las plantas (< 0,9 % en base seca), la técnica de extracción de estos metabolitos secundarios ha mejorado con la asistencia de equipos microondas adaptados para la extracción con el uso de solventes (Martino, Ramaiola, Urbano, Bracco y Collina, 2006, p. 147).

1.1.6.2 Obtención de cumarinas por síntesis orgánica

Por la creciente demanda de las cumarinas en el área farmacéutica, la industria ha optado por la síntesis de estos principios activos en el laboratorio (Loupy, 2003, pp. 272, 436; Gilchrist, 1995, p. 181), lo cual se justifica por los bajos rendimientos de los procesos de extracción a partir de plantas y por los prolongados tiempos de operación que superan la hora de duración desde la maceración de la materia prima. En general, la cantidad de producto obtenido en los extractos es menor a 700 mg/L, lo que determina que la extracción a partir de

las plantas sea menos competitivo frente a las técnicas de síntesis (Celeghini et al., 2001, 23ro. párrafo; Rodríguez, López y Gil, 2008, 9no. párrafo).

La segunda opción para obtener estos principios activos es mediante reacciones desarrolladas en laboratorios. Se conoce que las cumarinas pueden ser sintetizadas por el reordenamiento de Claisen – Schmidt, la reacción de Perkin, la Condensación de Knoevenagel y la reacción de Pechmann – Duisberg (Bogdal, 1998, 2do. párrafo). La síntesis de las cumarinas de gran interés comercial es un reto para los químicos porque sus reacciones son de heterociclación y se debe cuidar la isomería de los compuestos intermedios que limitan la formación del producto esperado (Finar, 1980, p. 144).

En la actualidad, el método convencional de síntesis a través del calentamiento directo por llama o resistencia eléctrica, se ha sustituido por otras técnicas denominadas “no convencionales” como es el uso de fluidos supercríticos, ultrasonidos y microondas (Díaz, de la Hoz, Langa y Moreno, 1999, p. 23).

Las cuatro reacciones utilizadas para la síntesis de cumarinas que se detallan a continuación son de formación heteronuclear obtenida a partir de un ácido libre, compuesto intermedio inestable que experimenta espontáneamente la ciclación a lactona (Noller, 1968, p. 387); este elemento se denomina ácido cumarínico y es el isómero *cis* de los dos ácidos *o*-hidroxicinámicos posibles (Finar, 1980, pp. 143-144).

1.1.7 REACCIONES PARA LA SÍNTESIS DE CUMARINAS

Las reacciones fundamentales para la síntesis de cumarinas son cuatro: el reordenamiento de Claisen – Schmidt, la reacción de Perkin, la Condensación de Knoevenagel y la reacción de Pechmann – Duisberg, de las cuales tres se detallarán en el presente acápite y, posteriormente, en el subcapítulo 1.2 se describirá la reacción modelo del presente estudio, la Condensación de Knoevenagel (Loupy, 2003, pp. 67, 191).

1.1.7.1 Reacción de Pechmann – Duisberg

La reacción de Pechmann es una adición nucleofílica de compuestos carboxílicos (Loupy, 2003, pp. 83-84); es decir, consiste en la condensación de un fenol con un β -cetoéster, en medio ácido como se muestra en el ejemplo de la figura 1.11. La química de esta síntesis permite que se realice sin usar un disolvente, por la naturaleza de los reactivos principales (Morrison y Boyd, 1990, p. 1 201).

Esta reacción es uno de los métodos más convenientes para sintetizar cumarinas. Los catalizadores usados para la condensación, en este caso, son el ácido sulfúrico, el ácido clorhídrico, el pentóxido de fósforo y el ácido polifosfórico, el cual es muy eficaz (Finar, 1975, p. 889).

La reacción de Pechmann con la modificación de Duisberg presenta ciertas diferencias para aplicarla en la radiación de microondas, la principal, la naturaleza del catalizador. En este caso se usan los heteropoliácidos de estructura Wells-Dawson (Bennardi, Romanelli, Jios, Autino, Baronetti y Thomas, 2007, p. 123).

Además, esta condensación es una vía muy eficiente para obtener las aminocumarinas a partir de *m*-amino fenoles con β -cetoésteres, sin usar un catalizador, la activación se da solo por la microonda (Loupy, 2003, pp. 229-231).

En el siguiente ejemplo de la reacción de Pechmann – Duisberg, el aporte energético inicial es obtenido del calor de disolución del ácido y la posterior energía térmica se debe recibir del exterior. La temperatura recomendada para el proceso de reacción es de 80 °C y la cantidad de catalizador a utilizarse de 5 % molar (Ballini et al., 2009, p. 160).

La figura 1.11, presenta la síntesis de la 4-Metil Umbeliferona a partir del resorcinol o resorcina con el acetoacetato de metilo con un catalizador ácido complejo (UNAM, 2011, 2do. párrafo).

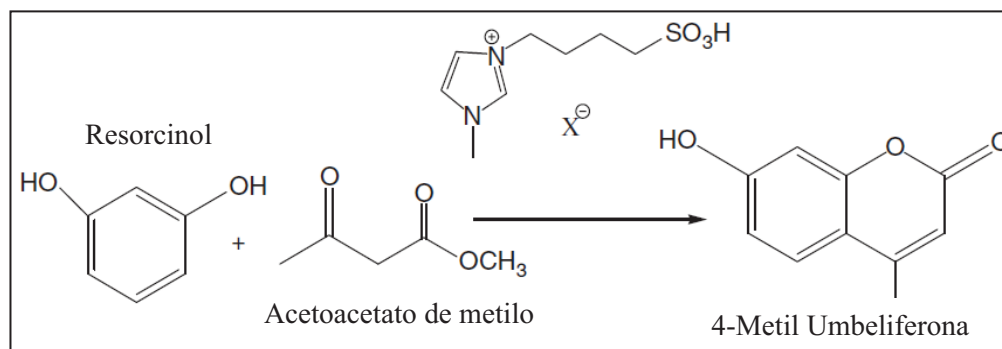


Figura 1.11. Esquema de la reacción de Pechmann para la obtención de la β -Metil Umbeliferona, con el uso del imidazolio-SO₃H funcionalizado ILs (Ballini et al., 2009, p. 160)

1.1.7.2 Reacción de Perkin

La reacción de Perkin es un tipo de condensación aldólica, donde se da el ataque de un carbanión sobre un grupo carbonílico. A diferencia de la de Pechmann, esta es una adición electrofílica y por ello usa una base como catalizador (sal alcalina de ácido); el carbanión se forma por la separación de un hidrógeno en la posición *alfa* con respecto al carbonilo del aldehído y el H- α se activa por la presencia del grupo anhídrido (Morrison y Boyd, 1990, p. 1 063). En la figura 1.12 se muestra un ejemplo de este mecanismo que es la condensación del ácido cinámico.

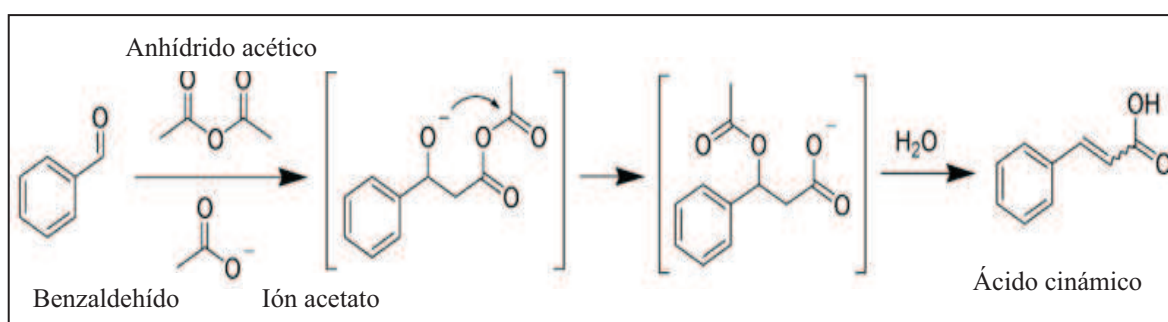


Figura 1.12. Mecanismo de la condensación del ácido cinámico mediante la Reacción de Perkin, con un catalizador básico (Bruice, 2008, p. 900)

El ácido cinámico, principal precursor del isómero formador de las cumarinas (Lock de Ugaz, 2001, p. 52), se obtiene mediante la condensación del

benzaldehído con el anhídrido acético en presencia del acetato de sodio; mecanismo que corresponde a la reacción de Perkin y se considera el método más importante para su formación como se muestra en la figura 1.12 (Potapov y Tatarinchik, 1983, p. 272).

La 1,2-Benzopirona se puede preparar mediante la reacción de Perkin con el uso del salicilaldehído como reactivo principal (Noller, 1968, p. 387), a este se adiciona el anhídrido acético y el acetato de sodio y se forma una sal compleja entre el sodio y el grupo activo del aldehído aromático. Finalmente, se libera el ácido cumarínico de sus sales gracias a la acción del catalizador básico (acetato de sodio). El isómero *cis* del ácido *o*-hidroxicinámico es inestable y termina ciclándose para formar el grupo lactona propio de la cumarina (Finar, 1975, p. 889). La reacción se realiza durante 1 h y 20 min de reflujo, aproximadamente, con el uso de una mezcla etanol-agua como solvente. La temperatura de reacción se encuentra entre 135 y 155 °C por 1 h. Después de su enfriamiento, el producto se recupera por recristalización (Austin, 1988, p. 578).

1.1.7.3 Reordenamiento de Claisen – Schmidt

La reacción de Claisen, al igual que la de Perkin, Knoevenagel, Doebner y Pechmann, es un tipo de condensación aldólica. El grupo carbonilo proviene del grupo funcional éster y la base fuerte que se usa como catalizador es un hidróxido alcalino, cuya concentración puede oscilar entre 2 y 3 % (Morrison y Boyd, 1990, p. 1 043). Por ejemplo para la síntesis no convencional por MO, el uso del NaOH permite alcanzar conversiones mayores al 80 % (Loupy, 2003, p. 53) con agua como solvente y potencializador del calentamiento por irradiación (Ballini et al., 2009, p. 192).

La condensación de Claisen se da por ataque nucleofílico de un carbanión sobre un carbono electrónicamente deficiente, que da lugar a una reacción de sustitución, cuyo resultado es la unión del carbono *alfa* de una molécula al carbono carbonílico de otra y cuya reactividad depende de cuan ácido sea el H- α

para generar la carga negativa del carbanión ubicado por la resonancia del grupo carbonilo con mayor electronegatividad (Bruice, 2008, p. 877).

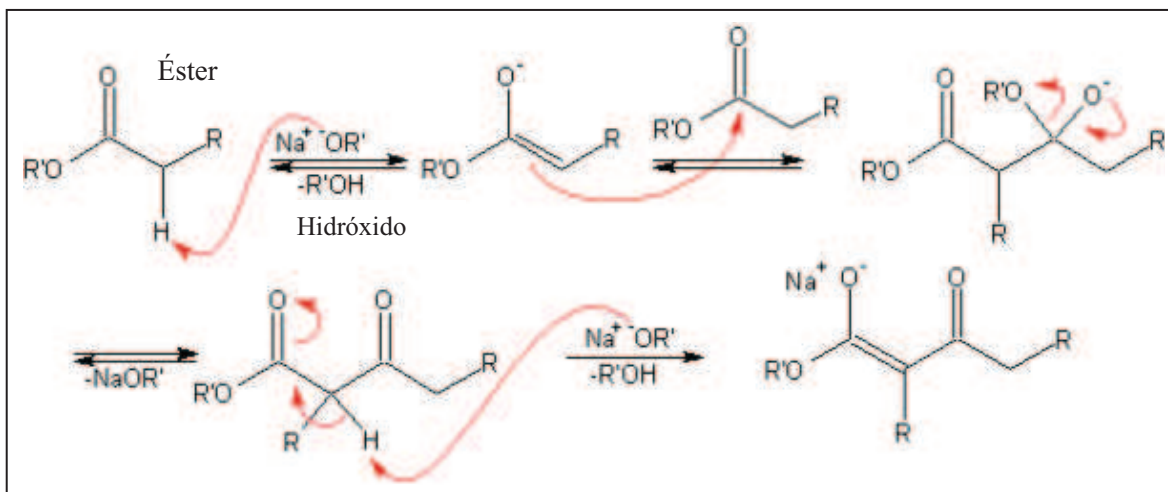


Figura 1.13. Mecanismo del Reordenamiento de Claisen - Schmidt entre un éster y una cetona o aldehído en presencia de una base fuerte (Bruice, 2008, p. 876)

La formación del carbocatión genera una fuerte reacción de competencias entre el reactivo y el catalizador por la formación de la sal o alcóxido correspondiente, sobre todo por la fuerza del hidróxido de sodio. Esta competencia limita la formación del ácido libre generador de la ciclación, de manera que la ciclación se inhibe a valores altos de pH (Morrison y Boyd, 1990, p. 903). Por ejemplo, en la figura 1.14 se indica la clásica condensación de Claisen para la formación de un β-cetoéster.

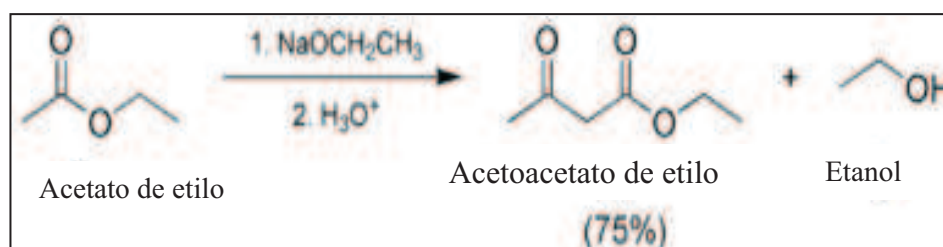


Figura 1.14. Esquema de la condensación de Claisen para la síntesis del acetoacetato de etilo y etanol como subproducto en medio ácido con etóxido de sodio como catalizador (Morrison y Boyd, 1990, p. 906)

Para la formación de las alil-cumarinas y las hidroxifurano-cumarinas, se sigue la vía del reordenamiento de Claisen – Schmidt, mediante el uso del catalizador básico conocido como la N-metil formamida (NMF). Este método permite generar cumarinas complejas a partir de otras denominadas diversas (Loupy, 2003, p. 53). En este caso en particular, el grupo activo es el grupo α -metileno de la cetona cíclica presente en el grupo lactona de las cumarinas (Ballini et al., 2009, p. 223).

1.2 CONDENSACIÓN DE KNOEVENAGEL

En el acápite 1.1.7 se citaron tres posibles reacciones para sintetizar cumarinas. En el presente trabajo se seleccionó la cuarta posibilidad que corresponde a la Condensación de Knoevenagel (El Khatib et al., 2006, p. 2). Esta reacción permite la síntesis de cumarinas mediante la ciclación del grupo lactona con el uso de salicilaldehído o sus derivados y acetato de etilo o sus derivados como reactivos y piperidina como catalizador orgánico básico (Bogdal, 1998, 4to. párrafo), en medio de sílica gel como soporte inerte (De la Cruz, Díez, Loupy y Langa, 1996, p. 113). Para el método de calentamiento por reflujo se utiliza etanol como solvente (Austin, 1988, p. 579).

La reacción de Knoevenagel es una condensación entre un grupo metileno activo de un aldehído y un éster (De la Cruz et al., 1996, p. 113). Al igual que toda condensación aldólica, esta reacción se produce por el ataque de un carbanión que se forma por la separación de un H- α , con respecto al carbonilo del grupo funcional aldehído, que se activa por la presencia del grupo funcional éster. La base que se usa como catalizador es de origen orgánico como la dietil amina, la piridina o la piperidina (Ballini et al., 2009, p. 113).

Para entender la diferencia que existe con las condensaciones aldólicas antes citadas, se presenta un esquema simplificado de la reacción de Knoevenagel en la figura 1.15. En esta figura se pueden observar los principales reactivos que permiten la formación de las cumarinas con radicales en las posiciones 3, 7 y 8. Según el sustituyente se da origen a varios tipos de cumarinas simples como las

amino-cumarinas, las carboxi-cumarinas, las nitrilo-cumarinas y nitro-cumarinas (Bogdal, 1998, 2do. párrafo).

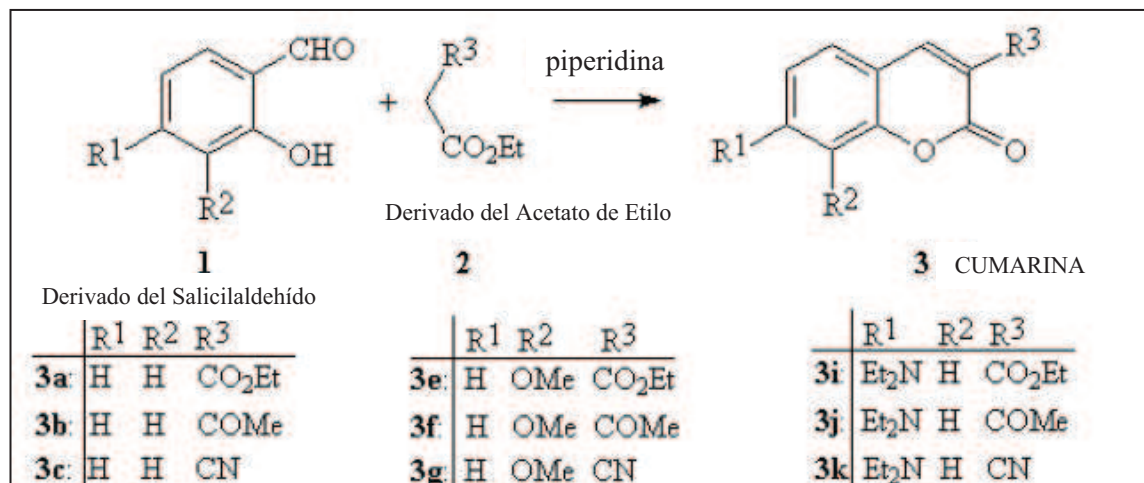


Figura 1.15. Esquema de la síntesis de cumarinas por Condensación de Knoevenagel (Bogdal, 1998, 5to. párrafo; Loupy, 2003, p. 127, 192)

La Condensación de Knoevenagel puede mejorarse a través del uso de un soporte de sílica gel funcionalizada con grupos aminos, medio catalítico que evitaría el uso de la piperidina o de la piridina, para la técnica pura denominada “síntesis libre de solvente”. Para el método no convencional de síntesis por MO, se prefiere desarrollar la reacción en un medio seco, lo cual confiere este tipo de soporte que además permite aumentar la seguridad de operación. A pesar de que la conversión alcanzada es menor a la obtenida con el uso directo del catalizador, se podrían aumentar los tiempos de operación para un estudio más detallado de la cinética de la reacción (De la Cruz et al., 1996, p. 1 115).

En el caso de utilizar un solvente, tanto para la síntesis por la técnica convencional de reflujo como por la no convencional con radiación de microondas, es necesaria la elección de un solvente que facilite la transferencia de energía por sus propiedades calóricas. Se ha demostrado que la reacción mejora con el uso de etanol frente a otros solventes como el xileno o el éter di-butílico (Loupy, 2003, pp. 65-69).

1.2.1 MODIFICACIÓN DE DOEBNER

La Condensación de Knoevenagel puede presentar ciertas variantes en función de la estructura química del producto a sintetizarse o las condiciones operativas (Loupy, 2003, p. 282). Por un lado, la Modificación de Doebner cambia uno de los reactivos, en vez de usar un éster, se desarrolla con un ácido carboxílico. Por otro lado, se usa un catalizador menos básico como es la piridina (amina terciaria aromática) respecto a la piperidina (amina secundaria cíclica) (Bruice, 2008, pp. 959-961).

Además, la Modificación de Doebner presenta una descarboxilación y eliminación por efecto de una amina como catalizador, es decir, la reacción se produce entre un ácido mono o di-carboxílico con un aldehído alifático o aromático, en presencia de piridina, generalmente (Organic Chemistry Portal, 2007, 3er. párrafo). En la figura 1.16 se pueden observar las diferencias para la variante de Doebner.

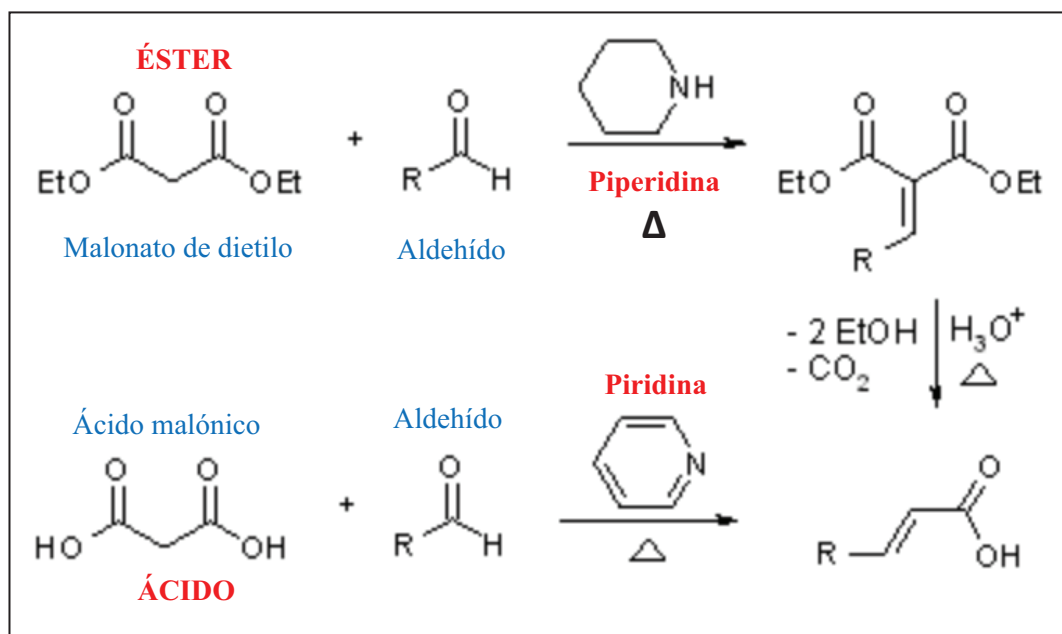


Figura 1.16. Comparación entre la Condensación de Knoevenagel simple y la misma con la Modificación de Doebner

(Organic Chemistry Portal, 2007, 1er. párrafo)

1.2.2 MECANISMO DE LA REACCIÓN

La Condensación de Knoevenagel es una reacción clásica de sustitución nucleofílica, pero el grupo funcional éster puede estar reemplazado por el grupo funcional carboxílico (Modificación de Doebner) como se indicó en la figura 1.16 (El Khatib et al., 2006, p. 2). La reacción se da entre el grupo metileno activo del éster o ácido (derivado del acetato de etilo) y un aldehído (alifático o aromático). El ataque del carbanión se da por la separación del H- α (respecto al carbonilo del grupo funcional aldehído) que se activa por la presencia del carboxilo (del éster o ácido). La base que se usa como catalizador es de origen orgánico (Organic Chemistry Portal, 2007, 8vo. párrafo).

El mecanismo de reacción de la Condensación de Knoevenagel es complejo porque presenta varios procesos intermedios de transposiciones (Kerrigan, 2001, 1er. párrafo). Esta reacción de ciclación heteronuclear presenta isomería y reacciones paralelas que compiten (Noller, 1968, p. 387). Por un lado, se forma el ácido cumarínico que es el isómero *cis* y por otro lado, el ácido cumárico que es el isómero *trans* como se observa en la figura 1.17. De los ácidos *o*-hidroxicinámicos posibles solo el ácido cumarínico, por su estructura espacial puede formar el grupo lactona para obtener el producto esperado (Finar, 1980, p. 143).

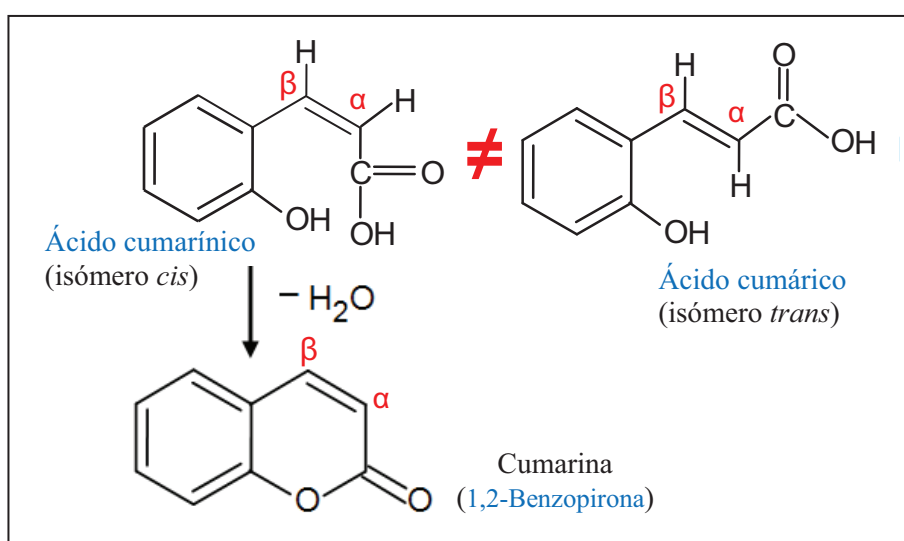


Figura 1.17. Estructura molecular de los ácidos *o*-hidroxicinámicos, isómeros *cis* y *trans*, ácido cumarínico y ácido cumárico (Finar, 1980, p. 144)

El efecto del solvente y el uso de un soporte son dos factores importantes en la cinética de la reacción que no influyen en el mecanismo de la misma (McKillop y Young, 1979, p. 401).

Para facilitar la comprensión de la reacción, se presenta en la figura 1.18 un mecanismo de reacción con cuatro pasos importantes.

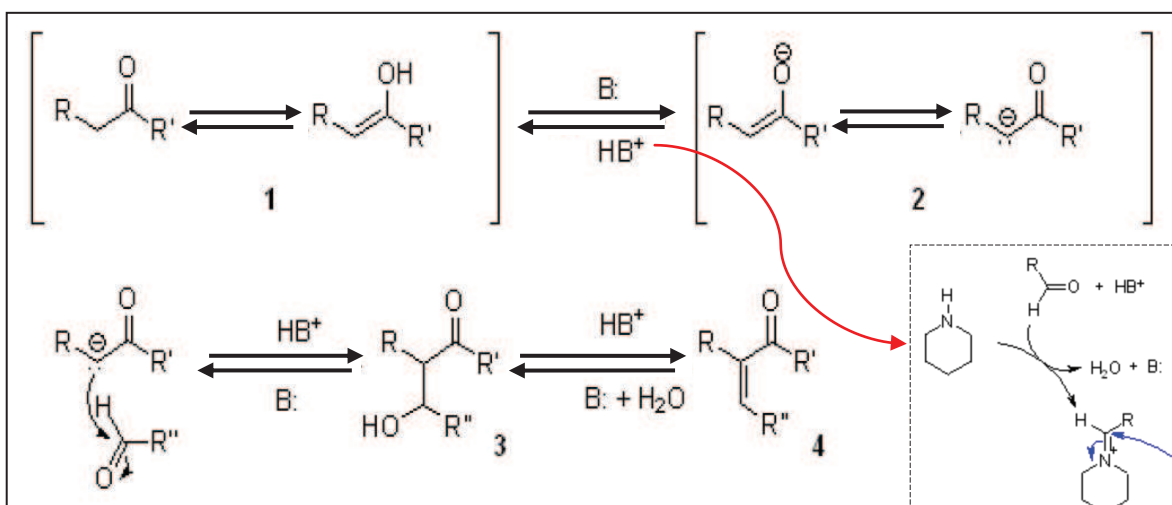


Figura 1.18. Esquema simplificado de un mecanismo de reacción posible de la Condensación de Knoevenagel

(El Khatib et al., 2006, p. 2; Organic Chemistry Portal, 2007, 5to. párrafo)

La propuesta de reacción que se presenta parte de un aldehído con un éster (o ácido carboxílico – para Doebner) en presencia de un catalizador básico y su proceso se detalla de la siguiente manera:

Primer paso (1). La base ataca al éster o ácido en la posición del carbonilo y se forma un enol intermedio.

Segundo paso (2). El enol reacciona con la base para formar el carbanión que se estabiliza con el ácido débil.

Tercer paso (3). El aldehído es atacado por el carbanión y el aldol resultante se produce en paralelo con la formación de una sal derivada de la base usada.

Cuarto paso (4). La condensación aldólica final se da por la eliminación inducida por la base (Kerrigan, 2001, 2do. párrafo; Organic Chemistry Portal, 2007, 11vo. párrafo).

En un inserto de la figura 1.18 se presenta una variación en el mecanismo, cuando la piperidina actúa como un catalizador orgánico, que implica la formación de una imina intermedia o su sal correspondiente, como receptor para la formación del carbocatión y carbanión, respectivos (El Khatib et al., 2006, p. 6).

1.3 SÍNTESIS DE CUMARINAS POR MICROONDAS

La irradiación de microondas es un método alternativo para entregar la energía a una reacción (Loupy, 2003, p. 1). La MO genera una calefacción dieléctrica que utiliza la capacidad que tienen ciertos elementos sólidos o líquidos para transformar en calor, la energía electromagnética recibida. En química, esta manera de convertir energía *in situ* es muy atractiva, puesto que su magnitud depende de la naturaleza de las moléculas a utilizarse y permite introducir una cierta selectividad en las reacciones (Díaz et al., 1999, p. 26).

En bibliografía se citan investigaciones que indican, por ejemplo, un aumento en la conversión de hasta 50 % respecto a la alcanzada por reflujo y una disminución mínima en los tiempos de 90 % con el uso de sílica gel como soporte de la reacción. Estos resultados dependen del solvente usado por sus propiedades dieléctricas (Bennardi et al., 2007, p. 123; De la Cruz et al., 1996, p. 1 115).

1.3.1 RADIACIÓN DE MICROONDAS

La región de la radiación de microondas en el espectro electromagnético está ubicada en longitudes de onda desde 1 cm hasta 1 m y frecuencias entre 30 GHz y 300 MHz (Díaz et al., 1999, p. 24).

En la figura 1.19, se presentan los efectos de cada tipo de onda con la tendencia de la constante dieléctrica (ϵ') y el factor de pérdida dieléctrica (ϵ'') (Kingston y Jassie, 1988, p. 9). Se observa la acción de la microonda, sobre las moléculas, que produce una rotación; este efecto favorece los choques activos necesarios para el desarrollo de una reacción (Loupy, 2003, pp. 5-8).

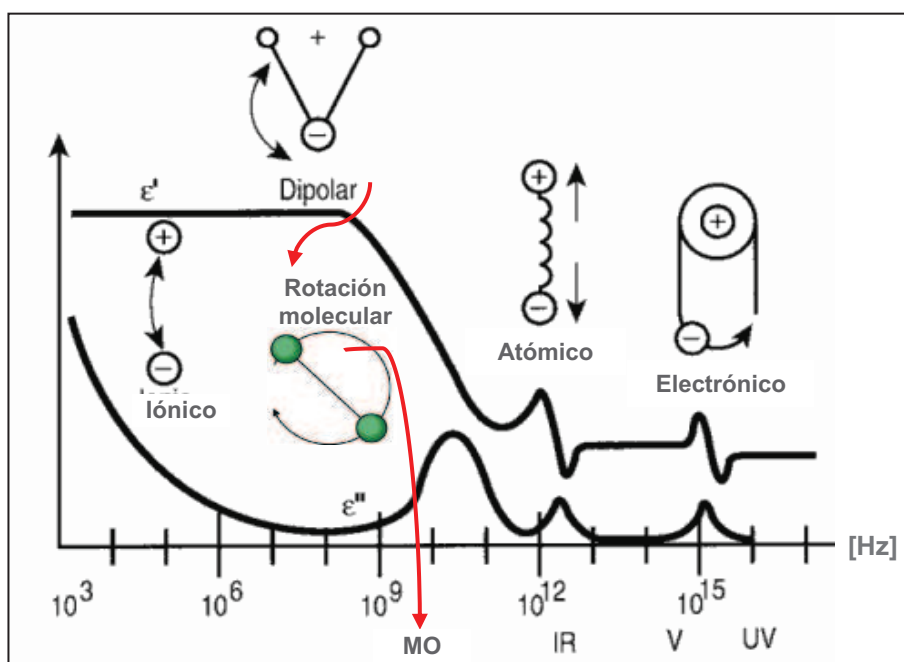


Figura 1.19. Diagrama del espectro electromagnético: tipo de onda con su frecuencia y acción, y la tendencia de ϵ' y ϵ''
(Kingston y Jassie, 1988, p. 8)

En la figura 1.19, se presentó la tendencia de las constantes dieléctricas (ϵ' y ϵ'') y en la tabla 1.3 se citan los valores correspondientes a ciertas sustancias con la magnitud del factor de disipación ($\tan \delta = \epsilon''/\epsilon'$). El valor de este factor indica la facilidad de cada material de ser calentado por la radiación de microondas. Valores de la relación ϵ''/ϵ' superiores a 1×10^{-4} indican una fácil susceptibilidad al calentamiento por la energía de la MO (Kingston y Jassie, 1988, p. 12).

De la tabla 1.3 se puede indicar que por irradiación con MO el metanol es el más susceptible a elevar su temperatura, mientras que el heptano no va a sufrir calentamiento.

Tabla 1.3. Permisividad dieléctrica y factores de dispersión a 3 GHz y 25 °C de ciertas sustancias

Material	ϵ'	ϵ''	$\tan \delta = \epsilon'' / \epsilon' \times 10^4$
Hielo	32,7	$2,880 \times 10^{-3}$	9
Agua	76,7	12,042	1 570
NaCl 0,1M	75,5	18,120	2 400
Metanol	23,9	15,296	6 400
Etanol	6,5	1,625	2 500
Tetraclorometano	2,2	$8,8 \times 10^{-4}$	4
Heptano	1,9	$1,9 \times 10^{-4}$	1

(Díaz et al., 1999, p. 24; RSEQ, 1999, p. 24)

1.3.2 HISTORIA DEL HORNO MICROONDAS

El objetivo general de presentar el avance cronológico del horno microondas es establecer la línea de evolución de este instrumento y proyectar los beneficios de esta técnica no convencional (Loupy, 2003, pp. 2-3).

- a) En 1945, el horno microondas fue inventado por el físico norteamericano Percy Spencer quien descubrió, por casualidad en su laboratorio, que al colocar su bocadillo sobre un emisor de ondas cortas, este se calentaba muy rápidamente (Loupy, 2003, pp. xix, 2).
- b) En 1952, la empresa Raytheon creó el primer horno comercial con el cual se empezaron a realizar experimentos, pero por su gran costo inicial se usó en las cocinas de los grandes hospitales y del ejército (Loupy, 2003, p. 2).
- c) En 1967, el primer microondas doméstico apareció en los Estados Unidos con un precio comercial más asequible y de dimensiones adecuadas para un cuarto de cocina convencional (Loupy, 2003, p. 2).
- d) La difusión del uso del microondas doméstico tuvo lugar entre los años 70's y 80's, como resultado de la aplicación de la tecnología japonesa, e incluso,

las primeras aplicaciones en la industria se realizaron con el horno doméstico (Loupy, 2003, p. 2).

- e) En 1987, André Loupy inició sus estudios en la síntesis orgánica con la aplicación del microondas y hasta antes de los años 90's, solo un grupo limitado de científicos habían realizado experimentación en microondas (Díaz et al., 1999, p. 23; Loupy, 2003, pp. xix-xx).
- f) Desde los años 90's, se han realizado una serie de estudios con el objeto de probar diferentes mecanismos de reacción, diversos catalizadores y medios facilitadores, tanto soportes inertes como solventes. No obstante, la aplicación de la MO aún se limita a ensayos a escala de laboratorio (Loupy, 2003, pp. xix, 2; RSEQ, 1999, p. 23).
- g) Actualmente, existen aplicaciones de la radiación de MO en la industria, por constituir un método rápido, cómodo y barato con una amplia aplicación en el área farmacéutica; campo que representa grandes beneficios económicos (Díaz et al., 1999, p. 23; Loupy, 2003, pp. 1, 373, 480).

Esta técnica no convencional aplicada a la síntesis orgánica tiene algunas ventajas relacionadas con la disminución de tiempos, el aumento de rendimientos y la reducción de costos. Por estas razones existe todavía un campo muy amplio por investigar en esta área (Loupy, 2003, p. 1; Ballini et al., 2009, pp. 280-285).

1.3.3 FUNDAMENTOS DEL FUNCIONAMIENTO DEL HORNO DE MO

En la figura 1.20, se presenta un diagrama donde se comparan dos métodos de calentamiento, un convencional que corresponde al baño de aceite y un no convencional que es la irradiación con microondas. Se observa que en el proceso convencional, la transferencia de calor se inicia desde el exterior del cuerpo y las pérdidas de calor aumentan, mientras que para el proceso no convencional, el calentamiento parte desde el seno de la sustancia (Díaz et al., 1999, p. 25).

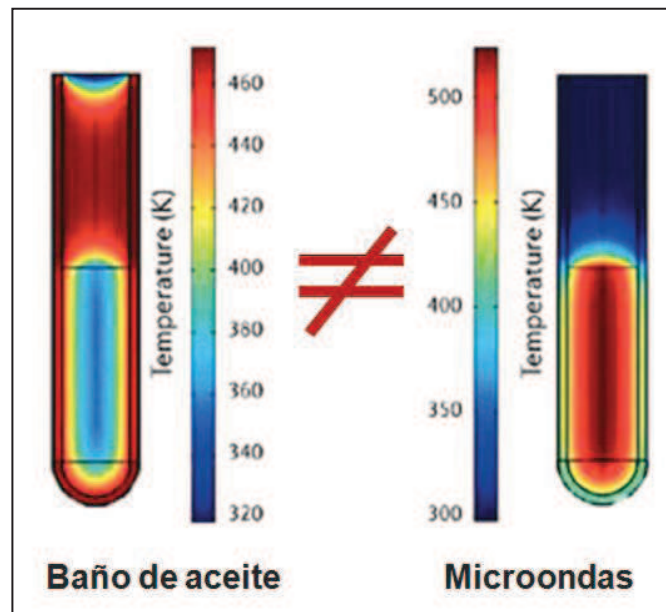


Figura 1.20. Diagrama comparativo entre el calentamiento producido por el baño de aceite y por la radiación de microondas (Kingston y Jassie, 1988, pp. 16-17; RSEQ, 1999, p. 25)

En el espectro electromagnético de la figura 1.19, se indicó que el intervalo de frecuencia de la MO se encuentra entre 30 GHz y 300 MHz, que corresponde a un rango de longitud de onda (λ) dividido para las transmisiones de RADAR de 1 a 25 cm y para las telecomunicaciones de 25 cm a 1 m (RSEQ, 1999, p. 23; Tripti, Jain, Pandey, Vyas y Shukla, 2009, p. 19).

Para los hornos de MO domésticos y para otras aplicaciones industriales de este mismo principio, la frecuencia de la radiación de microondas está regulada en 2,45 GHz ($\lambda = 12,2$ cm), esto implica una penetración de 1 pulgada o 2,54 cm y una energía transmitida de 0,13 cal/mol (Kingston y Jassie, 1988, p. 20).

El funcionamiento del horno microondas se basa en dos componentes principales: un generador (magnetron) y un aplicador (guía de la onda), cuya conexión permite que el horno trabaje en DC (RSEQ, 1999, p. 24).

1.3.3.1 Generador de la microonda

La microonda es generada por un magnetrón que es una lámpara de alta frecuencia, esta parte del horno tiene la función de transformar la energía eléctrica en microondas (Loupy, 2003, pp. 19-20). El generador consiste en un cátodo y un ánodo, separados por un alto vacío por una diferencia de potencial elevada de 4 kV, que está colocado en un campo magnético axial (Díaz et al., 1999, p.24). Los electrones se emiten desde el cátodo y se aceleran hasta el ánodo mediante el potencial DC entre ellos. El campo magnético hace que los electrones sigan trayectorias con formas de curvas espirales, que se alejan del cátodo (Loupy, 2003, p. 19).

En general, el ánodo tiene un número par de cavidades (8) cada una se comporta como un circuito regulado con un final abierto. Cada cavidad actúa como un oscilador eléctrico que da una frecuencia específica y la energía de los electrones se convierte en energía de radiofrecuencia en cada una. La eficiencia del magnetrón es del orden del 60 % (Díaz et al., 1999, p. 26; RSEQ, 1999, p. 24).

En la figura 1.21 se puede observar el magnetrón, normalmente usado, con sus principales partes: la cavidad, el ánodo, el cátodo y el espacio de interacción de los electrones (Díaz et al., 1999, p. 26).

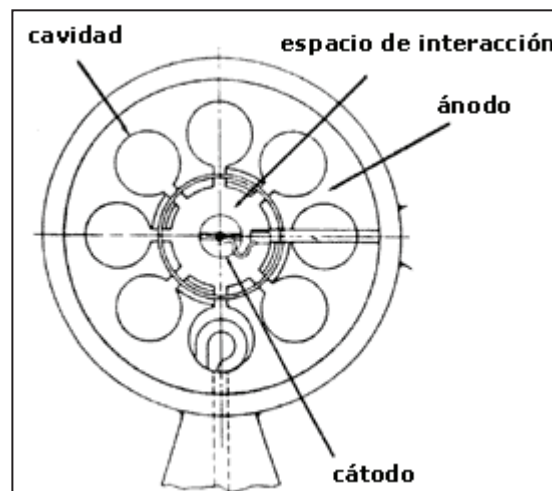


Figura 1.21. Esquema de un magnetrón y sus cuatro partes principales (Kingston y Jassie, 1988, p. 18)

1.3.3.2 Aplicador de la microonda

El aplicador transfiere la energía electromagnética al material a irradiar. Su diseño está asociado al campo de aplicación. Este sistema comprende: una guía de ondas, la cavidad del microondas, un agitador, un dispositivo de circulación y la placa giratoria (Díaz et al., 1999, p. 26).

La energía de la radiación de microondas se produce por el magnetrón, luego se propaga por una guía de ondas e ingresa a la cavidad del microondas, donde un agitador y la placa giratoria distribuyen la energía entrante en varias direcciones. La guía de ondas está construida de material reflectivo como el metal y está diseñada para dirigir la microonda a la cavidad del horno sin alteración (Kingston y Jassie, 1988, p. 22).

1.3.3.3 Recipientes para la microonda

La cerámica, el plástico o el vidrio son materiales transparentes a la microonda, por ello son los materiales más usados como recipientes para la aplicación de la radiación de microondas. Por otro lado, el metal es totalmente reflectivo a la microonda y actúa como un espejo, refleja este tipo de onda contra las paredes del interior del horno, con el peligro de estropear el aparato (Kingston y Jassie, 1988, p. 23). Esa es la razón principal por la cual no se pueden introducir recipientes metálicos dentro de un microondas.

En la tabla 1.4 se observan los factores de dispersión dieléctrica de materiales sólidos, que permiten escoger el material adecuado para la fabricación de los reactores de microondas o vasos de digestión para extracciones con esta técnica. A diferencia de los solventes presentados en la tabla 1.3, aquí el material ideal es aquel que posee el menor valor del cociente ϵ''/ϵ' o magnitud de la $\tan \delta$ (Kingston y Jassie, 1988, p. 25).

Tabla 1.4. Factores de dispersión de materiales sólidos a 25 °C y una frecuencia de 3 GHz

Material	$\epsilon''/\epsilon' \times 10^4$
Boro silicato	10,6
Cerámica F-66	5,5
Nylon 66	128,0
Poliestireno	3,3
Polietileno	3,1
Teflón PFA	1,5

(Kingston y Jassie, 1988, p. 24)

El diseño de los reactores puede ser de dos tipos: digestores abiertos y digestores cerrados. El primer tipo de reactores se usa para un sistema que necesite la recirculación continua de solvente y el segundo tipo de reactores se usa para evitar pérdidas de elementos volátiles o manejar altas presiones por el vapor generado (Kingston y Jassie, 1988, p. 25).

1.3.4 APLICACIONES DE LA RADIACIÓN DE MICROONDAS

Los usos más importantes de la microonda, se presentan en el siguiente listado (RSEQ, 1999, p. 23):

- a) Digestión ácida con microondas para el análisis elemental
- b) Extracción asistida por microondas con solventes
- c) Desorción de sólidos
- d) Descontaminación y recuperación de suelos
- e) Recuperación de petróleo
- f) Vitricación de basura radiactiva
- g) Aplicaciones en reacciones de catálisis
- h) Síntesis de compuestos organometálicos y de coordinación
- i) Sinterización de materiales cerámicos
- j) Síntesis inorgánica, orgánica y de polímeros

Para todos los procesos antes citados, se requieren ciertas condiciones como el uso de un solvente apropiado, de la cantidad recomendada de material y de un reactor que se ajuste a las condiciones del proceso (Díaz et al., 1999, p. 27).

El uso del microondas ha permitido viabilizar muchas reacciones químicas clásicas en las que el factor térmico representaba una limitación. Esta técnica permite un ahorro de tiempo y una mejora del rendimiento (Kingston y Jassie, 1988, p. 27). La activación generada por la microonda para las reacciones ofrece una ventaja adicional que es la selectividad de formación de ciertos productos (Bogdal, 1998, 6to. párrafo).

Un uso particular en el área farmacéutica es la síntesis de ciertos fármacos que se marcan isotópicamente (con ^{11}C , ^{18}F y ^{122}I) cuyo límite es la vida media de los isótopos usados, por ello es crucial el tiempo de reacción de estos procesos. La aplicación de la MO representa una solución ideal porque el tiempo puede ser 20 veces menor con una doble radiactividad del producto final (Díaz et al., 1999, p. 27).

Otro uso de esta técnica no convencional corresponde a la descontaminación y recuperación de suelos donde se aplica el efecto de la calefacción volumétrica que se transmite desde el interior hasta el exterior de la muestra. Este fenómeno da selectividad al proceso de Desorción, porque de la mezcla contaminante del suelo solo los elementos polares absorberán la MO (RSEQ, 1999, p. 24).

Esta técnica no convencional se considera ambientalmente amigable porque permite que ciertos soportes se reciclen, si son aislantes frente a la MO y permite aumentar el rendimiento de ciertos reactivos sin usar solventes o catalizadores altamente contaminantes como, por ejemplo, ácidos minerales (Díaz et al., 1999, p. 23). Aún existen ciertos resultados no entendidos, que se obtienen por la MO, en la cinética y productos de determinadas reacciones. Por ello, varios autores postulan una teoría, aún no comprobada del todo, que se denomina "efecto microondas" (RSEQ, 1999, p. 26).

1.3.5 EFECTO MICROONDAS

Este efecto podría explicar el aumento de la reactividad o de la selectividad de una serie de reacciones que no se limita al aumento de la temperatura. Si el calentamiento del sistema se da de manera convencional o no convencional, la energía interna se puede distribuir en la traslación, rotación o vibración de las moléculas. Si el principio de la variación de energía interna se aplica indistintamente, no se explica la diferencia cinética entre reacciones desarrollada por irradiación y por reflujo con la misma temperatura (Loupy, 2003, pp. 21, 103).

Otros efectos de la MO son el aumento de la agitación térmica de los sólidos y la existencia de puntos calientes en las muestras irradiadas con MO, lo que da lugar a zonas en las que la temperatura se incrementa respecto a las zonas vecinas y es mayor a la temperatura macroscópica. Este sobrecalentamiento es riesgoso en el caso de ciertos solventes polares porque su temperatura puede ser superior al punto de ebullición (Díaz et al., 1999, p. 25).

El “efecto microondas” permite mejorar la quimio-selectividad y estero-selectividad de varios procesos, cambios que se alcanzan solo con el calentamiento por MO y no se logran con el método clásico (RSEQ, 1999, pp. 25-26). La selectividad de la MO permite, en reacciones competitivas, aumentar la cinética de una de ellas y minimizar a la otra, sobre todo por la rapidez del calentamiento, efecto conocido como selectividad inducida. Con el método convencional, lo que se logra es una mezcla resultante de los productos de las reacciones, situación denominada como inversión de la selectividad (Pagnotta, Nolan y Kim, 1992, p. 599).

Cuando se utiliza un horno de MO en un laboratorio es importante que se pueda valorar si existen o no fugas del calentamiento, durante el desarrollo de los experimentos. Estos equipos pueden ser modificados con un sistema de reflujo de agua que sirva como purga de la energía de irradiación en exceso (Pagnotta et al., 1992, p. 599). Además, estos hornos pueden tener un control de potencia y de temperatura para comprender mejor la interacción entre la MO y la materia irradiada (RSEQ, 1999, p. 27).

1.4 ANÁLISIS POR HPLC

El levantamiento de la técnica de análisis es un proceso fundamental para desarrollar toda investigación (Lock de Ugaz, 1994, p. 81). Por ello, se presenta una serie de detalles teórico-prácticos necesarios para comprender los pasos realizados en la ejecución del presente trabajo. El primer paso, antes de seleccionar un método de análisis, es conocer la estructura de los compuestos de interés e identificar si poseen grupos cromóforos, que permitan el uso de técnicas de espectrofotometría UV-Vis o HPLC con detector UV (Celeghini et al., 2001, 6to. párrafo).

Las mezclas de compuestos que presentan superposición de bandas son un limitante para la espectrofotometría UV-Vis, por ello se requiere de técnicas más especializadas como lo es la cromatografía, que se emplea para separar los componentes de una sustancia (Skoog et al., 2008, p. 816; Chicharro, Bautista, Benayas y Ortiz, 2010, p. 18).

La cromatografía es un método muy utilizado en todas las ramas de la ciencia porque permite la separación, identificación y determinación de sustancias químicas en mezclas complejas. Este método de separación tiene una aplicación generalizada que se considera la base de todo proceso analítico (García et al., 2003, p. 152; Skoog et al., 2008, p. 817).

Toda cromatografía líquida actual se efectúa con flujo presurizado y se denomina indistintamente como HPLC o LC (Skoog et al., 2008, p. 819). El HPLC usa una fase estacionaria y una fase móvil. La muestra se desplaza con un solvente o una mezcla de solventes orgánicos, la cual pasa por el relleno de una columna que es un material inmisible (Gómez, Ricón y Serrano, 2009, p. 1). La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica analítica de separación que se produce por las interacciones químicas entre el analito, que está en solución, y la columna cromatográfica por el flujo continuo de solvente (Lock de Ugaz, 2001, p. 53).

Las dos fases se escogen en función del hecho de que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Por la diferencia en la movilidad, los componentes se separan en bandas que pueden analizarse cualitativa y cuantitativamente (Chicharro et al., 2010, p. 15).

Un cromatograma es un gráfico de la respuesta emitida por un detector colocado al final de la columna que responde a la concentración del soluto en función del tiempo de retención del mismo. La ilustración obtenida es una serie de picos y es útil tanto para identificar como para cuantificar los analitos de una muestra. La identificación se basa en el tiempo de retención y la cuantificación en el área del pico (Chicharro et al., 2010, pp. 16-17). Para entender la respuesta que registra un cromatograma, se debe definir el tiempo de retención (t_R) que es el tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra hasta que el pico de concentración del analito alcanza el detector. Este valor depende de la naturaleza del analito, del soporte, de la fase móvil y de sus interacciones (Gómez et al., 2009, p. 2; Skoog et al., 2008, pp. 822, 824).

El equipo de esta técnica, básicamente, consta de un reservorio de la fase móvil, una bomba, un inyector, una columna de separación y un detector UV-Vis, fluorescente u otros (Skoog et al., 2008, p. 823). La fase móvil es una combinación de agua ultra purificada con otro solvente orgánico, como metanol o aceto-nitrilo. La elución en la columna se da mediante la variación de la fase móvil hasta adaptar la técnica a las características propias de cada analito; por ello, cada compuesto tiene un gradiente de elución adecuado que permite obtener la máxima separación de componentes (Gómez et al., 2009, pp. 11, 14; Chicharro et al., 2010, p. 16).

Para la operación de un equipo HPLC es importante considerar que los problemas habituales en las columnas son las sobrepresiones, las formas irregulares de los picos y los cambios en la retención y en la selectividad. En consecuencia, para mantener la integridad del equipo y su respuesta, se deben seleccionar adecuadamente la columna y la fase móvil a usarse (Agilent Technologies, 2010, p. 44).

2 PARTE EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALES

Se presenta la descripción de los materiales para cada etapa del desarrollo experimental del trabajo.

a) CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO Y REACTIVO INVOLUCRADOS:

- Balanza analítica DENVER, de 220 g × 0,1 mg
- Celdas de cuarzo de 3 mL, con tapa plástica
- Espectrofotómetro UV-Vis HITACHI, modelo U-1 900
- Matraces volumétricos graduados de 25, 50 y 100 mL
- Micropipeta BOECO, con rango de operación: 100 µL – 1 000 µL
- Puntas para micropipeta, con rango de operación: 100 µL – 1 000 µL

b) PROCESO DE SÍNTESIS CONVENCIONAL Y NO CONVENCIONAL:

- Balanza analítica CITIZEN, de 220 g × 0,1 mg
- Equipo de Extracción Soxhlet, MRC, modelo K_1/6, 3 300 W (10 niveles de potencia), 230 AC y 50 Hz; previsto de 6 balones de 250 mL, 6 cuerpos extractores de 125 mL y 6 refrigerantes modelo Dimroth (espiral externo y recto central) de vidrio ILMABOR con uniones esmeriladas
- Horno convencional de microondas PANASONIC, modelo NN-ST978S, con rango de operación: 120 – 1 200 W (10 niveles), 60 Hz y 120 V
- Reactor de teflón SAVILLEX de 60 mL con cierre hermético, con interior y exterior plano, tapa sin válvula de alivio de presión
- Vasos de precipitación BOECO de 100, 250, 500 y 600 mL

c) ANÁLISIS POR HPLC DE LA MEZCLA REACTIVA FINAL:

- Columna para HPLC Agilent ZORBAX Eclipse XDB - C18 Analytical 4,6 × 150 mm, 5 µm, 400 bar, 60 °C, pH (4 - 6), con soporte de sílica ≥ 99,995 % SiO₂ (tipo B)

- Equipo HPLC marca AGILENT, modelo L1120, con detector UV-Vis y FLD-VWD
- Filtros preparativos Millipore Millex – HV Hydrophilic PVDF, con tamaño de poro de 0,45 μm
- Matraces volumétricos de 10 mL de capacidad.
- Viales ámbar de 2 mL con tapa metálica de inyección directa

En la tabla 2.1 se citan los principales reactivos utilizados para la caracterización de las mezclas reactivas, la síntesis convencional, la síntesis no convencional, la identificación y la cuantificación de los cuatro productos seleccionados.

Tabla 2.1. Principal información de los reactivos utilizados para la síntesis de cumarinas por Condensación de Knoevenagel

CAS	NOMBRE	Fórmula Molecular	PM [g/mol]	Pureza [%]	Marca
141-78-6	Acetato de Etilo	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$	88,11	99,9	BDH
127-09-3	Acetato de Sodio (anhidro)	$\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$	82,04	98	Macherey-Nagel
7647-01-0	Ácido Clorhídrico (concentrado)	HCl	36,46	37,3	Merck
69-72-7	Ácido Salicílico	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$	138,12	≥ 99	Sigma-Aldrich
108-24-7	Anhídrido Acético	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$	102,1	98	BDH
91-64-5	1,2-Benzopirona	$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_2$	146,15	≥ 99	Sigma-Aldrich
105-53-3	Malonato de Dietilo	$\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_4$	160,17	99	Sigma-Aldrich
89-84-9	2,4-Dihidroxi Acetofenona	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	152,15	99	Sigma-Aldrich
64-17-5	Etanol (absoluto)	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	46,07	$\geq 99,8$	Merck
1846-76-0	Etil 3-Carboxi Cumarina	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_4$	218,21	99,5	Sigma-Aldrich
1076-38-6	4-Hidroxi Cumarina	$\text{C}_9\text{H}_6\text{O}_3$	162,14	98	Sigma-Aldrich
1310-73-2	Hidróxido de Sodio (sosa)	NaOH	39,99	97	BDH
67-56-1	Metanol (grado HPLC)	CH_4O	32,04	$\geq 99,995$	Merck
90-33-5	4-Metil Umbeliferona	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{O}_3$	176,17	98	Sigma-Aldrich
110-89-4	Piperidina	$\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}$	85,20	99	Sigma-Aldrich
90-02-8	Salicilaldehído	$\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$	122,12	98	Sigma-Aldrich
112926-00-8	Sílica Gel (sin indicador; 0,05-0,2 mm)	$\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	>78,08	$\geq 99,8$	Macherey-Nagel

(American Chemical Society, 2010; Sigma – Aldrich, 2008, pp. 763, 949, 986, 1189, 1421, 1781, 1985, 2167 – 2168; Figura AX.4 del anexo X)

2.2 CARACTERIZACIÓN DEL HORNO MICROONDAS

El horno microondas doméstico utilizado en este estudio fue caracterizado para establecer las zonas de mayor incidencia de la radiación y la mejor potencia de operación.

El método para determinar la distribución de la energía irradiada por la MO es una técnica sencilla. Se utiliza una solución acuosa de cloruro de cobalto de 50 g/L que sufre una deshidratación y oxidación. Este proceso se evidencia por el cambio de coloración del compuesto $[\text{Co}\cdot 6\text{H}_2\text{O}]^{2+}$ (ión cobaltoso hexa-hidratado) que es rosado al compuesto CoO (monóxido de cobalto) que es azul-celeste (Clark, 2003, 2do. párrafo).

El procedimiento para caracterizar el equipo fue el siguiente:

- a) Se recortaron piezas de papel filtro analítico con el tamaño de la superficie a cubrir en el interior del horno microondas: una pieza rectangular (superficie inferior del horno), una circular (plato giratorio) y 10 piezas diametrales (una para cada nivel de potencia).
- b) Se preparó una solución acuosa de 50 g/L de cloruro cobaltoso (CoCl_2).
- c) Se impregnó cada pieza de papel en la solución preparada.
- d) Se secó cada pieza en una superficie plana, durante 25 min, a temperatura ambiente (20 °C aprox.) hasta que el papel tuviera un tono rosado.
- e) Se irradió cada pieza a una potencia determinada desde el nivel 1 hasta el nivel 10 en periodos de 5 s hasta lograr la coloración azul fija.
- f) Se anotó el tiempo total de irradiación de cada pieza para la potencia respectiva y se registraron las distancias de las zonas de mayor color azul.

Las piezas finales usadas tuvieron la forma de un segmento diametral de circunferencia. Esta última forma de las piezas se indica en la figura AI.3 del anexo I.

Con base en el principio de homogeneidad en la masa expuesta a la irradiación, se utilizaron piezas rectangulares del diámetro del plato giratorio con pesos cercanos como se reporta en el anexo II. En la tabla All.1 se muestran los pesos de los papeles irradiados para la caracterización radial final del plato giratorio del horno de MO.

2.2.1 CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE TOTAL DEL HORNO MICROONDAS

Se realizó la caracterización de la superficie total del horno con y sin el plato giratorio para establecer si era necesario su uso. Estas caracterizaciones se pueden observar en las figuras Al.1 y Al.2 del anexo I.

2.2.2 CARACTERIZACIÓN RADIAL DEL HORNO MICROONDAS

Se determinó el mejor nivel de potencia a utilizarse y la ubicación más apropiada de los reactores dentro del horno microondas, con el uso de piezas diametrales. Estas piezas fueron de 40 × 7 cm y se irradiaron en periodos de 5 s hasta el aparecimiento del color azul. La forma descrita se puede observar en la figura Al.3 del anexo I.

2.3 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO Y REACTIVO INVOLUCRADOS EN CADA REACCIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

Las cuatro cumarinas seleccionadas fueron: Cumarina (1,2-Benzopirona), **ECC**, 4-Hidroxi Cumarina y 4-Metil Umbeliferona. La síntesis por Condensación de Knoevenagel de estos compuestos, en cada caso, requería de un derivado del salicilaldehído y de un derivado del acetato de etilo (Bogdal, 1998, 4to. párrafo), tal como se especifica en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Principales reactivos para la síntesis de cada cumarina mediante Condensación de Knoevenagel

Derivado del Acetato de Etilo	+	Derivado del Salicilaldehído	→	Producto
Acetato de Etilo	+	Salicilaldehído	→	Cumarina o 1,2-Benzopirona
Acetato de Etilo	+	Ácido Salicílico	→	4-Hidroxi Cumarina
Acetato de Etilo	+	2, 4-Dihidroxi Acetofenona	→	4-Metil Umbeliferona
Malonato de Dietilo	+	Salicilaldehído	→	Etil 3-Carboxi Cumarina

(Bogdal, 1998, 5to. párrafo)

Para la caracterización de los reactivos involucrados en cada reacción de síntesis de los cuatro productos esperados, se utilizó la espectrofotometría UV-Vis, dado que estos compuestos presentan grupos cromóforos (Lock de Ugaz, 2001, p. 50).

La caracterización permitió determinar la mejor longitud de onda para identificar y cuantificar posteriormente los productos dentro de las mezclas reactivas. Además, se pudieron establecer los rangos de concentraciones de análisis (Skoog et al., 2008, p. 824).

Para seleccionar la mejor longitud de onda se compararon los espectros de los reactivos y el producto, de manera que la señal de los reactivos fuera mínima y la del producto mayor. La absorbancia de los reactivos se registró en el intervalo del espectro UV de 200 a 340 nm por cada 5 nm y se utilizaron soluciones preparadas con etanol absoluto para evitar interferencias.

2.3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA 1,2-BENZOPIRONA Y DE LOS REACTIVOS

2.3.1.1 Levantamiento de los espectros

Como se indicó en la tabla 2.2 para la síntesis de la 1,2-Benzopirona se usaron como reactivos salicilaldehído y acetato de etilo, sólo dos de las tres sustancias

involucradas absorben en la región del UV, tanto el compuesto aromático como el producto seleccionado. Para la caracterización de estos reactivos se realizaron algunas diluciones hasta llegar a la concentración correspondiente que genera una absorbancia dentro de un rango confiable como se describe en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Concentraciones de las soluciones de los reactivos involucrados en la síntesis de la 1,2-Benzopirona para su caracterización

Compuesto / Concentración	Solución Madre		Solución Final	
	[ppm]	[μ M]	[ppm]	[μ M]
1,2-Benzopirona	1 020	6 979	10,20	69,79
Piperidina	853	10 005	3,41	40,02
Salicilaldehído	1 123	9 193	4,49	36,77

2.3.1.2 Construcción de las curvas de calibración

La selección de la longitud de onda más adecuada para la cuantificación de la 1,2-Benzopirona en la mezcla reactiva resultante se basó en la comparación de los espectros generados por las soluciones descritas en la tabla 2.3.

Con este dato de longitud de onda se realizaron 5 soluciones de la cumarina seleccionada para construir la curva de calibración, cuyas concentraciones se indican en la tabla 2.4.

Tabla 2.4. Concentraciones de los estándares preparados de la 1,2-Benzopirona para construir la curva de calibración

Solución Madre [μM]
6 979
Concentración [μM]
13,96
27,92
41,88
55,83
69,79

2.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA ETIL 3-CARBETOXI CUMARINA Y DE LOS REACTIVOS

2.3.2.1 Levantamiento de los espectros

Para la síntesis de la **ECC** se requería salicilaldehído y malonato de dietilo como se indicó en la tabla 2.2. En este caso las tres sustancias involucradas absorben en la región del UV, tanto el compuesto aromático como el éster y el producto seleccionado. Para la caracterización de estos reactivos se realizaron algunas diluciones hasta llegar a la concentración correspondiente que generara una absorbancia dentro de un rango confiable. Estas concentraciones se presentan en la tabla 2.5.

Tabla 2.5. Concentraciones de las soluciones de los reactivos involucrados en la síntesis de la **ECC** para su caracterización

Compuesto / Concentración	Solución Madre		Solución Final	
	[ppm]	[μ M]	[ppm]	[μ M]
ECC	915	4 195	5,86	26,85
Malonato de dietilo	1 044	6 521	6,68	41,70
Piperidina	853	10 005	3,41	40,02
Salicilaldehído	1 123	9 193	4,49	36,77

2.3.2.2 Construcción de las curvas de calibración

La selección de la longitud de onda más adecuada para la cuantificación de la **ECC** en la mezcla reactiva resultante se basó en la comparación de los espectros generados por las soluciones descritas en la tabla 2.5.

Se midieron las absorbancias de las 5 soluciones preparadas de la cumarina seleccionada a la longitud de onda determinada para construir la curva de calibración. Las concentraciones de estas soluciones se indican en la tabla 2.6.

Tabla 2.6. Concentraciones de los estándares preparados de la ECC para construir la curva de calibración

Solución Madre [μM]
6 690
Concentración [μM]
6,69
13,43
20,12
26,86
33,55

2.3.3 CARACTERIZACIÓN DE LA 4-HIDROXI CUMARINA Y DE LOS REACTIVOS

2.3.3.1 Levantamiento de los espectros

Como se indicó en la tabla 2.2, para la síntesis de la 4-Hidroxi Cumarina se usaron como reactivos ácido salicílico y acetato de etilo, solo dos de las tres sustancias involucradas absorben en la región del UV, tanto el compuesto aromático como el producto seleccionado. Para la caracterización de estos reactivos se prepararon soluciones de diferentes concentraciones, como se describen en la tabla 2.7.

Tabla 2.7. Datos del proceso de dilución para la caracterización de la 4-Hidroxi Cumarina y de los reactivos involucrados para su caracterización

Compuesto / Concentración	Solución Madre		Solución Final	
	[ppm]	[μM]	[ppm]	[μM]
4-Hidroxi Cumarina	1 370	8 450	13,70	84,50
Piperidina	853	10 005	3,41	40,02
Ácido Salicílico	1 292	9 354	7,75	56,11

2.3.3.2 Construcción de las curvas de calibración

Para escoger la longitud de onda para la cuantificación de la 4-Hidroxi Cumarina en la mezcla reactiva resultante se compararon los espectros obtenidos por espectrofotometría de las soluciones descritas en la tabla 2.7.

A este valor de longitud de onda se midieron las absorbancias de 5 soluciones de la cumarina seleccionada para el levantamiento de su curva de calibración. Las concentraciones de estas soluciones se muestran en la tabla 2.8.

Tabla 2.8. Concentraciones de los estándares preparados de la 4-Hidroxi Cumarina para construir la curva de calibración

Solución Madre [μM]
8 450
Concentración [μM]
26,40
52,80
79,21
105,61
132,01

2.3.4 CARACTERIZACIÓN DE LA 4-METIL UMBELIFERONA Y DE LOS REACTIVOS

2.3.4.1 Levantamiento de los espectros

En la tabla 2.2 se presentaron los reactivos para la síntesis de la 4-Metil Umbeliferona, los cuales son la 2,4-Dihidroxi Acetofenona y el acetato de etilo. En este caso, se realizaron las caracterizaciones del derivado del salicilaldehído y del producto esperado. Las concentraciones de estos reactivos en las soluciones necesarias para la caracterización se detallan en la tabla 2.9.

Tabla 2.9. Datos del proceso de dilución para la caracterización de la 4-Metil Umbeliferona y de los reactivos involucrados para su caracterización

Compuesto / Concentración	Solución Madre		Solución Final	
	[ppm]	[μ M]	[ppm]	[μ M]
4-Metil Umbeliferona	843	4 785	4,32	24,52
Piperidina	853	10 005	3,41	40,02
2,4-Dihidroxi Acetofenona	865	5 685	6,92	45,48

2.3.4.2 Construcción de las curvas de calibración

La comparación de los espectros UV generados por los reactivos y producto seleccionados en la síntesis de la 4-Metil Umbeliferona permitió la selección de la longitud de onda más adecuada para la cuantificación de esta cumarina. Los datos de las concentraciones de las soluciones, con las cuales se construyó la curva de calibración, se muestran en la tabla 2.10. En este caso, se realizó la curva de calibración del reactivo limitante en vez de la cumarina seleccionada por la mayor sensibilidad de este compuesto.

Tabla 2.10. Concentraciones de los estándares preparados de la 2,4-Dihidroxi Acetofenona* para construir la curva de calibración

Solución Madre [μ M]
5 685
Concentración [μ M]
45,50
68,24
90,99
113,74
136,49

*Reactivo principal de la 4-Metil Umbeliferona

2.4 DESARROLLO DEL MÉTODO CONVENCIONAL PARA LA SÍNTESIS DE CUMARINAS, MEDIANTE CONDENSACIÓN DE KNOEVENAGEL

La síntesis convencional de las cuatro cumarinas seleccionadas se realizó mediante calentamiento por reflujo con el uso de etanol como solvente (Austin, 1988, p. 578). Un esquema resumido del proceso se presenta en la figura 2.1.

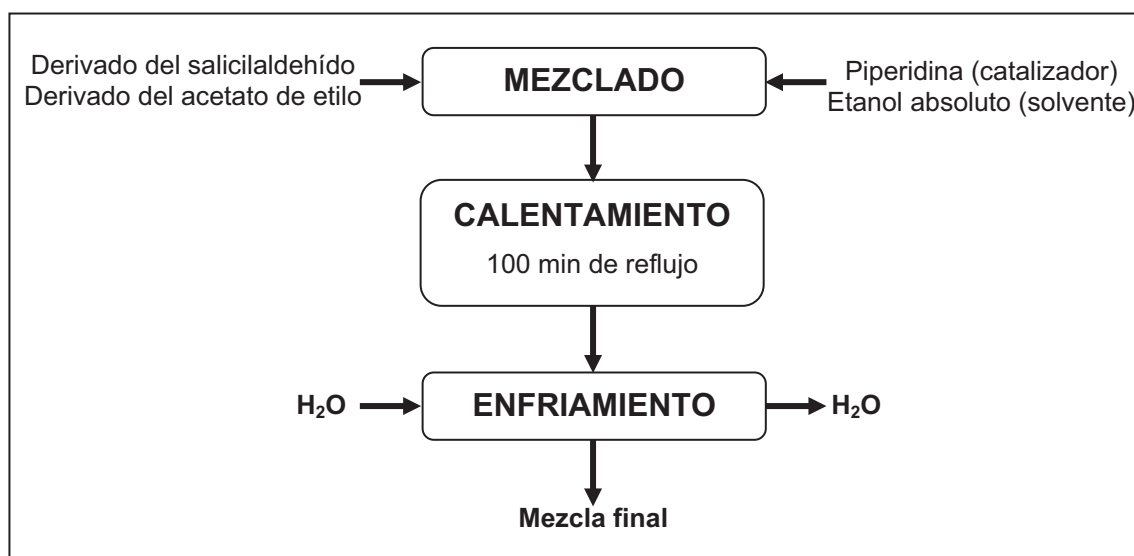


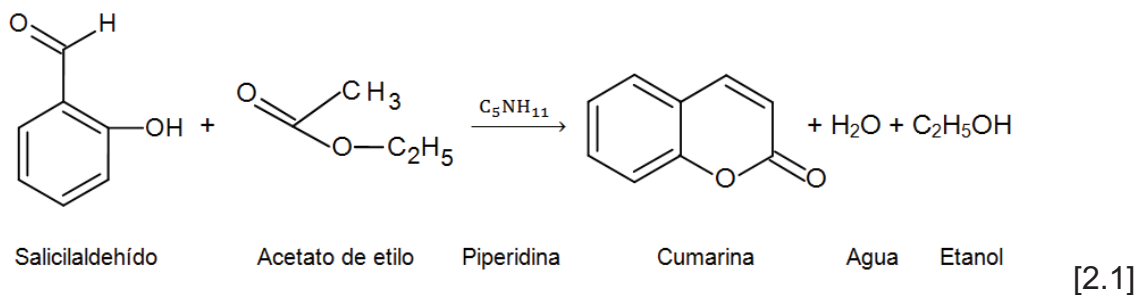
Figura 2.1. Diagrama de bloques de la síntesis convencional para la producción de una cumarina, mediante Condensación de Knoevenagel

El enfriamiento del balón y de la mezcla reactiva contenida se realizó primero con aire como fluido de refrigeración y después con agua a temperatura ambiente. En la síntesis convencional se usó la técnica de reflujo con calentamiento directo con un mechero o con una resistencia eléctrica.

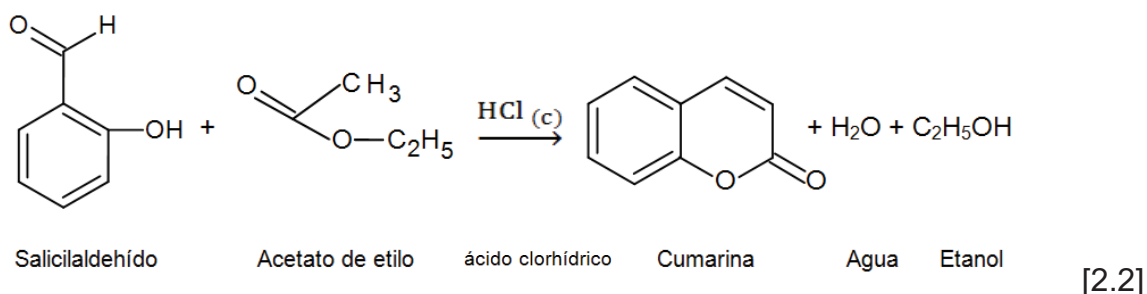
Las cantidades de catalizador, la relación molar entre el reactivo limitante y el reactivo en exceso fueron iguales para el método convencional de reflujo y para el método no convencional de radiación de microondas.

2.4.1 SÍNTESIS CONVENCIONAL DE LA 1,2-BENZOPIRONA

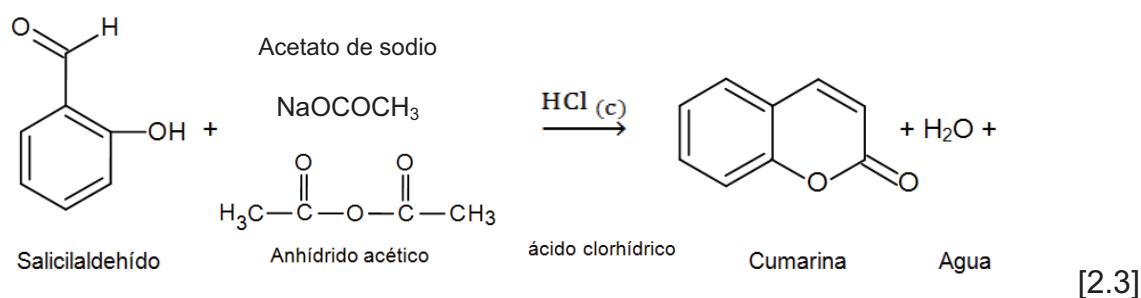
Para la síntesis de la 1,2-Benzopirona se realizó la reacción entre el acetato de etilo y el salicilaldehído en presencia de la piperidina como catalizador. Es decir, se desarrolló la Condensación de Knoevenagel (Bogdal, 1998, 8vo. párrafo) como se indica en la reacción 2.1 y se muestra en resumen en la tabla 2.11.



La segunda reacción desarrollada fue la Reacción de Pechmann entre el salicilaldehído y el acetato de etilo, que utiliza ácido clorhídrico como catalizador a diferencia de la primera condensación descrita (Finar, 1975, p. 889). La síntesis se muestra mediante la reacción 2.2.



El último mecanismo de síntesis probado para la 1,2-Benzopirona fue la Reacción de Perkin entre el salicilaldehído, el anhídrido acético y el acetato de sodio con el mismo catalizador: ácido clorhídrico (Austin, 1988, p. 578; Finar, 1975, p. 889). Esta síntesis se describe en la reacción 2.3.



En la tabla 2.11 se indican los detalles de los reactivos usados que corresponden a las especificaciones dadas para cada tipo de reacción probada.

Tabla 2.11. Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la 1,2-Benzopirona, mediante reflujo

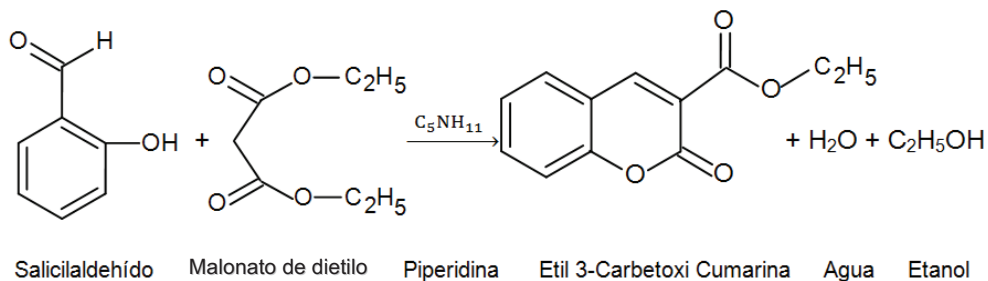
VARIABLE	NIVELES			
Tiempo de calentamiento [min]	120	120	100	100
Relación molar * [mol / mol]	2 / 3	2 / 3		4 / 5
Catalizador	Piperidina [% mol]	Ácido clorhídrico concentrado [% V/V]		
	1,0	8,5	9,5	
Reactivos 4,830 [mL] = 0,042 [mol] Salicilaldehído	Acetato de Etilo [mL]	Acetato de Etilo [mL]	Anhídrido acético [mL]	Acetato de sodio [g]
	6,160	6,160	4,280	0,766
Reacción descrita	[2.1]	[2.2]	[2.3]	
Tipo de reacción	Knoevenagel	Pechmann	Perkin	
Etanol absoluto [% V/V]	87,7	80,3	82,0	

* El reactivo limitante es el Salicilaldehído

2.4.2 SÍNTESIS CONVENCIONAL DE LA ETIL 3-CARBETOXI CUMARINA

Para la síntesis de la **ECC** se realizó la Condensación de Knoevenagel a través del calentamiento directo por reflujo, la reacción se desarrolló entre el

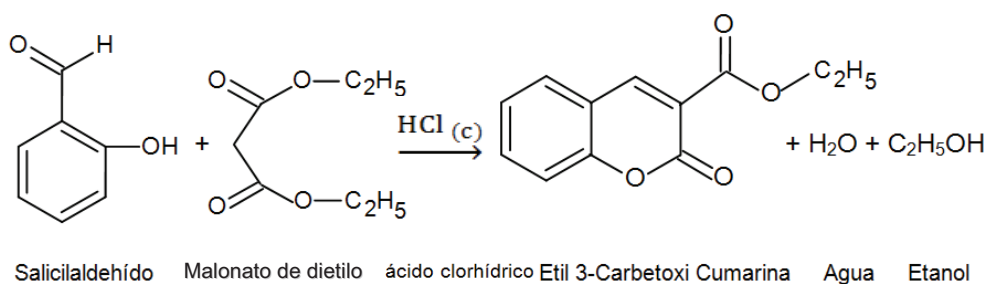
salicilaldehído y el malonato de dietilo con la piperidina como catalizador (Loupy, 2003, p. 192).



[2.4]

La mezcla reactiva inicial se realizó en el siguiente orden: sobre el etanol absoluto se colocó el compuesto aromático, luego el derivado del acetato de etilo (éster) y finalmente el catalizador orgánico.

La Reacción de Pechmann para la síntesis de la **ECC** se desarrolla con los mismos reactivos que la anterior condensación pero con el ácido clorhídrico como catalizador (Finar, 1975, p. 889). Esta síntesis en medio ácido se describe mediante la reacción 2.5.



[2.5]

Por los tiempos cortos de reacción que presenta las síntesis a través del método no convencional de radiación de MO se realizaron en un mayor número las pruebas preliminares con esta técnica que con la convencional de reflujo. Por ello, en la tabla 2.12 se presentan las mejores cantidades usadas de los reactivos para las dos reacciones desarrolladas tanto con catalizador ácido como con básico.

Tabla 2.12. Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la ECC, mediante reflujo

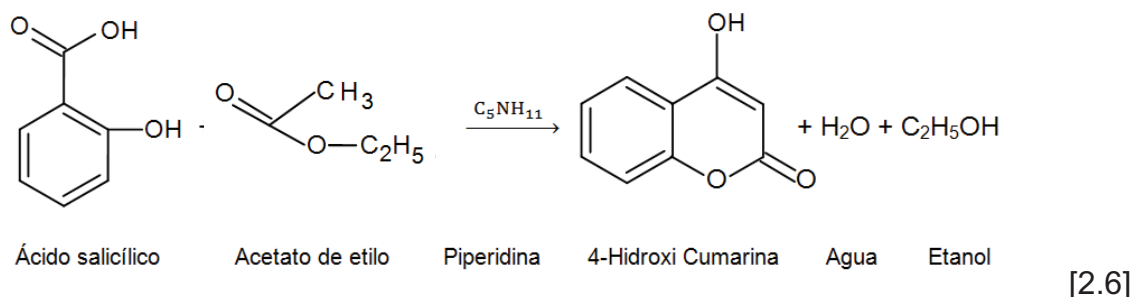
VARIABLE	NIVELES			
Tiempo de calentamiento [min]	105	100	100	
Relación molar * [mol / mol]	2 / 3		2 / 3	
Catalizador	Piperidina [% mol]		HCl _c [% V/V]	
	1,0		10,2	
Reactivos 4,830 [mL] = 0,042 [mol] Salicilaldehído	Malonato de Dietilo		Malonato de Dietilo	
	[mL]	[mol]	[mL]	[mol]
	9,650	0,063	9,650	0,063
Reacción descrita	[2.4]		[2.5]	
Tipo de reacción	Knoevenagel		Pechmann	
Etanol absoluto [% V/V]	77,5		77,5	

* El reactivo limitante es el Salicilaldehído

Para la reacción en medio ácido se usaron 11 mL de ácido clorhídrico y 85 mL de etanol absoluto.

2.4.3 SÍNTESIS CONVENCIONAL DE LA 4-HIDROXI CUMARINA

Para la síntesis de la 4-Hidroxi Cumarina se desarrolló la reacción modelo de la Condensación de Knoevenagel, la cual se da entre el ácido salicílico y el acetato de etilo y se describe en la reacción 2.6.



La tabla 2.13 presenta las cantidades usadas de los reactivos, que corresponden a las condiciones de la reacción modelo probada.

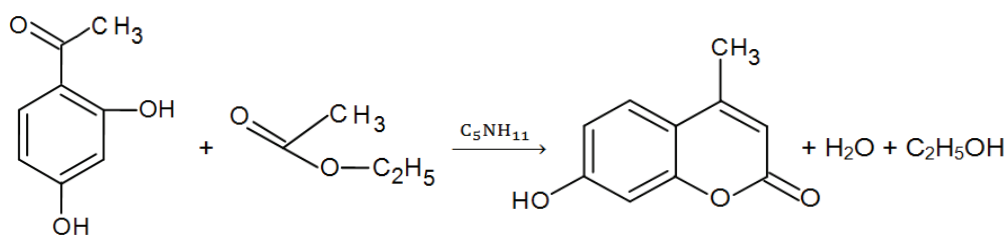
Tabla 2.13. Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la 4-Hidroxi Cumarina, mediante reflujo

VARIABLE	NIVELES	
Tiempo de calentamiento [min]	100	
Relación molar * [mol / mol]	2 / 3	
Catalizador	Piperidina	
	[% mol]	[μ L]
	2,0	220
Reactivos 6,1568 [g] = 0,042 [mol] Ácido Salicílico	Acetato de Etilo	
	[mL]	[mol]
	6,160	0,063
Reacción descrita	[2.6]	
Tipo de reacción	Knoevenagel	
Etanol absoluto [% V/v]	94	

* El reactivo limitante es el Ácido Salicílico

2.4.4 SÍNTESIS CONVENCIONAL DE LA 4-METIL UMBELIFERONA

Para la síntesis de la 4-Metil Umbeliferona se desarrolló la Condensación de Knoevenagel. En la reacción 2.7 se describen los reactivos involucrados que son la 2,4-dihidroxi acetofenona y el acetato de etilo.



2,4-Dihidroxi Acetofenona Acetato de etilo Piperidina 4-Metil Umbelliferona Agua Etanol

[2.7]

La tabla 2.14 muestra las cantidades usadas de los reactivos, que corresponden a las especificaciones de la Condensación de Knoevenagel.

Tabla 2.14. Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la 4-Metil Umbeliferona, mediante reflujo

VARIABLE	NIVELES	
Tiempo de calentamiento [min]	100	
Relación molar * [mol / mol]	2 / 3	
Catalizador	Piperidina	
	[% mol]	[μL]
	2,0	220
Reactivos 6,5439 [g] = 0,042 [mol] 2,4 – Dihidroxi Acetofenona	Acetato de Etilo	
	[mL]	[mol]
	6,160	0,063
Reacción descrita	[2.7]	
Tipo de reacción	Knoevenagel	
Etanol absoluto [% v/v]	94	

* El reactivo limitante es la 2,4-Dihidroxi Acetofenona

2.5 DESARROLLO DEL MÉTODO DE SÍNTESIS DE CUMARINAS, MEDIANTE CONDENSACIÓN DE KNOEVENAGEL, POR RADIACIÓN DE MICROONDAS

La síntesis no convencional de la 1,2-Benzopirona, **ECC**, 4-Hidroxi Cumarina y 4-Metil Umbeliferona, se realizó mediante calentamiento por radiación de microondas con el uso de un horno microondas doméstico (Loupy, 2003, p. 18). Este proceso se dividió en las etapas que se indican en la figura 2.2.

Para garantizar la seguridad y tiempo de vida útil del horno microondas se colocó junto al reactor un vaso de precipitación con 500 mL de agua a temperatura ambiente (Kingston y Jassie, 1988, p. 17). Tanto la mezcla reactiva como el agua se sometieron al calentamiento por radiación al nivel de potencia 10 que corresponde a 1 200 W.

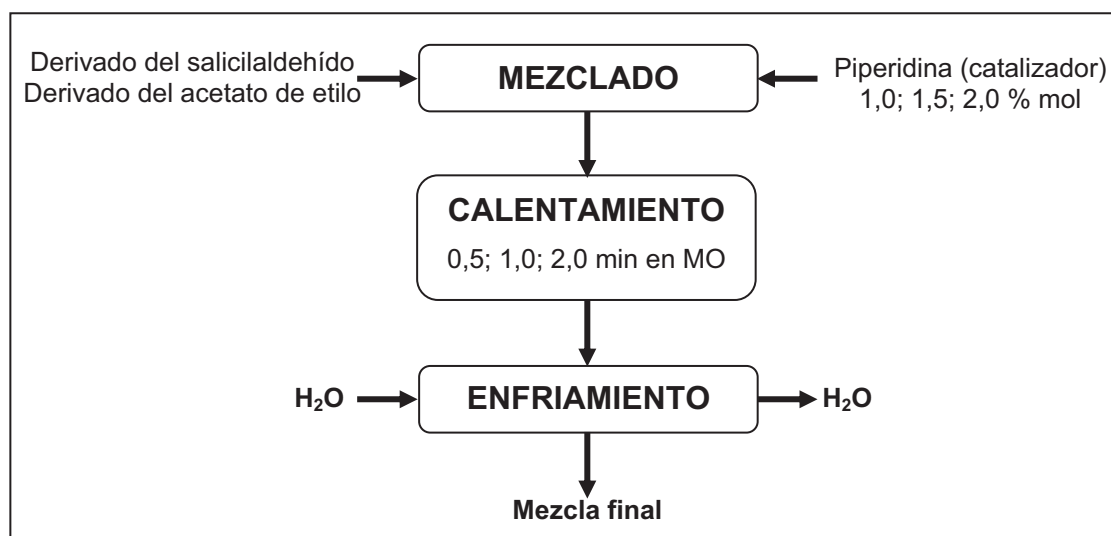
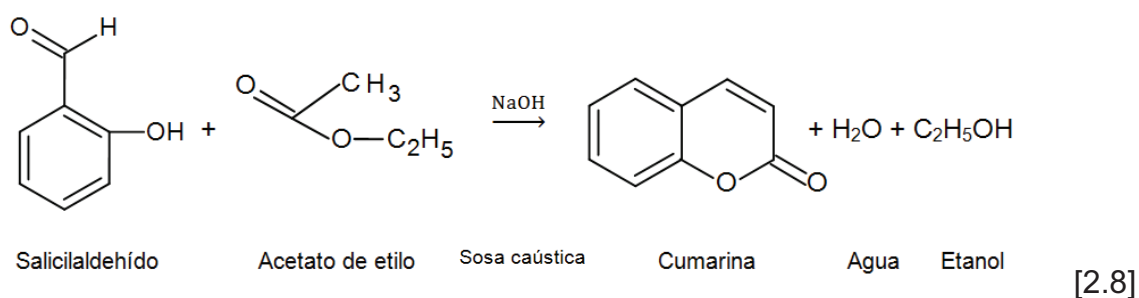


Figura 2.2. Diagrama de flujo de la síntesis por radiación de microondas, para la producción de una cumarina, por Condensación de Knoevenagel

El enfriamiento del reactor y de la mezcla reactiva contenida se realizó primero con aire como fluido de refrigeración y después con agua a temperatura ambiente. Las reacciones se llevaron a cabo en reactores de teflón con sello hermético, en presencia o ausencia de sílica gel, como soporte inerte, y sin solvente (Ballini et al., 2009, p. 213) mediante la Condensación de Knoevenagel (Bogdal, 1998).

2.5.1 SÍNTESIS NO CONVENCIONAL DE LA 1,2-BENZOPIRONA

Para la síntesis no convencional de la 1,2-Benzopirona se probaron dos mecanismos. El primero se dio en medio de piperidina por Condensación de Knoevenagel, descrita en la reacción 2.1 (Bogdal, 1988, 8vo. párrafo) y el segundo se desarrolló en un medio básico con la presencia del hidróxido de sodio por Reordenamiento de Claisen (El Khatib et al., 2006, p. 1) como se indica en la reacción 2.8.



Se definió un orden para colocar los elementos y así evitar interferencias por posibles reacciones de competencia. El primer elemento fue la sílica gel, sobre este soporte se colocó el salicilaldehído y después el acetato de etilo y, finalmente, la piperidina. Las condiciones antes señaladas se indican en la tabla 2.15, donde se detallan los reactivos usados, correspondientes para cada mecanismo probado.

Tabla 2.15. Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la 1,2-Benzopirona por radiación de microondas

VARIABLE	NIVELES							
Tiempo de irradiación [min]	1,0	3,0	1,0	3,0	1,0			
Relación molar [mol / mol]	1 / 3		2 / 3		2 / 3			
Catalizador	Piperidina [% mol]				Hidróxido de sodio [% mol]			
	0,1	1,0	1,5	2,0	0,1	1,2	5,9	11,8
	5,0	10,0			0,0			
Reactivos 2,415 [mL] = 0,021 [mol] 4,830 [mL] = 0,042 [mol] Salicilaldehído +	Acetato de etilo				Acetato de etilo			
	[mL]		[mol]		[mL]		[mol]	
	6,160		0,063		6,160		0,063	
Reacción descrita	[2.1]				[2.8]			
Tipo de reacción	Knoevenagel				Claisen			
Nivel de potencia [#]	10 (1 200 W)		7 (840 W)		10 (1 200 W)			
Soporte Inerte (sílica gel) [g] [% w/w]	0,86	1,29	1,13	1,70	-----			
	10	15	10	15	-----			

* El reactivo limitante es el Salicilaldehído

El primer nivel de potencia probado fue el 7 porque desde este valor la energía entregada por el horno microondas presentó estabilidad, pero para mejorar las condiciones de radiación, se utilizó el nivel 10 de potencia.

2.5.2 SÍNTESIS NO CONVENCIONAL DE LA ETIL 3-CARBETOXI CUMARINA

Con base en los resultados preliminares obtenidos en la síntesis convencional de la **ECC**, se realizó la reacción modelo de la Condensación de Knoevenagel con el uso del catalizador seleccionado, la piperidina (Bogdal, 1998, 8vo. párrafo). Este mecanismo se describió en la reacción 2.4 y en la tabla 2.16 se presentan las cantidades usadas de reactivos, que permitieron establecer las especificaciones del diseño experimental desarrollado.

Tabla 2.16. Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la **ECC** por MO

VARIABLE	NIVELES			
Tiempo de irradiación [min]	0,5	1,0	2,0	
Relación molar * [mol / mol]	1 / 3		2 / 3	
Catalizador	Piperidina [% mol]			
	0,0	1,0	2,0	
Reactivos	Salicilaldehído			
	[mL]	[mol]	[mL]	[mol]
	2,415	0,021	4,830	0,042
	Malonato de Dietilo			
	[mL]	[mol]	[mL]	[mol]
	9,650	0,063	9,650	0,063
Reacción descrita	[2.4]			
Tipo de reacción	Condensación de Knoevenagel			
Nivel de potencia	10 (1 200 W)		10 (1 200 W)	
Soporte Inerte [g] (sílica gel) [% ^w /w]	0,00	1,52	2,28	
	-----	10,0	15,0	

* El reactivo limitante es el Salicilaldehído

2.5.3 SÍNTESIS NO CONVENCIONAL DE LA 4-HIDROXI CUMARINA

La Condensación de Knoevenagel para la síntesis de la 4-Hidroxi Cumarina se describió en la reacción 2.6. Esta reacción se desarrolló entre el derivado oxidado del salicilaldehído, el ácido salicílico, y el acetato de etilo (El Khatib et al., 2006, p. 2; Organic Chemistry Portal, 2007, 2do. párrafo).

En la tabla 2.17 se indican las cantidades utilizadas de los reactivos, que corresponden a las especificaciones del único mecanismo probado.

Tabla 2.17. Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la 4-Hidroxi Cumarina por radiación de microondas

VARIABLE	NIVELES			
Tiempo de irradiación [min]	1,0	2,0	3,0	
Relación molar * [mol / mol]	1 / 3		2 / 3	
Catalizador	Piperidina [% mol]			
	1,0		2,0	
Reactivos	Ácido Salicílico			
	[g]	[mol]	[g]	[mol]
	2,930	0,021	6,138	0,042
	Acetato de Etilo			
	[mL]	[mol]	[mL]	[mol]
	6,160	0,063	6,160	0,063
Reacción descrita	[2.6]			
Tipo de reacción	Condensación de Knoevenagel			
Nivel de potencia	10 (1 200 W)		10 (1 200 W)	
Soporte Inerte [g] (sílica gel) [% ^w /w]	0,85	1,27	1,12	1,68
	10,0	15,0	10,0	15,0

* El reactivo limitante es el Ácido Salicílico

2.5.4 SÍNTESIS NO CONVENCIONAL DE LA 4-METIL UMBELIFERONA

Como se describió en la reacción 2.7 para la síntesis de la 4-Metil Umbeliferona se desarrolló la Condensación de Knoevenagel (Bogdal, 1998, 3er. párrafo). Además, se probó el reordenamiento de Pechmann – Duisberg para la síntesis de las cumarinas 7-hidroxi sustituidas, en el cual se utilizó ácido clorhídrico al 5 % y se describe en la reacción 2.9 (Ballini et al., 2009, p. 130). En la tabla 2.18 se presentan las especificaciones de los dos tipos de reacciones probadas.

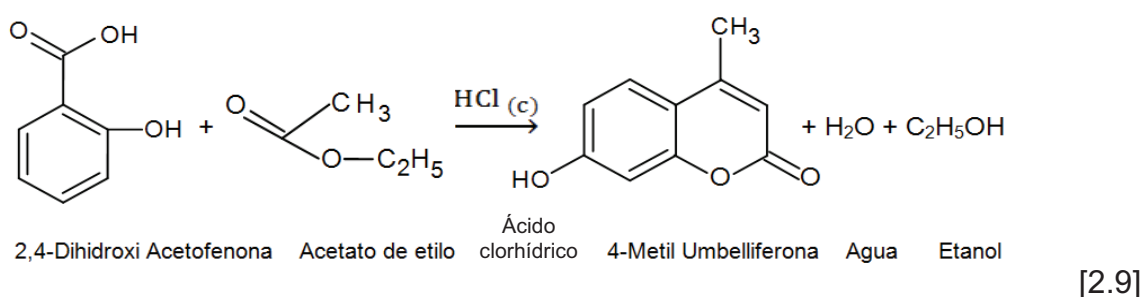


Tabla 2.18. Niveles seleccionados de las variables experimentales para la síntesis de la 4-Metil Umbeliferona por radiación de microondas

VARIABLE	NIVELES			
Tiempo de irradiación [min]	1,0	2,0	1,0	2,0
Relación molar * [mol / mol]	1 / 3		1 / 3	
Catalizador	Piperidina [% mol]		HCl al 5 % [% V/V]	
	2,0		5,4	
Reactivos	2,4-Dihidroxi Acetofenona			
	[mL]	[mol]	[mL]	[mol]
	3,225	0,021	3,225	0,042
	Acetato de Etilo			
	[mL]	[mol]	[mL]	[mol]
	6,160	0,063	6,160	0,063
Reacción descrita	[2.7]		[2.9]	
Tipo de reacción	Knoevenagel		Pechmann – Duisberg	
Nivel de potencia	10 (1 200 W)		10 (1 200 W)	
Soporte Inerte [g] (sílica gel) [% ^w /w]	1,32		0,88	
	15,0		10,0	

* El reactivo limitante es la 2,4-Dihidroxi Acetofenona

Para cada producto esperado, primero se colocó la cantidad de sílica gel correspondiente al porcentaje en peso a probar en función de la masa total de los reactivos como se indicaron en las tablas 2.15, 2.16, 2.17 y 2.18 para las cuatro cumarinas seleccionadas. Con ello se avaluó si este soporte favorece o no al rendimiento de la reacción.

2.6 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR HPLC

Para el análisis en HPLC se usaron como referencia las longitudes de onda obtenidas en la caracterización por espectrofotometría UV-Vis. Tanto las alícuotas de las mezclas reactivas como los estándares fueron diluidos con metanol grado HPLC y filtrados con un tamaño de poro de 0,45 μm .

Para determinar el efecto real del método de transferencia de calor, aparte del efecto del catalizador, se tomó una alícuota de la mezcla reactiva antes y después del calentamiento tanto en la síntesis convencional (alícuota de 200 μL) como en la síntesis no convencional (alícuota de 100 μL).

Para identificar y cuantificar las cumarinas seleccionadas dentro de cada mezcla reactiva, mediante el uso de un HPLC, tanto de la síntesis convencional como de la síntesis no convencional, se siguió el procedimiento expuesto a continuación:

- a) Determinación de la técnica específica de análisis de cada cumarina y de los reactivos involucrados para separar los componentes de la mezcla reactiva. Además, la preparación de soluciones del producto seleccionado y los reactivos involucrados para verificar los tiempos de retención.
- b) Construcción de las curvas de calibración de cada producto a sintetizarse y de los reactivos correspondientes que se pueden identificar y cuantificar en un HPLC-UV (Lock de Ugaz, 1994, p. 85).
- c) Inyección y análisis de la mezcla reactiva resultante de cada síntesis tanto con el método convencional como con el no convencional.

- d) Verificación de resultados cromatográficos mediante la inyección de estándares a las mezclas reactivas en análisis.

2.6.1 PRUEBAS PRELIMINARES CON EL HPLC

Las primeras pruebas se basaron en la revisión bibliográfica sobre la técnica de análisis en HPLC de algunas cumarinas a partir de extractos alcohólicos de determinadas plantas. Para ello, se probaron varias fases móviles como: agua con metanol, acetonitrilo con agua y acetonitrilo con metanol, a diferentes composiciones a un flujo de fase móvil de 1 mL/min y un volumen de inyección de 20 µL (Celeghini et al., 2001, 16to. párrafo).

Para garantizar la reproducibilidad de los análisis en HPLC, se midió el valor de pH de las mezclas reactivas y de las diluciones realizadas y se ajustó este valor a uno comprendido entre 6 y 8, en algunos casos con el uso de soluciones de HCl al 5 % y en otros con NaOH al 10 % (Agilent Technologies, 2010, pp. 8-10).

Con los resultados obtenidos de las pruebas preliminares se definió el solvente a utilizarse en la fase móvil para realizar posteriores modificaciones de polaridad (García et al., 2003, p. 153). La técnica analítica utilizada debía favorecer la identificación del producto esperado bajo las características de la mezcla reactiva resultante mediante reflujo y por MO (Loupy, 2003, p. 149).

2.6.2 LEVANTAMIENTO DE LA TÉCNICA DE ANÁLISIS

Las variables en HPLC, para la identificación de cada cumarina seleccionada en función de los grupos cromóforos que presentan (Lock de Ugaz, 1994, p. 82), fueron la fase móvil, el flujo, el volumen de inyección y el tiempo de duración de la corrida para cada análisis.

En la tabla 2.19 se detallan las condiciones de la técnica analítica en HPLC para identificar y cuantificar los productos esperados (Agilent Technologies, 2010, pp. 12-13).

Tabla 2.19. Condiciones generales del análisis HPLC para la identificación de las cumarinas seleccionadas

VARIABLE	NIVELES		
Catalizador [% mol]	Piperidina		
	1,0	1,5	2,0
Fase Móvil	Composición	Flujo [mL/min]	Presión de operación [bar]
	Metanol : Agua Metanol : Acetonitrilo	1,0	140
Volumen de inyección [μL]	20,0 *		
Tiempos [min]	Purga	Acondicionamiento	Análisis
	5,0	60,0	10,0
Columna C ₁₈ d _p = 5 [μm]	Tipo		Dimensiones [mm]
	ZORBAX Eclipse XDB – Analytical		4,6 × 150

* La temperatura del horno que alberga a la columna fue de 25 °C

Se tomaron dos alícuotas por síntesis: una antes de la irradiación y otra después de la misma; cada muestra se diluyó con metanol grado HPLC y se preparó la solución previa al vial correspondiente mediante filtros con el tamaño de poro adecuado. El diseño experimental definido dio un total de 18 viales por réplica con un total de 54 análisis para la cuantificación de la producción no convencional.

2.6.2.1 Identificación de la 1,2-Benzopirona

Se probó como fase móvil metanol y agua en concentraciones de 40:60, 50:50 y 70:30 bajo las condiciones detalladas en la tabla 2.19.

2.6.2.2 Identificación de la Etil 3-Carboxi Cumarina

Se utilizó como fase móvil metanol y agua en concentraciones de 50:50 bajo las condiciones detalladas en la tabla 2.19.

2.6.2.3 Identificación de la 4-Hidroxi Cumarina

Se ensayaron fases móviles de metanol con acetonitrilo y metanol con agua en concentraciones de 40:60, 50:50 y 70:30 bajo las condiciones detalladas en la tabla 2.19.

2.6.2.4 Identificación de la 4-Metil Umbeliferona

Se probaron fases móviles de metanol con acetonitrilo y metanol con agua en concentraciones de 40:60, 50:50 y 70:30 bajo las condiciones detalladas en la tabla 2.19.

2.6.3 CUANTIFICACIÓN DE LAS CUMARINAS SINTETIZADAS

2.6.3.1 Construcción de la curva de calibración de la 1,2-Benzopirona por HPLC

Para construir la curva de calibración de los reactivos involucrados en la síntesis de la 1,2-Benzopirona, se prepararon 5 soluciones estándar del reactivo limitante (salicilaldehído) y 4 estándares del producto esperado, las cuales se detallan en la tabla 2.20. Estas soluciones permitieron el levantamiento una curva de calibración para cada sustancia.

Tabla 2.20. Estándares preparados de la 1,2-Benzopirona para su curva de calibración en HPLC-UV

Solución Madre [μM]
1 225
Concentración [μM]
12,25
18,38
30,64
49,02

(*Rodríguez et al., 2008, 14to. párrafo)

2.6.3.2 Construcción de la curva de calibración de la Etil 3-Carboxi Cumarina por HPLC

Se prepararon 5 soluciones estándar del reactivo (salicilaldehído) y 5 del producto esperado, la **ECC** que se detallan en la tabla 2.21.

Estas soluciones permitieron el levantamiento de las curvas de calibración de las dos sustancias. Además, estos estándares fueron inyectados en determinadas proporciones a las diluciones de las mezclas reactivas en análisis, cuyos resultados debían ser confirmados.

Tabla 2.21. Estándares preparados de la **ECC** para su curva de calibración en HPLC-UV

Solución Madre [μM]
751
Concentración [μM]
7,51
11,26
17,64
21,77
31,15

2.6.3.3 Construcción de la curva de calibración de la 4-Hidroxi Cumarina por HPLC

Se realizaron 3 soluciones estándares del ácido salicílico y 5 estándares de la 4-Hidroxi Cumarina que se detallan en la tabla 2.22.

Estas soluciones permitieron el levantamiento de las curvas de calibración de las dos sustancias y se inyectaron en las diluciones generadas por cada alícuota tomada en las síntesis.

Tabla 2.22. Estándares preparados de la 4-Hidroxi Cumarina para su curva de calibración en HPLC-UV

Solución Madre [μM]
1 199
Concentración [μM]
11,99
17,99
23,98
35,98
44,37

2.6.3.4 Construcción de la curva de calibración de la 4-Metil Umbeliferona por HPLC

Se prepararon 5 estándares de la 2,4-dihidroxi acetofenona y 5 soluciones del producto esperado (4-Metil Umbeliferona) como se detalla en la tabla 2.23. Estas soluciones permitieron el levantamiento de las curvas de calibración.

Tabla 2.23. Estándares preparados de la 4-Metil Umbeliferona para su curva de calibración en HPLC-UV

Solución Madre [μM]
995
Concentración [μM]
9,95
14,92
19,89
29,84
39,79

2.7 EVALUACIÓN DE COSTOS

La hipótesis, planteada en todos los estudios revisados, afirma que la técnica no convencional de radiación de MO brinda beneficios tecnológicos que se traducen

en económicos por la reducción de los tiempos de operación y el aumento en la producción de cada proceso (Loupy, 2003, pp. xix, 2). Por ello, se realizó una evaluación preliminar de costos basada en los materiales usados.

2.7.1 ANÁLISIS PRELIMINAR DE COSTOS E INVERSIÓN

En primer lugar se clasificaron los rubros económicos de cada técnica en inversión de equipos y materiales (los ítems a, b y c), y en costos por insumos (los ítems d, e y la tabla 2.14).

Los siguientes datos permitieron calcular el valor total del monto de inversión y del monto de costos de operación.

- a) Equipo de extracción Soxhlet modelo K_1/6 y 3 300 W a 2 561,00 USD como se indica la figura AX.2 del anexo X;
- b) Horno microondas Panasonic de 1 200 W a 256,30 USD, lo cual se muestra en la figura AX.1 del anexo X;
- c) Reactor de teflón Savillex con tapa y juego de llaves a 71,40 USD, precio desglosado de la figura AX.5 del anexo X;
- d) Electricidad con subsidio en Quito D.M. a 0,071 USD por kW-h (Empresa Eléctrica Quito S.A., 2005)
- e) Agua potable en Quito D.M. con servicios a 0,50 USD por metro cúbico (m³) (MIDUVI, 2009, pp. 8-9)

Para detallar el gasto económico por el consumo de cada reactivo, se presentan en la tabla 2.24 los precios de cada sustancia en la presentación de venta local.

Con estos valores detallados se pueden calcular los gastos por el uso de los reactivos involucrados en cada reacción y la ganancia teórica por la venta de las cumarinas sintetizadas en el laboratorio mediante cada una de las técnicas de síntesis desarrolladas.

Tabla 2.24. Precios de los reactivos involucrados en la síntesis convencional y por MO de las cumarinas seleccionadas

Compuesto	Presentación	Precio final [USD]
Acetato de Etilo	2,5 L	100,80
Ácido Salicílico	0,5 kg	69,50
Cumarina o 1,2-Benzopirona	0,1 kg	102,75
Malonato de Dietilo	0,5 kg	71,46
2,4-Dihidroxi Acetofenona	0,1 kg	161,28
Etanol Absoluto	2,5 L	56,80
ECC	5,0 g	156,17
4-Hidroxi Cumarina	0,1 kg	109,65
4-Metil Umbeliferona	0,1 kg	115,07
Piperidina	0,5 L	151,50
Salicilaldehído	0,5 kg	143,00

(Sigma – Aldrich, 2008, pp. 763, 949, 986, 1189, 1421, 1781, 1985, 2167 – 2168; Figuras AX.3 y AX.4 del anexo X)

2.7.2 COMPARACIÓN ECONÓMICA ENTRE EL MÉTODO CONVENCIONAL Y LA SÍNTESIS POR RADIACIÓN DE MICROONDAS

Se realizó un análisis sencillo del beneficio económico de la aplicación de técnica de MO en la síntesis orgánica (Loupy, 2003, pp. 76, 191). Para comparar los dos métodos, se desarrollaron las reacciones y sus réplicas en igualdad de condiciones bajo los parámetros detallados en el diseño experimental.

Lo siguiente fue determinar un periodo de operación para calcular el número de síntesis posibles con cada método y la cantidad total de producto obtenido. Con estos valores y los datos de los precios se obtuvieron los costos de reactivos y de operación, además del monto económico por la producción lograda.

Para el cálculo de los costos de producción se consideró la potencia eléctrica utilizada del horno de MO y del equipo Soxhlet y el consumo de agua potable por el uso de refrigerantes de agua. Dicho consumo se estableció por el tiempo de uso y por la velocidad promedio del agua de 3 m/s en una tubería de media pulgada de diámetro (1,27 cm).

Se calcularon la producción mensual y el costo total de dicha producción. A partir de estos rubros se determinaron las diferencias entre los costos de producción y la inversión por los equipos necesarios para cada el proceso de síntesis.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presenta un diagrama de flujo con los principales resultados obtenidos de cada fase experimental y el equipo usado para cada una:

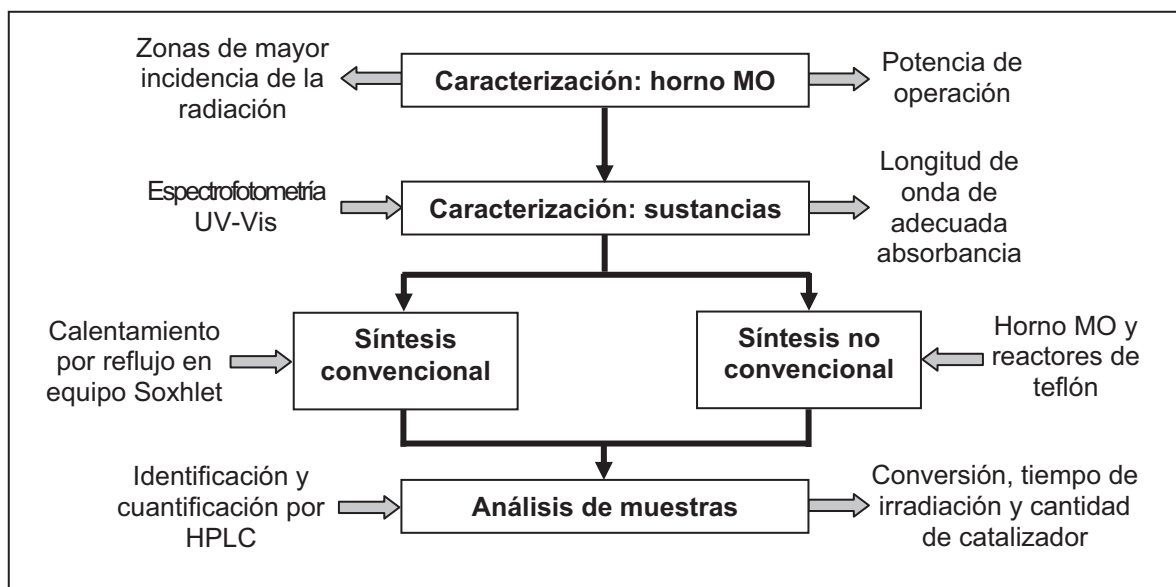


Figura 3.1. Diagrama de bloques de los pasos principales de cada técnica de síntesis con la técnica analítica y el resultado de cada uno

Este esquema simplificado indicado en la figura 3.1 muestra como entradas a las técnicas utilizadas y como salidas a los principales resultados a obtenerse con cada una, en cada paso detallado en el desarrollo de esta investigación.

3.1 CARACTERIZACIÓN DEL HORNO MICROONDAS

Se realizó un mapeo de la distribución de la energía de radiación entregada por el horno de MO mediante la caracterización de la superficie total de su cavidad, de la superficie total del plato giratorio y de la superficie radial del mismo. Se determinó que la velocidad de rotación del plato de vidrio del horno de MO es de 6 rpm. El registro de los tiempos, para cada nivel de potencia del horno, se presenta en la tabla 3.1 para las primeras piezas de papel usadas, que tuvieron la forma de un segmento de circunferencia, como se indica en la figura A1.3 del anexo I.

Tabla 3.1. Tiempos de irradiación resultantes de la caracterización final del horno convencional de microondas

Nivel de Potencia [#]	Potencia teórica [W]	Tiempo de irradiación [s]
1	120	240
2	240	180
3	360	120
4	480	90
5	600	60
6	720	60
7	840	60
8	960	50
9	1 080	60
10	1 200	65

El tiempo correspondiente a cada nivel de potencia fue aquel al cual el color rosado pasó a una coloración azul-celeste definida por el principio de la formación de iones a partir de cristales rosados hasta el óxido del cobalto.

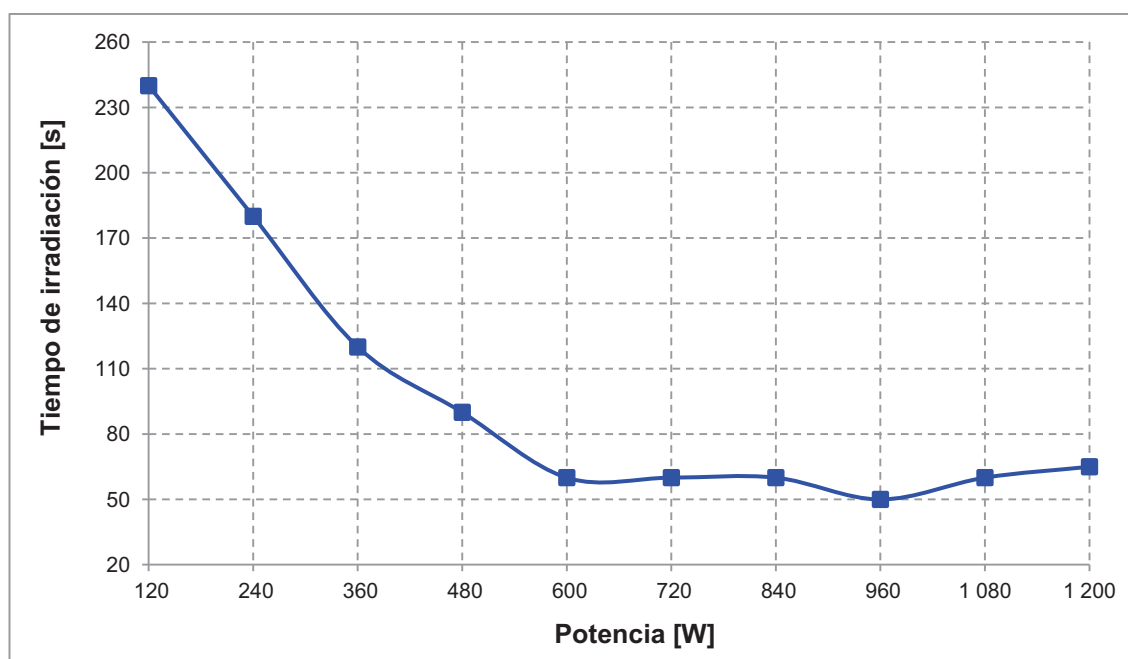


Figura 3.2. Tiempo de irradiación aplicado hasta el cambio de coloración de las piezas de papel en función de la potencia del horno MO

Esta curva de la caracterización fue homogénea a partir del nivel 7 porque la energía llega a un valor casi constante. Por el uso preliminar de otras piezas se pudo observar que la distribución de la energía incidente sobre las piezas de papel es más homogénea para las piezas que guardan mayor semejanza en su peso. Se determinó como el mejor nivel de potencia, al nivel 10 para la síntesis de las cumarinas, porque el máximo nivel, según bibliografía, garantiza una menor dispersión de la energía en los hornos multi-modo (Kingston y Jassie, 1988, p. 17; RSEQ, 1999, p. 27).

3.1.1 CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE TOTAL DEL HORNO MICROONDAS

En la figura AI.1 del anexo I se presenta la pieza y la distribución que se obtuvo con la caracterización sin el uso del plato giratorio, y en la figura AI.2 se indica la pieza y las zonas más coloreadas cuando se caracterizó con el plato giratorio. Estos dos resultados confirmaron que la distribución radial de la energía incidente es heterogénea.

- a) La caracterización sin usar el plato giratorio duró un total de 6,5 min de irradiación al nivel 1 de la potencia, en periodos de 30 s hasta obtener líneas azules definidas sobre el papel usado.
- b) La caracterización con el plato giratorio, en la cual se analizó la superficie total del mismo tomó un tiempo total de 1,0 min de irradiación al nivel máximo de potencia, en periodos de 15 s hasta que la pieza de papel usada tomara un color azul similar a las líneas obtenidas en la anterior pieza.

3.1.2 CARACTERIZACIÓN RADIAL DEL HORNO MICROONDAS

Se estableció como la zona de mayor incidencia de la radiación de microondas, la comprendida dentro del radio de 10 a 15 cm del centro del plato de rotación del horno microondas. Las distancias radiales de las franjas que permitieron

establecer la zona de mayor incidencia se indican en la tabla 3.2 y la variación del tiempo de irradiación, determinado por el cambio de coloración del papel impregnado con cloruro cobaltoso, con la potencia del microondas, los cuales se presentaron en la tabla 3.1.

En la tabla 3.2 se indican las ubicaciones de las franjas azules de las piezas diametrales usadas en la caracterización radial definitiva. El diámetro del plato giratorio era de 40 cm. Las segundas piezas eran de 40×7 cm con extremos curvos y fueron irradiadas en periodos de 5 s hasta un azul similar.

Tabla 3.2. Datos de las distancias de las franjas de coloración para cada nivel de potencia

Nivel de Potencia [#]	Distribución radial de cada franja [m]		
	1	0,015 - 0,040	0,090 - 0,120
2	0,015 - 0,050	0,090 - 0,135	0,090 - 0,145
3	0,015 - 0,040	0,085 - 0,140	0,090 - 0,135
4	0,015 - 0,050	0,085 - 0,135	0,090 - 0,145
5	0,015 - 0,060	0,080 - 0,120	0,090 - 0,130
6	0,015 - 0,060	0,080 - 0,135	0,080 - 0,140
7	0,015 - 0,050	0,085 - 0,130	0,100 - 0,130
8	0,015 - 0,055	0,080 - 0,135	0,100 - 0,135
9	0,015 - 0,055	0,080 - 0,130	0,090 - 0,140
10	0,015 - 0,050	0,095 - 0,120	0,095 - 0,130

3.2 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO Y REACTIVO INVOLUCRADOS EN CADA REACCIÓN POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

En las figuras 3.3, 3.5, 3.7 y 3.9 se presentan los espectros UV obtenidos de los reactivos involucrados en cada síntesis para las cuatro cumarinas seleccionadas, en los cuales se puede observar que la piperidina no presenta una señal significativa en el rango del UV. Con base en estos resultados se estableció la

mejor longitud de onda para la construcción de las curvas de calibración de los productos que se presentan en las figuras 3.4, 3.6, 3.8 y 3.10.

3.2.1 CARACTERIZACIÓN DE LA 1,2-BENZOPIRONA Y DE LOS REACTIVOS

3.2.1.1 Levantamiento de los espectros

En la figura 3.3 se presentan los espectros de la Cumarina o 1,2-Benzopirona, del Salicilaldehído y de la Piperidina a las concentraciones reportadas en la tabla 2.3.

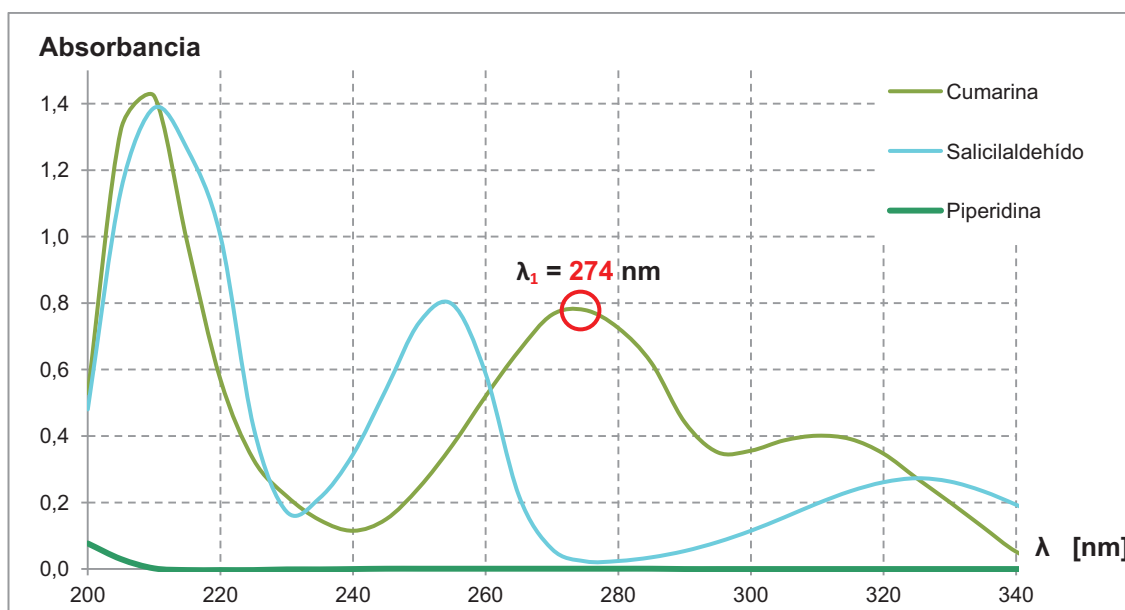


Figura 3.3. Absorbancia de la 1,2-Benzopirona, el Salicilaldehído y la Piperidina, en función de la longitud de onda

La longitud de onda resaltada ($\lambda_1 = 274 \text{ nm}$) en el espectro UV de la figura 3.3, fue la programada en el equipo HPLC para la cuantificación de la 1,2-Benzopirona.

Se determinó que las longitudes de onda, que ayudarían a identificar a la 1,2-Benzopirona en la mezcla reactiva, eran 210 y 274 nm, la primera porque los dos compuestos presentaban una igual absorbancia y la segunda porque la absorbancia del reactivo era mínima y la del producto presentaba un pico.

3.2.1.2 Construcción de las curvas de calibración

Se realizó la curva de calibración del producto a 274 nm con los datos que se reportan en la tabla 3.3. Esta recta resultante se presenta en la figura 3.4.

Tabla 3.3. Absorbancias reportadas mediante espectrofotometría UV de las soluciones estándares de la 1,2-Benzopirona a $\lambda = 274$ nm

Concentración [μ M]	Absorbancia a 274 nm
13,96	0,201
27,92	0,352
41,88	0,505
55,83	0,707
69,79	0,851

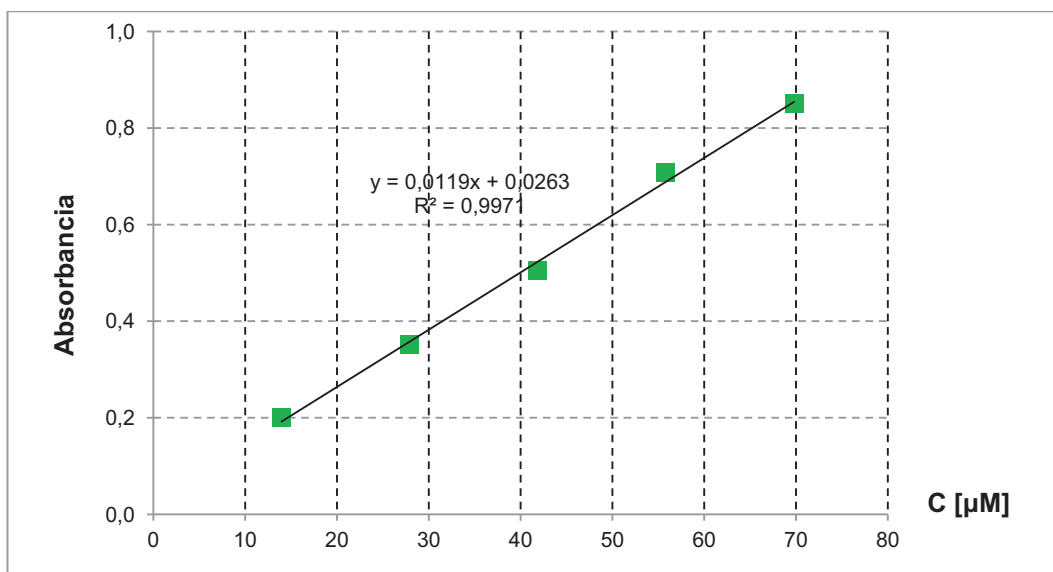


Figura 3.4. Curva de calibración para la 1,2-Benzopirona (Cumarina) a $\lambda = 274$ nm mediante espectrofotometría UV

3.2.2 CARACTERIZACIÓN DE LA ETIL 3-CARBETOXI CUMARINA Y DE LOS REACTIVOS

3.2.2.1 Levantamiento de los espectros

En la figura 3.5 se presentan los espectros de la **ECC**, de sus dos reactivos y del catalizador a las concentraciones de la tabla 2.5.

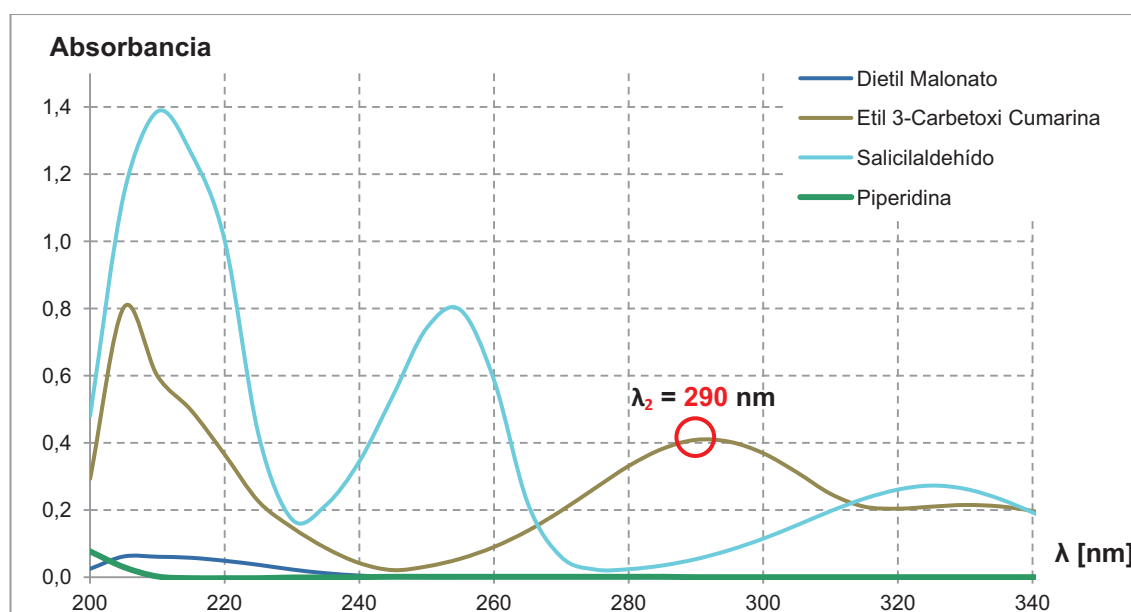


Figura 3.5. Absorbancia de la **ECC**, Salicilaldehído, Malonato de Dietilo y Piperidina, en función de la longitud de onda

La longitud de onda resaltada ($\lambda_2 = 290 \text{ nm}$) en el espectro UV de la figura 3.5, fue la programada en el equipo HPLC para la cuantificación de la **ECC**.

Se seleccionaron las longitudes de onda de 290 y 310 nm, que ayudarían a identificar a la **ECC** en la mezcla reactiva correspondiente; en la primera, el producto presentó un pico y la absorbancia del reactivo era menor; en la segunda, los dos compuestos presentaban una absorbancia similar.

3.2.2.2 Construcción de las curvas de calibración

Para la construcción de las curvas de calibración por espectrofotometría de la **ECC**, se decidió trabajar a 275 nm porque el reactivo presentaba una mínima absorbancia. En la tabla 3.4 se indican las soluciones preparadas y en la figura 3.6 se muestra la curva de calibración.

Tabla 3.4. Absorbancias reportadas mediante espectrofotometría UV de las soluciones estándares de la **ECC** a $\lambda = 275$ nm

Concentración [μM]	Absorbancia a 275 nm
6,69	0,114
13,43	0,180
20,12	0,251
26,86	0,326
33,55	0,372

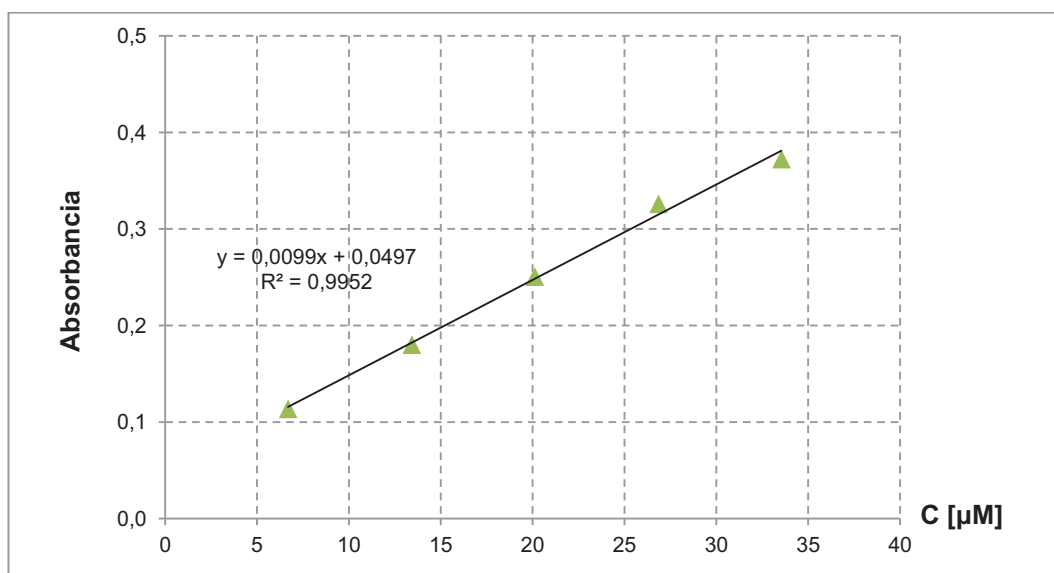


Figura 3.6. Curva de calibración para la **ECC** a $\lambda = 275$ nm mediante espectrofotometría UV

3.2.3 CARACTERIZACIÓN DE LA 4-HIDROXI CUMARINA Y DE LOS REACTIVOS

3.2.3.1 Levantamiento de los espectros

En la figura 3.7 se presentan los espectros de la 4-Hidroxi Cumarina, del Ácido Salicílico y de la Piperidina a las concentraciones reportadas en la tabla 2.7.

En estos espectros resultantes se identificó que la mejor longitud de onda era 265 nm para identificar a la 4-Hidroxi Cumarina porque en esta ubicación la absorbancia del reactivo era mínima y la del producto mayor.

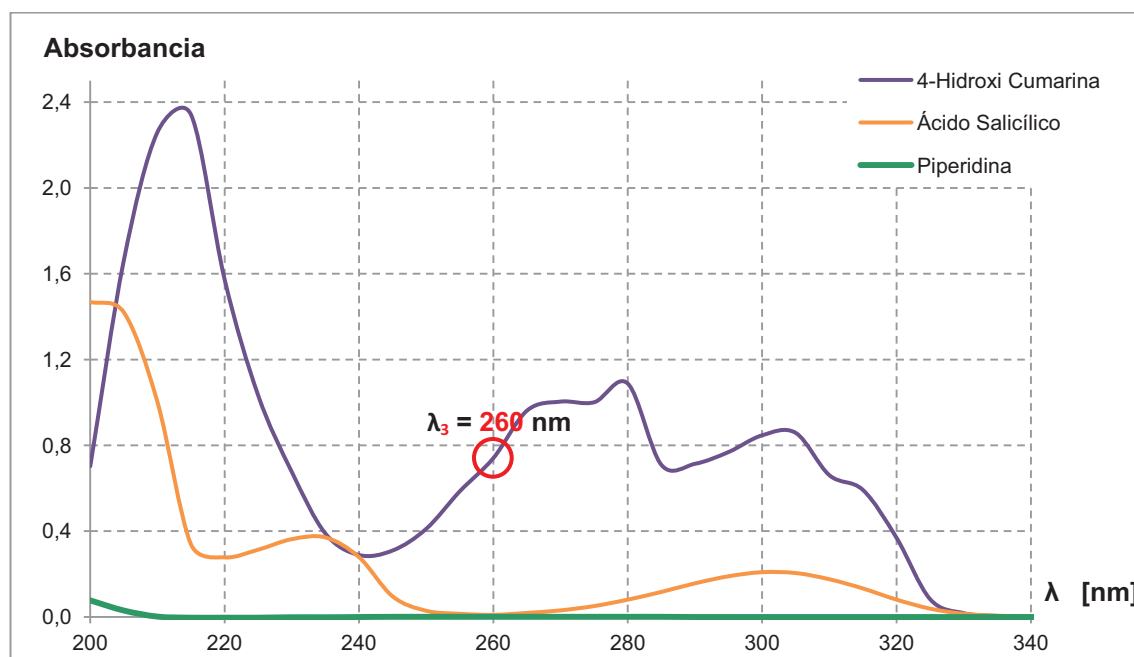


Figura 3.7. Absorbancia de la 4-Hidroxi Cumarina, el Ácido Salicílico y la Piperidina, en función de la longitud de onda

La longitud de onda resaltada ($\lambda_3 = 260 \text{ nm}$) en el espectro UV de la figura 3.7, fue la programada en el equipo HPLC para la cuantificación de la 4-Hidroxi Cumarina.

3.2.3.2 Construcción de las curvas de calibración

Para la construcción de la curva de calibración se seleccionó la longitud de onda de 260 nm porque en esta ubicación del espectro UV el ácido salicílico presentaba la mínima absorbancia. Con los datos que se reportan en la tabla 3.5 se realizó la curva de calibración de la 4-Hidroxi Cumarina que se indica en la figura 3.8.

Tabla 3.5. Absorbancias reportadas mediante espectrofotometría UV de los estándares de la 4-Hidroxi Cumarina a $\lambda = 260$ nm

Concentración [μ M]	Absorbancia a 260 nm
26,40	0,200
52,80	0,412
79,21	0,609
105,61	0,802
132,01	0,999

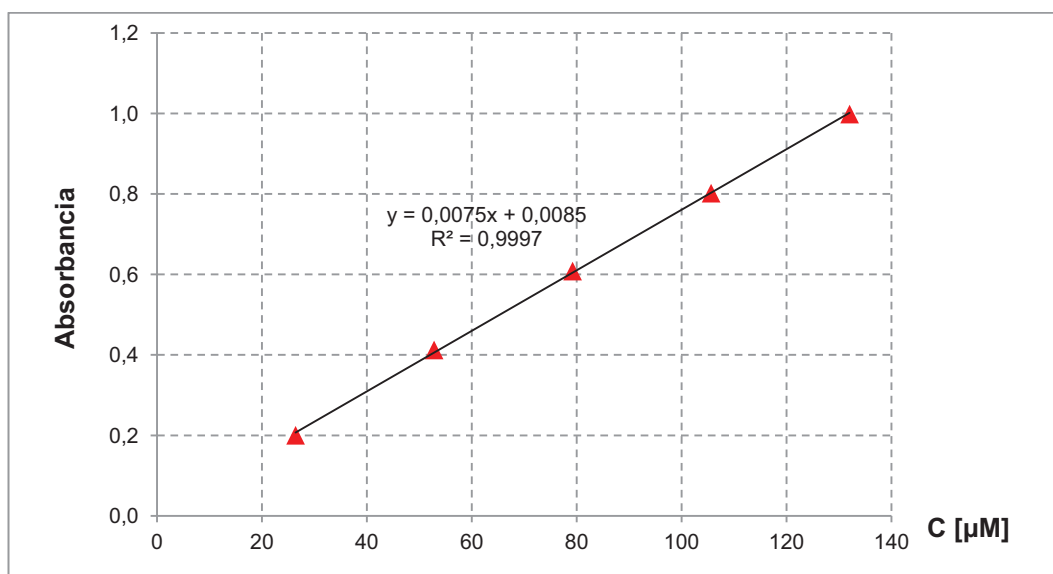


Figura 3.8. Curva de calibración para la 4-Hidroxi Cumarina a $\lambda = 260$ nm mediante espectrofotometría UV

3.2.4 CARACTERIZACIÓN DE LA 4-METIL UMBELIFERONA Y DE LOS REACTIVOS

3.2.4.1 Levantamiento de los espectros

En la figura 3.9 se presentan los espectros UV de la 4-Metil Umbeliferona, de la 2,4-Dihidroxi Acetofenona y de la Piperidina a las concentraciones de la tabla 2.9 y se resalta la longitud de onda ($\lambda_4 = 330$ nm) que fue programada en el equipo HPLC para la cuantificación de la 4-Metil Umbeliferona. A partir de estas señales UV se seleccionaron de manera preliminar dos longitudes de onda: 204 nm y 322,5 nm, las cuales permitirían identificar a la 4-Metil Umbeliferona en la mezcla reactiva resultante; la primera porque los dos compuestos presentaban una absorbancia similar y la segunda porque la absorbancia del producto presentaba un pico y la del reactivo era inferior a este.

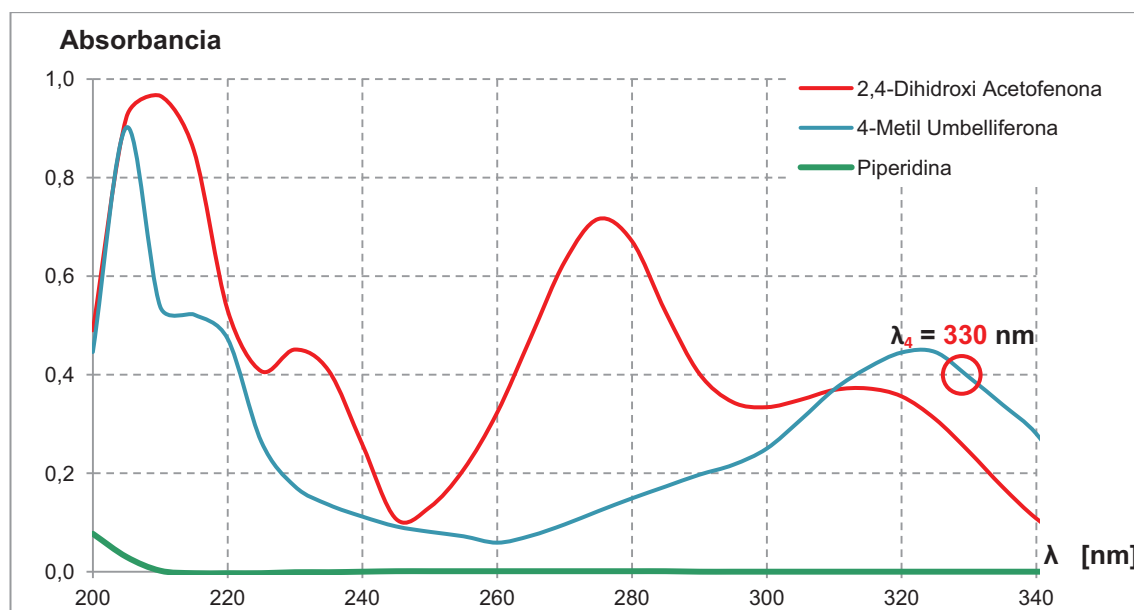


Figura 3.9. Absorbancia de la 4-Metil Umbeliferona, la 2,4-Dihidroxi Acetofenona y la Piperidina, en función de la longitud de onda

Para este último producto se decidió realizar el seguimiento del consumo del reactivo limitante y no de la cumarina seleccionada porque la 2,4-dihidroxi acetofenona presentó una absorbancia superior a la 4-Metil Umbeliferona en la mayoría del rango del espectro registrado (200 – 310 nm), excepto entre 310 nm y 340 nm como se puede observar en la figura 3.9.

3.2.4.2 Construcción de las curvas de calibración

Por lo antes expuesto, se decidió realizar la curva de calibración del reactivo a 260 nm con las soluciones de la 2,4-Dihidroxi Acetofenona a las concentraciones que se reportan en la tabla 3.6 para realizar el seguimiento del consumo de este reactivo porque a esta ubicación del espectro la absorbancia del producto esperado era mínima. Esta recta resultante de la calibración se presenta en la figura 3.10.

Tabla 3.6. Absorbancias reportadas mediante espectrofotometría UV de las soluciones estándares de la 2,4-Dihidroxi Acetofenona* a $\lambda = 260$ nm

Concentración [μ M]	Absorbancia a 260 nm
45,50	0,349
68,24	0,481
90,99	0,632
113,74	0,763
136,49	0,914

* Reactivo principal de la 4-Metil Umbeliferona

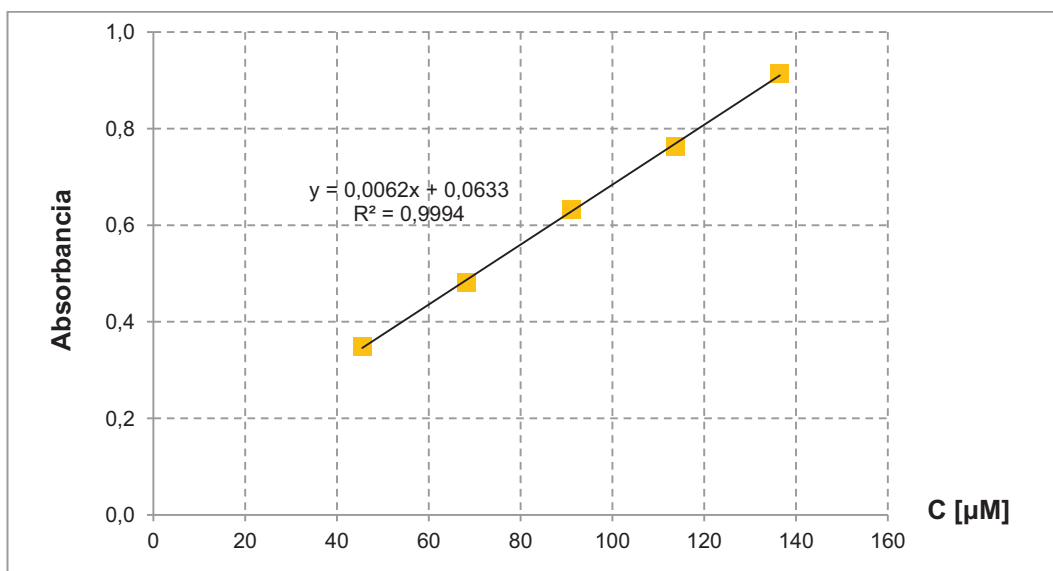


Figura 3.10. Curva de calibración para la 2,4-Dihidroxi Acetofenona a $\lambda = 260$ nm mediante espectrofotometría UV

Con las regresiones lineales obtenidas de las curvas de calibración presentadas en las figuras 3.4, 3.6, 3.8 y 3.10, se determinaron las absorptividades molares de cada sustancia analizada de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer. En la tabla 3.7 se presentan estos valores calculados.

Tabla 3.7. Absortividades molares (ϵ) calculadas de las sustancias seleccionadas mediante espectrofotometría UV

Sustancia	ϵ [M ⁻¹ cm ⁻¹]	Longitud de onda [nm]
1,2-Benzopirona	11,9 × 10 ³	275
ECC	9,9 × 10 ³	275
4-Hidroxi Cumarina	7,5 × 10 ³	260
2,4-Dihidroxi Acetofenona*	6,2 × 10 ³	260

* Reactivo principal de la 4-Metil Umbeliferona

De la tabla 3.7 se puede indicar que el primer producto seleccionado presenta la mayor absorptividad molar y el único reactivo utilizado en el presente análisis presenta la menor absorptividad molar.

3.3 IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS POR HPLC

Previa la identificación y cuantificación de las cumarinas por HPLC, estas fueron caracterizadas por espectrofotometría UV para establecer las longitudes de onda de trabajo, que serían utilizadas en la detección por cromatografía. Los espectros de la caracterización de las mezclas reactivas teóricas se muestran en las figuras 3.3, 3.5, 3.7 y 3.9.

3.3.1 RESULTADOS PRELIMINARES CON EL HPLC

Se realizaron varias pruebas en el equipo de HPLC utilizado y se obtuvieron las curvas de calibración de las cumarinas seleccionadas, la descripción de cada análisis preliminar y para cada síntesis se detalló en los acápites del 2.6.1 al

2.6.2.4. A partir de esta serie de ensayos se lograron obtener las condiciones adecuadas para la identificación de los productos esperados dentro de las mezclas reactivas resultantes.

3.3.2 LEVANTAMIENTO DE LA TÉCNICA DE ANÁLISIS

3.3.2.1 Identificación de la 1,2-Benzopirona

Para la 1,2-Benzopirona o Cumarina se encontró en bibliografía datos exactos de ciertas variables para la técnica de HPLC. El detector UV fue programado por 10 min (Celeghini et al., 2001, 16to. párrafo), ya que con el uso de una mezcla metanol – agua como fase móvil (Rodríguez et al., 2008, 7mo. párrafo) se obtuvieron tiempos de retención menores a los 6 min y las mejores separaciones entre los reactivos y el producto.

Con el objeto de separar los picos de la 1,2-Benzopirona del salicilaldehído se probaron varias composiciones de la fase móvil formada por agua y metanol: 30:70, 60:40 y 50:50. Esta última composición a un flujo de fase móvil de 1 mL/min permitió la mejor identificación de los picos mediante tiempos de retención distintos como se indican en la tabla 3.8. Estos detalles se complementan con los expuestos en la tabla 2.19.

Tabla 3.8. Condiciones de análisis en el equipo HPLC Agilent para la construcción de la curva de calibración de la 1,2-Benzopirona

VARIABLE	NIVELES	
Reactivo	Salicilaldehído	Acetato de Etilo
Tiempo de respuesta [min]	4,902 ± 0,005	-
Fase Móvil	Composición Final	
	Metanol : Agua (50:50)	
Longitud de onda (λ) [nm]	274,0	
Estadística	Réplicas de cada inyección	Tiempo de respuesta [min]
	3	1,544 ± 0,002

Se obtuvieron los picos de la 1,2-Benzopirona a 1,5 min y del salicilaldehído a 4,9 min aproximadamente como se indican en la figura AIII.1 del anexo III. Pese a lograr una apropiada separación de los picos no se identificó porque no se produjo la cumarina esperada en las mezclas reactivas obtenidas por el método convencional y el no convencional.

3.3.2.2 Identificación de la Etil 3-Carboxi Cumarina

Mediante la técnica analítica definida se elaboró la curva de calibración del producto obtenido, en cuya estructura se destaca el grupo carboxilo, que determinó que su tiempo de retención sea mayor al de su reactivo (Martínez, 2002, p. 147).

Para establecer una adecuada separación de los picos entre de la **ECC** del salicilaldehído se probaron otras composiciones de metanol y agua tales como 30:70 y 60:40 a un flujo de fase móvil de 1 mL/min como se muestran en las figuras AIV.1 a AIV.9 del anexo IV, bajo las condiciones indicadas en la tabla 3.9, previamente. Estas condiciones finales permitieron la identificación y posterior cuantificación de la **ECC**.

Tabla 3.9. Condiciones de análisis en el equipo HPLC Agilent para la construcción de la curva de calibración de la **ECC**

VARIABLE	NIVELES	
Reactivo	Salicilaldehído	Malonato de Dietilo
Tiempo de respuesta [min]	4,902 ± 0,005	-
Fase Móvil	Composición Final	
	Metanol : Agua (50:50)	
Longitud de onda (λ) [nm]	290,0	
Estadística	Réplicas de cada inyección	Tiempo de respuesta [min]
	3	6,395 ± 0,107

Se identificaron los compuestos involucrados: la **ECC** a $t_R = 6,4$ min y del salicilaldehído a $t_R = 4,9$ min como se indican en las figuras desde la AIV.1 a la AIV.9 del anexo IV.

3.3.2.3 Identificación de la 4-Hidroxi Cumarina

Para separar los picos de la 4-Hidroxi Cumarina y del ácido salicílico se varió la composición de la fase móvil formada por agua y metanol en las siguientes relaciones: 30:70, 60:40 y 50:50. Esta última composición con un flujo de fase móvil de 1 mL/min permitió la mejor identificación de los picos mediante tiempos de retención distintos como se indican en la tabla 3.10.

Tabla 3.10. Condiciones de análisis en el equipo HPLC Agilent para la construcción de la curva de calibración de la 4-Hidroxi Cumarina

VARIABLE	NIVELES	
	Reactivo	Acetato de Etilo
Tiempo de respuesta [min]	0,852 ± 0,016	NA
Fase Móvil	Composición Final	
	Metanol : Agua (30:70)	
Longitud de onda [nm]	260,0	
Estadística	Réplicas de cada inyección	Tiempo de respuesta [min]
	3	1,375 ± 0,054

En la tabla 3.10 se detallan las condiciones analíticas desarrolladas con base en los datos bibliográficos consultados para la técnica analítica de HPLC (Celeghini et al., 2001, 19no. párrafo).

Se separaron los picos de la 4-Hidroxi Cumarina a un $t_R = 1,4$ min y del ácido salicílico a un $t_R = 0,9$ min como se indica en la figura AV.1 del anexo V. Pese a lograr una apropiada separación de los picos no se identificó en las mezclas reactivas obtenidas por el método convencional y el no convencional a la cumarina seleccionada porque esta no produjo a través de la reacción.

3.3.2.4 Identificación de la 4-Metil Umbeliferona

Para separar los picos de la 4-Metil Umbeliferona de la 2,4-dihidroxi acetofenona se probaron varias composiciones de la fase móvil formada por agua y metanol: 30:70, 60:40 y 50:50. Esta última composición a un flujo de fase móvil de 1 mL/min permitió la mejor identificación de los picos mediante tiempos de retención distintos como se indican en la tabla 3.11.

Tabla 3.11. Condiciones de análisis en el equipo HPLC Agilent para la construcción de la curva de calibración de la 4- Metil Umbeliferona

VARIABLE	NIVELES	
Reactivo	2,4-Dihidroxi Acetofenona	Acetato de Etilo
Tiempo de respuesta [min]	1,540 ± 0,022	-
Fase Móvil	Composición Final	
	Metanol : Agua (50:50)	
Longitud de onda [nm]	330,0	
Estadística	Réplicas de cada inyección	Tiempo de respuesta [min]
	3	5,725 ± 0,078

En la tabla 3.11 se presentaron los tiempos de retención de la 4-Metil Umbeliferona ($t_R = 5,7$ min) y de su reactivo limitante; 2,4-Dihidroxi Acetofenona ($t_R = 1,54$ min) que demuestran una adecuada separación como se muestra en la figura AVI.1 del anexo VI. Pese a este logro no se identificó a la cumarina porque no se produjo esta en las mezclas reactivas obtenidas por el método convencional y el no convencional.

3.3.3 CUANTIFICACIÓN DE LAS CUMARINAS SINTETIZADAS

El método de análisis que permitió la detección y cuantificación de la cumarina y de su correspondiente mezcla reactiva es la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). La cuantificación se realizó mediante una curva de

calibración a partir de una solución madre estándar del estándar correspondiente por dilución con metanol grado HPLC (*Aldrich Chemical Corporation*).

3.3.3.1 Construcción de la curva de calibración de la 1,2-Benzopirona por HPLC

En la tabla 3.12, se indican las respuestas generadas por el HPLC de los estándares preparados y analizados bajo las condiciones detalladas en la tabla 3.8. En la figura 3.11, se muestra la curva de calibración de la 1,2-Benzopirona a 274 nm.

Tabla 3.12. Datos generados en HPLC para la construcción de la curva de calibración de la 1,2-Benzopirona a $\lambda = 274$ nm

Concentración* [μ M]	Área bajo la curva
12,25	3 257 040
18,38	4 237 382
30,64	6 576 867
49,02	11 314 026

(*Rodríguez et al., 2008, 14to. párrafo)

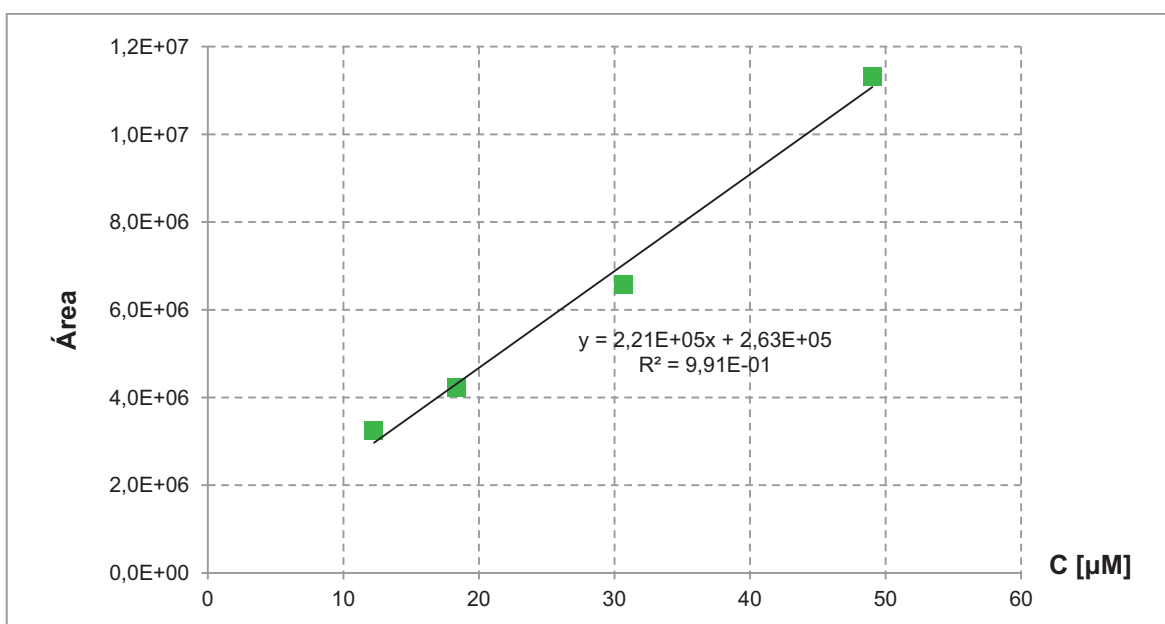


Figura 3.11. Curva de calibración de la 1,2-Benzopirona a $\lambda = 274$ nm en el HPLC-UV

3.3.3.2 Construcción de la curva de calibración de la Etil 3-Carboxi Cumarina por HPLC

En la figura 3.12, se observa la curva de calibración de la **ECC** a 290 nm. Además, en la tabla 3.13, se indican las respuestas generadas por el HPLC para cada concentración de los estándares preparados.

Tabla 3.13. Datos generados en HPLC para la construcción de la curva de calibración de la **ECC** a $\lambda = 290$ nm

Concentración [μM]	Área bajo la curva
7,51	1 960 972
11,26	3 138 861
17,64	5 355 294
21,77	6 417 517
31,15	9 451 212

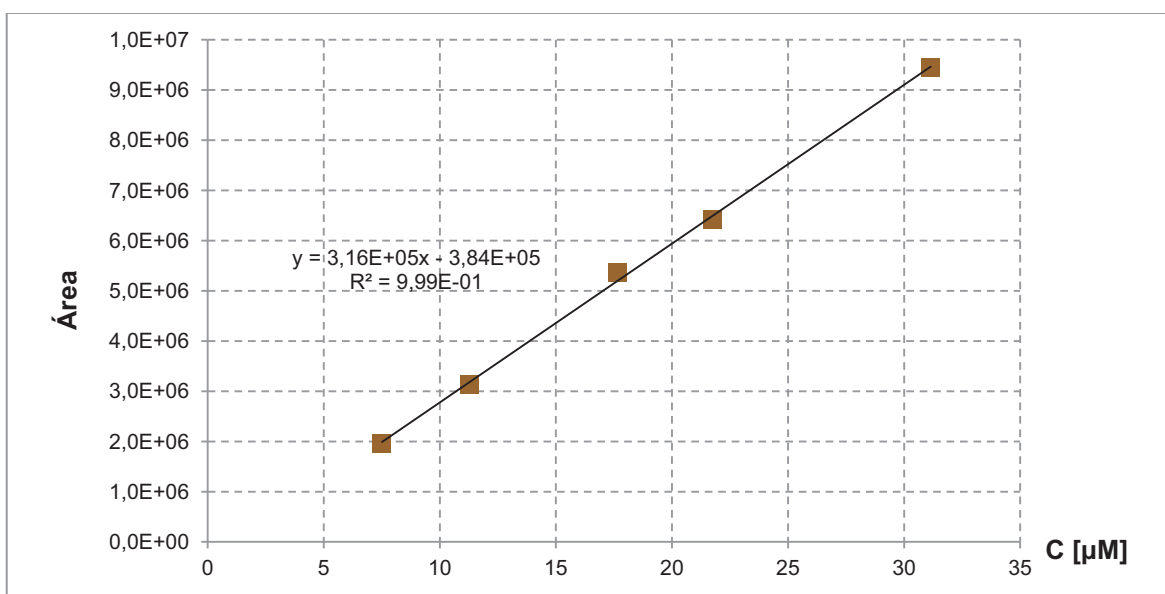


Figura 3.12. Curva de calibración de la **ECC** a $\lambda = 290$ nm en el HPLC-UV

Los datos presentados en la figura 3.12 se ajustan a la siguiente ecuación de una recta con un coeficiente $R^2 = 0,999$:

$$S = 316\,210,6 \times C - 384\,204,7 \quad [3.1]$$

Donde:

S: área bajo la curva en HPLC **C:** concentración de la **ECC**, [μM]

Mediante esta ecuación se cuantificaron los productos sintetizados por el método convencional y no convencional como se indican en los siguientes acápite.

3.3.3.3 Construcción de la curva de calibración de la 4-Hidroxi Cumarina por HPLC

En la tabla 3.14, se indican las respuestas generadas por el HPLC para cada estándar preparado. La figura 3.13 muestra la curva de calibración de la 4-Hidroxi Cumarina a 260 nm.

Tabla 3.14. Datos generados en HPLC para la construcción de la curva de calibración de la 4-Hidroxi Cumarina a $\lambda = 260$ nm

Concentración [μM]	Área bajo la curva
11,99	977 764
17,99	1 352 618
23,98	1 840 911
35,98	2 686 724
44,37	3 183 895

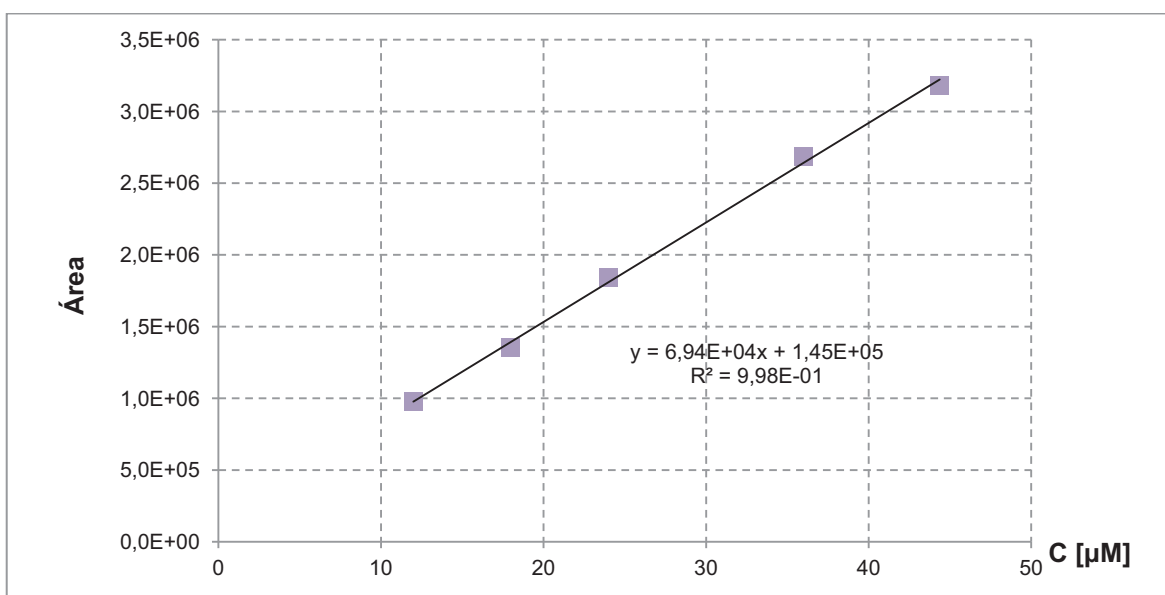


Figura 3.13. Curva de calibración de la 4-Hidroxi Cumarina a $\lambda = 260$ nm en el HPLC-UV

3.3.3.4 Construcción de la curva de calibración de la 4-Metil Umbeliferona por HPLC

En la figura 3.14, se indica la curva de calibración de la 4-Metil Umbeliferona a 330 nm y en la tabla 3.15, se muestran las respuestas generadas por el HPLC para cada concentración de los estándares preparados con metanol grado HPLC. El reactivo limitante en este caso la 2,4 di-hidroxi acetofenona, presentaba un mayor absorbancia que el producto seleccionado.

Tabla 3.15. Datos generados en HPLC para la construcción de la curva de calibración de la 4-Metil Umbeliferona a $\lambda = 330$ nm

Concentración [μM]	Área bajo la curva
9,95	2 464 763
14,92	2 924 625
19,89	4 145 908
29,84	7 878 277
39,79	9 496 648

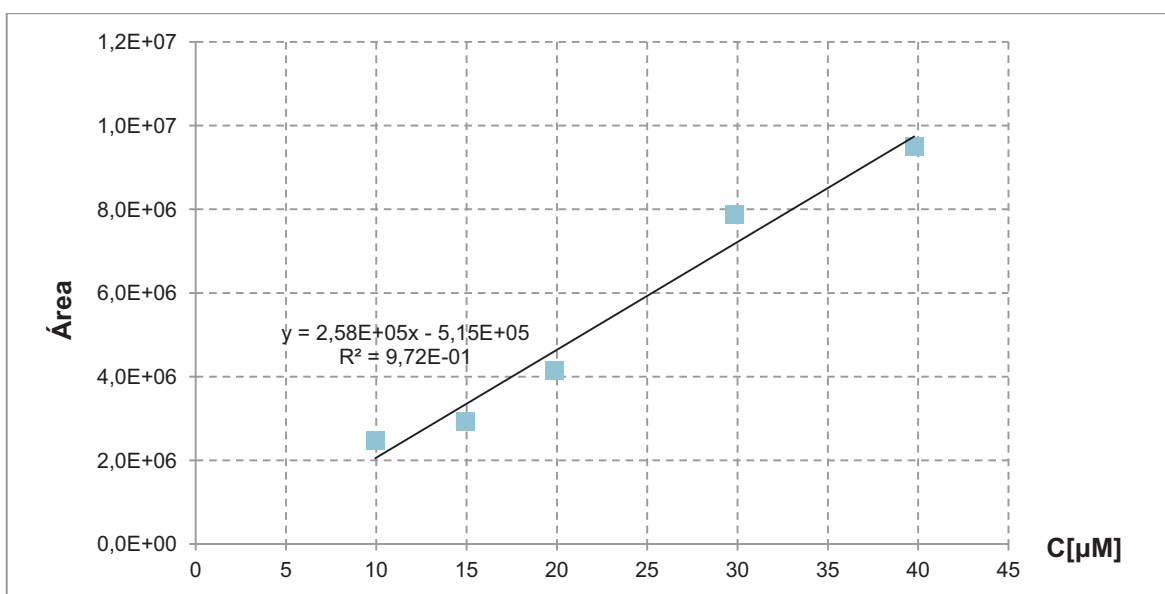


Figura 3.14. Curva de calibración de la 4-Metil Umbeliferona a $\lambda = 330$ nm en HPLC-UV

3.4 DESARROLLO DEL MÉTODO CONVENCIONAL PARA LA SÍNTESIS DE CUMARINAS MEDIANTE CONDENSACIÓN DE KNOEVENAGEL

3.4.1 SÍNTESIS CONVENCIONAL DE LA 1,2-BENZOPIRONA

Los ensayos probados se efectuaron con base en la revisión bibliográfica sobre estudios donde se reporta la síntesis de la 1,2-Benzopirona mediante la reacción de Perkin por reflujo con etanol (Austin, 1988, p. 578; Finar, 1975, p. 888; Noller, 1968, p. 387). En la tabla 2.11 se presentó el detalle general de las pruebas preliminares realizadas con la técnica convencional de síntesis, donde la cantidad de solvente varió en el rango de 80 a 90 % en volumen, en función de la cantidad total de reactivos utilizados (Austin, 1988, p. 579) para cada reacción desarrollada. Se desarrollaron las reacciones de Knoevenagel, Pechmann y Perkin.

Con los tres diferentes mecanismos de reacción probados, no se obtuvo el producto esperado. Una posible explicación de este hecho es que la selectividad compitió con la formación de sales o iminas, que son parte del proceso intermedio del mecanismo de la reacción, compuestos que justificarían los cambios físicos obtenidos de coloración y estado. En las figuras AVII.1 y AVII.2 del anexo VII se pueden observar las diferencias entre ellas debido al mecanismo de reacción seleccionado. La reacción de ciclación de las cumarinas se da por la inestabilidad del ácido intermedio que se forma, la activación del carbono alfa y los hidrógenos próximos.

Se definió como reactivo limitante al salicilaldehído porque se observó que su absorbancia podría interferir con el análisis del producto como se indicó en el espectro UV de la figura 3.3. Además, por la posible reacción de competencia entre este aldehído y el catalizador que es una amina secundaria, se deben usar menores concentraciones para evitar la formación de los subproductos que dependen de este reactivo y podrían limitar la síntesis de la 1,2-Benzopirona (Finar, 1980, p. 777).

3.4.2 SÍNTESIS CONVENCIONAL DE LA ETIL 3-CARBETOXI CUMARINA

Como se indicó en la tabla 2.12, se probaron dos diferentes catalizadores: la piperidina y el ácido clorhídrico. Por un lado, un catalizador básico orgánico que produjo una coloración amarilla y la cristalización de la **ECC** como se observa en las figuras AVII.3 y AVII.5. Por otro lado, un catalizador ácido inorgánico que solo presentó un color rosado en la mezcla reactiva final, como se denota en las figuras AVII.4 y AVII.5. Es así, que se concluyó que, el catalizador es uno de los factores a probarse en la síntesis y por medio de las revisiones bibliográficas se determinó que el otro factor debía ser el tiempo de calentamiento. Este factor térmico en el caso de la síntesis convencional no presentó diferencia significativa en la producción de la **ECC**, por ello solo se aplicó en la síntesis no convencional.

Adicionalmente a las condiciones expuestas en tabla 2.12 se probaron diferentes composiciones molares entre los reactivos para hallar la mejor combinación que favorezca la producción de la **ECC** y disminuya las interferencias de las posibles reacciones paralelas entre el derivado del salicilaldehído y la amina secundaria que se usó como catalizador de la reacción. Otra parte, de los ensayos preliminares fue probar concentraciones de la piperidina del 0,5 % molar y 2,5 % molar para establecer los límites de esta variable.

La base de la selección del límite inferior fue obtener una diferencia cuantificable entre la conversión inicial alcanzada por el efecto catalítico y conversión final posterior al calentamiento. El fundamento para la selección del límite superior fue limitar la producción del compuesto entre el catalizador (piperidina) y el reactivo limitante (salicilaldehído).

A partir de lo expuesto y el resumen presentado en la tabla 2.12 se determinó la variable a evaluar (cantidad de catalizador) y sus niveles (3 porcentajes molares). Estas condiciones del diseño experimental para la síntesis convencional de la **ECC** por reflujo se indican en la tabla 3.16.

Tabla 3.16. Parámetros del diseño experimental desarrollado para la síntesis convencional de la **ECC** mediante reflujo

VARIABLE	NIVELES		
Producto	ECC		
Catalizador	Piperidina		
Factor 3 × 1	Cantidad de catalizador [% mol]		Tiempo de reflujo [min]
Niveles	1,0	1,5	2,0
Total de combinaciones	3		
Total de reacciones	9		
Análisis totales en HPLC	27 (total de inyecciones)		
Parámetro estadístico	Nivel de confianza [%]		Coefficiente de error [%]
	95,0 *		25,0
Parámetros de la síntesis	Relación molar [mol / mol]		Cantidad de solvente [%]
	2 / 3 **		90,0
Tipo de reactivos	Reactivo Limitante		Reactivo en exceso
	Salicilaldehído		Malonato de Dietilo

* StatPoint, 2010 (Schoenbach, Schildkraut y Rosamond, 2004, p. 303)

** El reactivo limitante es el Salicilaldehído

En la tabla 3.17 se indican todos los resultados obtenidos por el desarrollo del diseño experimental.

Tabla 3.17. Resultados de las dos variables de salida para cada réplica del diseño experimental aplicado a la síntesis convencional de la **ECC** por reflujo a t = 100 min

Réplica [#]	Cantidad de catalizador [% mol]	Variación de la Conversión [%]	Conversión Total [%]
1	1,0	62,13	77,78
	1,5	83,01	98,43
	2,0	68,66	94,36
2	1,0	82,88	89,83
	1,5	58,29	68,87
	2,0	61,70	76,53
3	1,0	53,21	63,29
	1,5	67,88	74,20
	2,0	54,68	66,98

El diseño experimental fue evaluado a través de dos variables de salida: la variación de la conversión y la conversión total. La primera para analizar el efecto térmico y la segunda para valorar el efecto combinado entre el método de calentamiento y la catálisis por la piperidina.

Se utilizó el Software STATGRAPHICS Centurion XV.II versión 2010, con el fin de generar las tablas ANOVAs 3.18 y 3.19 de la Variación de la Conversión y de la Conversión Total, respectivamente, a partir de los resultados indicados en la tabla 3.9 para el procesamiento estadístico de los mismos.

Tabla 3.18. ANOVA para la Variación de la Conversión por la Cantidad de piperidina para la síntesis de la ECC, mediante reflujo

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón - <i>F</i>	Valor - <i>P</i> *
Entre grupos	97,3971	2	48,6985	0,34	0,7278
Dentro de grupos	871,855	6	145,309		
Total (corregido)	969,252	8			

* Si el valor-P es inferior a 0,05, el factor desarrollado tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de salida analizada con un nivel de confianza del 95 % por defecto del programa utilizado StatPoint-versión 2010.

El ANOVA de la Variación de la Conversión, es decir, el rendimiento de la reacción por el efecto de la técnica de calentamiento, permitió determinar que el rango de concentraciones (1,0; 1,5; 2,0 % mol) de la piperidina no presentó una diferencia estadísticamente significativa para el método convencional de reflujo por 100 min; lo cual se puede observar en la figura 3.19, donde la tendencia llega a ser casi constante para las dos variables de salida analizadas.

Tabla 3.19. ANOVA para la Conversión Total por la Cantidad de piperidina para la síntesis de la ECC, mediante reflujo

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón - <i>F</i>	Valor - <i>P</i> *
Entre grupos	19,3464	2	9,67321	0,05	0,9545
Dentro de grupos	1 235,87	6	205,978		
Total (corregido)	1 255,21	8			

* Si el valor-P es inferior a 0,05, el factor desarrollado tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de salida analizada con un nivel de confianza del 95 % por defecto del programa utilizado StatPoint-versión 2010.

La ANOVA generada para la Conversión Total, es decir, para el rendimiento de la reacción por el efecto combinado entre el catalizador y el calentamiento, permitió determinar que el rango de concentraciones de la piperidina no presentó una diferencia estadísticamente significativa para la técnica convencional de reflujo, como se confirma en la figura 3.19, tanto para la evaluación de la variación de la conversión como para la conversión total.

Se observó que con la reacción modelo de la Condensación de Knoevenagel, se produjo una mezcla reactiva final amarilla, cuya fotografía se presenta en la figura AVII.3 y con la reacción de Pechmann se observó un color rosado, como se muestra en la figura AVII.4.

Además, para comparar el resultado final con cada mecanismo se presentan estas mezclas reactivas finales frías en la figura AVII.5 del anexo VII, donde se observa que en la primera se obtuvieron cristales que son la cumarina esperada; sin embargo, en la segunda no se formó.

En la tabla 3.20, se detallan los resultados de las conversiones obtenidas para la **ECC** mediante la aplicación del método convencional de reflujo durante 100 min como el tiempo establecido para las tres cantidades de catalizador.

Tabla 3.20. Conversiones alcanzadas para la síntesis de la **ECC** por reflujo durante 100 min

Cantidad de Piperidina [% mol]	Variación de la Conversión* [%]	Conversión Total [%]	Desviación estándar [%]		Coeficiente de error [%]	
1,0	66,07	76,97	15,2	13,3	23,04	17,27
1,5	69,73	80,50	12,5	15,8	17,87	19,57
2,0	61,68	79,29	7,0	13,9	11,33	17,53
	Variable 1	Variable 2	Variable 1	Variable 2	Variable 1	Variable 2

*La **variable 1** resulta de la diferencia entre la conversión final (**variable 2**) y la conversión alcanzada por efecto del catalizador sin calentamiento.

En el anexo VIII se justifica el valor del coeficiente de error que se estableció en un 25 %. Las razones principales, para permitir que el error experimental supere el 10 % que se usa generalmente (Schoenbach et al., 2004, p. 289), fueron:

- El calentamiento por las resistencias eléctricas del Soxhlet dependió de la posición ocupada por cada balón en el equipo.
- La síntesis se desarrolló en un horno microondas doméstico, cuya radiación no es homogénea por ser multi-modo.
- La heterogeneidad en el calentamiento de la mezcla reactiva aumenta con la carencia de un sistema de agitación interna en el reactor de teflón.

La tendencia de la conversión total y de la variación de la conversión con la cantidad de catalizador se muestra en la figura 3.15, para la síntesis convencional de la **ECC**.

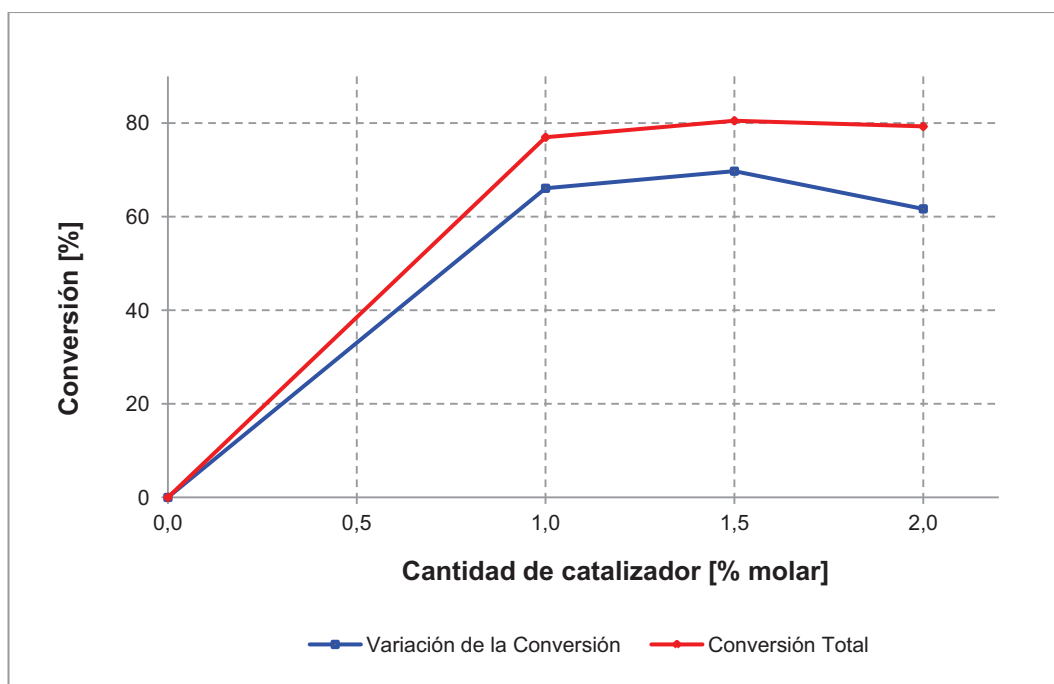


Figura 3.15. Rendimiento del método convencional para la producción de **ECC**, en función de la cantidad de catalizador añadida

La mejor cantidad de catalizador en el método convencional de reflujo fue 1,0 % mol, como se observa en la figura 3.15, porque a valores superiores, los resultados estadísticamente son semejantes para la producción de la **ECC**.

En el presente estudio se alcanzó una conversión total máxima del 80,5 % en 100 min de reflujo con etanol absoluto. En investigaciones realizadas por otros autores, mediante la aplicación de la misma técnica de calentamiento, con el uso de etanol como solvente y el mismo mecanismo de reacción, la Condensación de Knoevenagel, se reporta una conversión del 71 % en 20 min de reflujo para la síntesis de la **ECC** (Westaway y Gedye, 1995, p. 29).

Los valores promedios de las dos variables de salida analizadas: la conversión total alcanzada y la variación de la conversión, entre el tiempo cero y el tiempo final de calentamiento, se presentaron en la tabla 3.20, para el producto obtenido. En la tabla 3.21 se indica la variación de la concentración del reactivo limitante entre la mezcla reactiva previa al calentamiento y después del mismo para analizar su consumo final.

Tabla 3.21. Disminución de la concentración del Salicilaldehído mediante el método convencional de reflujo durante 100 min

Cantidad de Piperidina [% mol]	Consumo Final [%]	Desviación estándar [%]	Coficiente de error [%]
1,0	95,24	2,062	2,16
1,5	93,72	1,121	1,20
2,0	94,22	1,207	1,28

En la figura 3.16 se presenta la tendencia del consumo del salicilaldehído (el reactivo limitante) en función de la cantidad de catalizador. En esta gráfica se observa que con 1,0 % mol de piperidina se logra la máxima conversión del salicilaldehído, cantidad de catalizador que se confirmó estadísticamente como la mejor para la producción de la **ECC**.

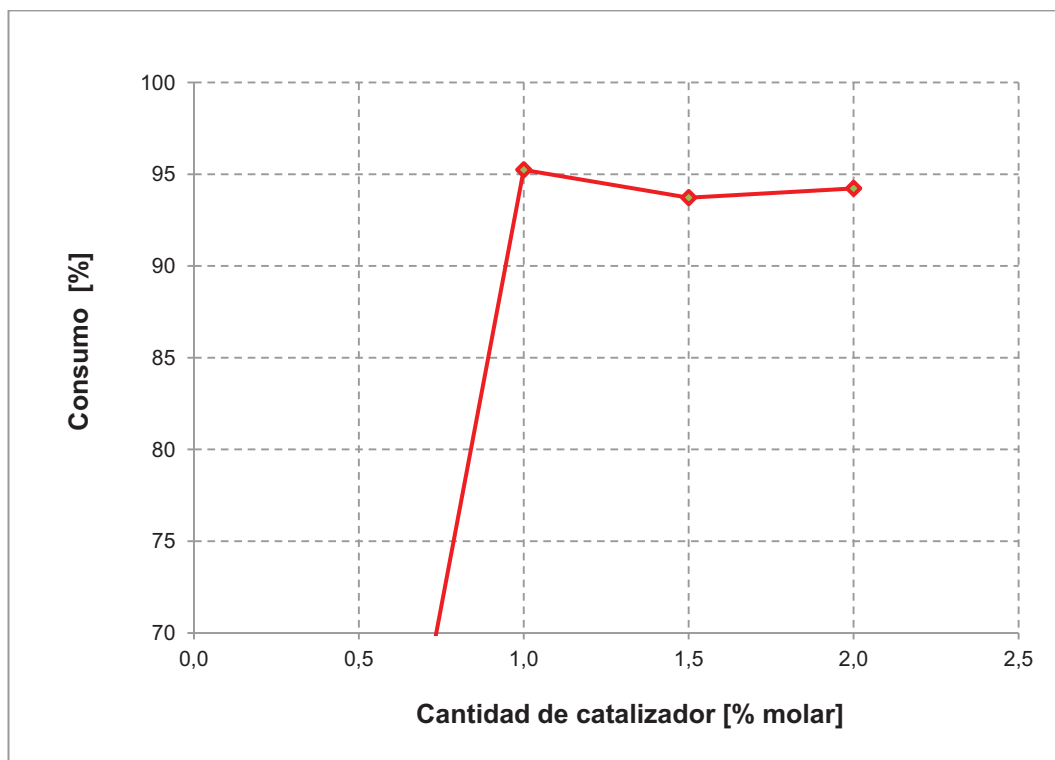


Figura 3.16. Consumo del Salicilaldehído en función de la cantidad de piperidina, por la técnica de reflujo

En la figura 3.16 se observa que la tendencia del consumo del reactivo limitante es similar a la producción de la **ECC**. Sin embargo, en magnitud se notan ciertas diferencias entre el consumo y la conversión porque el máximo valor reportado para el reactivo es de 95,24 % y la mayor producción de **ECC** fue de 80,5 %; es decir, esto demuestra que existen reacciones paralelas que no producen el producto esperado.

3.4.3 SÍNTESIS CONVENCIONAL DE LA 4-HIDROXI CUMARINA

En la tabla 2.13 se presentó el detalle general de las pruebas realizadas con la técnica convencional de reflujo para la síntesis de la 4-Hidroxi Cumarina, mediante la Condensación de Knoevenagel. Después de realizar las pruebas descritas no se obtuvo el producto esperado.

Además, se realizaron mezclas reactivas finales con conversiones teóricas de 5, 10, 20 y 50 % para compararlas con las obtenidas luego de los 100 min de reflujo. Las pruebas comparativas consistieron en verificar tanto propiedades físicas, a través de los cambios de color y solubilidad en etanol absoluto, como propiedades químicas mediante el análisis en HPLC para identificar los picos característicos de cada compuesto involucrado.

Después de los ensayos antes expuestos se confirmó que la 4-Hidroxi Cumarina no se pudo producir mediante la Condensación de Knoevenagel por el método convencional de reflujo. Las razones que determinan estos resultados se deben al uso del reactivo por los argumentos expuestos en el acápite 3.4.1 correspondiente a esta primera cumarina seleccionada, puede aplicarse porque el mecanismo es semejante y el reactivo involucrado en común es el acetato de etilo.

3.4.4 SÍNTESIS CONVENCIONAL DE LA 4-METIL UMBELIFERONA

En la tabla 2.14 se indicaron las condiciones generales de las pruebas realizadas con la técnica convencional de reflujo para la síntesis de la 4-Metil Umbeliferona. Esta cumarina seleccionada no se obtuvo mediante la reacción modelo, estos resultados también se obtuvieron con el uso del acetato de etilo como reactivo. Se confirmó este hecho porque en la **ECC** se utilizó el dietil malonato cuya distribución de los dipolos favoreció la producción, lo cual confirma que este reactivo no se puede usar para la síntesis de cumarinas mediante la Condensación de Knoevenagel.

Para confirmar que el acetato de etilo no es un reactivo apropiado para la obtención de la 4-Metil Umbeliferona mediante la Condensación de Knoevenagel, se realizaron mezclas reactivas finales con conversiones teóricas de 5, 10, 20 y 50 % para compararlas con las obtenidas por reflujo. Las comparaciones fueron de color, solubilidad en etanol absoluto y ubicación de los picos característicos de cada compuesto mediante análisis de HPLC-UV.

3.5 DESARROLLO DEL MÉTODO DE SÍNTESIS DE CUMARINAS, MEDIANTE CONDENSACIÓN DE KNOEVENAGEL, POR RADIACIÓN DE MICROONDAS

La técnica no convencional de síntesis por radiación de microondas representa un método alternativo para introducir la energía necesaria en ciertas reacciones. Es posible obtener una adecuada selectividad o conseguir resultados no accesibles con la calefacción clásica de reflujo (Díaz et al., 1999, p. 27).

El uso de la sílica gel como soporte en una cantidad mínima de 0,1 g por gramo de mezcla reactiva (McKillop y Young, 1979, p. 415), permite aumentar la seguridad del proceso y retirar el agua generada por la reacción para mejorar el rendimiento de la misma. Este soporte inerte cataliza ciertas reacciones como la Condensación de Knoevenagel según la bibliografía investigada (De la Cruz et al., 1996, p. 1 114). No obstante, los resultados preliminares indicaron que el soporte inerte no influía en el rendimiento de la reacción y representaba un obstáculo para el análisis de la conversión total por el fenómeno de adsorción.

Para la síntesis no convencional, el diseño experimental consideró dos variables, una más que el desarrollado para la síntesis convencional. Las variables consideradas fueron la cantidad de catalizador, en porcentaje molar, y el tiempo de irradiación, en minutos. Según bibliografía el uso de catalizadores heteropoliácidos en todo método libre de solvente evita el consumo de ácidos minerales altamente contaminantes como el ácido sulfúrico, acético glacial, fosfórico o fluorhídrico (Bennardi et al., 2007, p. 124); por ello, se utilizó piperidina como catalizador, porque esta amina secundaria heterocíclica es un fuerte solvente orgánico catalogado como precursor químico.

Todas las síntesis no convencionales finales se desarrollaron mediante la MO durante tiempos de irradiación determinados, al nivel 10 de potencia (1 200 W) (Kingston y Jassie, 1988, p. 11).

3.5.1 SÍNTESIS NO CONVENCIONAL DE LA 1,2-BENZOPIRONA

La Condensación de Knoevenagel mediante la formación del ácido cumarínico correspondiente al isómero *cis*, compuesto intermedio para la formación de la cumarina mediante su ciclación (Bogdal, 1998, 4to. párrafo) no se produjo para el caso de la síntesis no convencional de la 1,2-Benzopirona.

Se probaron dos diferentes catalizadores: una base orgánica débil (piperidina) y una base inorgánica (NaOH) sin lograrse la producción de la 1,2-Benzopirona tanto por la síntesis no convencional como por la convencional. La piperidina se utilizó por la reacción modelo (Bogdal, 1998, 5to. párrafo) y el hidróxido de sodio con base en la hipótesis de que los reactivos debían ser orientados con mayor fuerza. Se probaron diferentes concentraciones molares del hidróxido diluido en etanol absoluto y las mezclas reactivas resultantes presentaron cambios físicos de color y estado de agregación como se indican en las fotos de las figuras AIX.1 y AIX.2 del anexo IX.

3.5.2 SÍNTESIS NO CONVENCIONAL DE LA ETIL 3-CARBETOXI CUMARINA

En la figura 3.17 se presenta la reacción de la Condensación de Knoevenagel con el ácido cumarínico correspondiente al isómero *cis*, compuesto intermedio previa su ciclación para la formación de la **ECC** (Bogdal, 1998, 4to. párrafo).

El diseño experimental de dos factores se justifica porque la técnica de irradiación de microondas depende de la energía entregada según el nivel de potencia y el tiempo de irradiación y de la cantidad utilizada de catalizador, cuyo detalle se indica en la tabla 3.22.

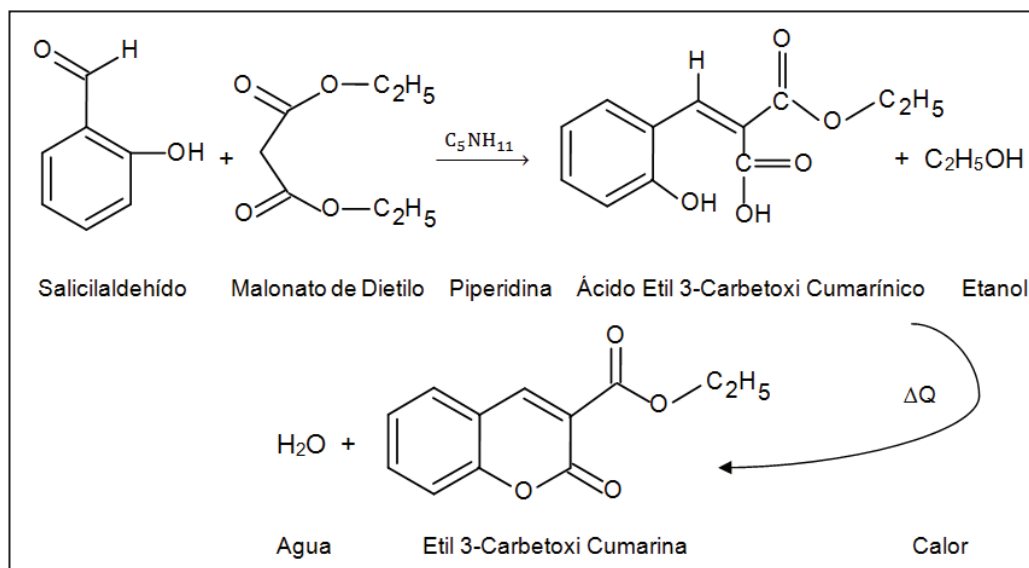


Figura 3.17. Esquema de la Condensación de Knoevenagel para la síntesis de la ECC

La tabla 3.22 presenta el diseño experimental que se generó por las pruebas preliminares para la síntesis de la **ECC** por calentamiento no convencional y se estableció como reactivo limitante al salicilaldehído porque existe una reacción de competencia entre este reactivo y el catalizador, que dio como subproducto una imina de color amarillo-anaranjado (Kerrigan, 2001, 1er. párrafo).

Tabla 3.22. Parámetros del diseño experimental desarrollado para la síntesis de la **ECC** por radiación de microondas

PARÁMETRO	DATO					
Producto	ECC					
Catalizador	Piperidina					
Factores $[3]^2$	Cantidad de catalizador [% mol]			Tiempo de irradiación [min]		
Niveles	1,0	1,5	2,0	0,5	1,0	2,0
Total de combinaciones	9 × 3					
Análisis totales en HPLC	81 (total de inyecciones)					
Parámetro estadístico	Nivel de confianza [%]			Coeficiente de error [%]		
	95,0 *			25,0		
Parámetros de la síntesis	Relación molar [mol / mol]			Nivel de Potencia [#]		
	2 / 3 **			10 (1 200 [W])		
Tipo de reactivos	Reactivo Limitante			Reactivo en exceso		
	Salicilaldehído			Malonato de Dietilo		

* StatPoint, 2010 (Schoenbach et al., 2004, p. 303)

** El reactivo limitante es el Salicilaldehído

Los resultados obtenidos por la aplicación del diseño experimental, para el desarrollo de la síntesis por radiación de microondas, se indican en la tabla 3.23 y corresponden a las 3 réplicas de las 9 combinaciones posibles.

Tabla 3.23. Datos de cada réplica de todas las combinaciones generadas por el diseño experimental para la síntesis por MO de la ECC

Réplica [#]	Tiempo de irradiación [min]	Cantidad de catalizador [% mol]	Variación de la Conversión [%]	Conversión Total [%]
1	0,5	1,0	26,14	30,33
	0,5	1,5	33,63	47,62
	0,5	2,0	44,63	61,42
	1,0	1,0	39,00	42,97
	1,0	1,5	58,89	63,72
	1,0	2,0	69,63	76,74
	2,0	1,0	29,83	35,41
	2,0	1,5	34,25	45,46
	2,0	2,0	35,86	53,83
2	0,5	1,0	30,12	33,17
	0,5	1,5	34,37	46,46
	0,5	2,0	40,48	42,14
	1,0	1,0	41,66	57,38
	1,0	1,5	41,84	60,83
	1,0	2,0	77,35	93,99
	2,0	1,0	46,98	48,94
	2,0	1,5	57,01	59,05
	2,0	2,0	40,49	53,52
3	0,5	1,0	24,30	26,76
	0,5	1,5	38,28	51,90
	0,5	2,0	44,25	51,46
	1,0	1,0	46,52	54,73
	1,0	1,5	53,06	57,77
	1,0	2,0	84,49	98,18
	2,0	1,0	37,30	43,76
	2,0	1,5	47,99	52,38
	2,0	2,0	39,25	52,36

A partir de los datos indicados en la tabla 3.23, se calculó la estadística en función de las medias de las réplicas de cada combinación. Los valores determinados se presentan en la tabla 3.24. Además, para evaluar el diseño experimental desarrollado se utilizó un software que permitiera analizar el efecto de cada variable y de su combinación.

Para analizar el diseño experimental, se utilizó el programa STATGRAPHICS Centurion XV.II versión 2010 *StatPoint y se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas mediante la generación de la tabla ANOVA para las dos variables de salida, a partir de los resultados indicados en la tabla 3.24. Se obtuvieron las tablas 3.24 y 3.25 de la Variación de la Conversión y de la Conversión Total, respectivamente.

Tabla 3.24. ANOVA para la Variación de la Conversión para la síntesis de la **ECC** por radiación de microondas

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón - <i>F</i>	Valor - <i>P</i> *
EFECTO PRINCIPAL					
A: Tiempo de irradiación	2 291,86	2	1 145,93	27,41	0,0000
B: Cantidad de catalizador	1 327,50	2	663,751	15,88	0,0001
INTERACCIÓN					
AB	1 160,04	4	290,010	6,94	0,0015
RESIDUAL	752,539	18	41,8077		
TOTAL (corregido)	5 531,94	26			

* Si el valor-P es inferior a 0,05, el factor desarrollado tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de salida analizada con un nivel de confianza del 95 % por defecto del programa utilizado StatPoint-versión 2010.

Del ANOVA para la Variación de la Conversión, se determinó que la cantidad de piperidina influyó en la producción de la **ECC**, ya que los valores de la variable presentaron una diferencia estadísticamente significativa con el método no convencional; además, se estableció que el tiempo de irradiación fue un factor determinante porque se puede observar una diferencia estadísticamente significativa para esta variable y para el efecto combinado de las dos variables analizadas.

Tabla 3.25. ANOVA para la Conversión total para la síntesis de la **ECC** por radiación de microondas

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	Razón - F	Valor - P *
EFECTO PRINCIPAL					
A: Tiempo de irradiación	2 785,85	2	1 392,93	31,21	0,0000
B: Cantidad de catalizador	2 457,71	2	1 228,85	27,53	0,0000
INTERACCIÓN					
AB	921,429	4	230,357	5,16	0,0060
RESIDUAL	803,366	18	44,6315		
TOTAL (corregido)	6 968,35	26			

* Si el valor-P es inferior a 0,05, el factor desarrollado tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la variable de salida analizada con un nivel de confianza del 95 % por defecto del programa utilizado StatPoint-versión 2010.

De igual manera, para la Conversión Total, se determinó que los dos factores analizados (tiempo de irradiación y cantidad de catalizador) y la combinación de ellos influyeron en la producción de la **ECC**, ya que los valores de las variables de salida (variación de la conversión y conversión total) presentaron una diferencia estadísticamente significativa para la síntesis por radiación de microondas.

Como parte del diseño experimental se decidió evaluar dos variables de salida: la conversión total alcanzada y la variación de la conversión. La primera para calcular el rendimiento final de la reacción por efecto combinado entre la irradiación de MO y la presencia del catalizador, y la segunda para establecer la producción entre el tiempo cero y el final de la irradiación por el “efecto microondas”.

La aplicación de la MO sin solvente para síntesis no convencional de la **ECC** generó 18 resultados que corresponden a las 9 combinaciones del diseño experimental completo para las 2 variables de salida, cuyos resultados se detallan en la tabla 3.26 con la estadística descrita y corresponden a los valores promedios de los datos que fueron presentados en la tabla 3.23.

Tabla 3.26. Valores alcanzados de la Variación de Conversión y de la Conversión Total en la síntesis de la **ECC** por MO para cada combinación del diseño experimental, con los valores de los parámetros estadísticos considerados

Tiempo de irradiación [min]	Cantidad de Piperidina [% mol]	Variación de la Conversión* [%]	Conversión Total [%]	Desviación estándar [%]		Coeficiente de error [%]	
				Variable 1	Variable 2	Variable 1	Variable 2
0,5	1,0	26,85	30,09	2,97	3,21	11,08	10,68
0,5	1,5	35,43	48,66	2,50	2,87	7,05	5,89
0,5	2,0	43,12	51,67	2,29	9,64	5,32	18,66
1,0	1,0	42,39	51,69	3,81	7,67	8,99	14,84
1,0	1,5	51,26	60,77	8,67	2,98	16,90	4,90
1,0	2,0	77,16	89,64	7,43	11,36	9,63	12,68
2,0	1,0	38,04	42,70	8,60	6,83	22,61	15,99
2,0	1,5	46,42	52,30	11,46	6,80	24,69	12,99
2,0	2,0	38,53	53,24	2,40	0,77	6,22	1,46
		Variable 1	Variable 2	Variable 1	Variable 2	Variable 1	Variable 2

*La **variable 1** se calcula por diferencia entre la conversión total (**variable 2**) y la conversión alcanzada por efecto del catalizador sin incidencia de la radiación de microondas.

En las figuras 3.14 y 3.15, se observan las tendencias de la Variación de la Conversión y de la Conversión Total en función de la cantidad de catalizador y del tiempo de irradiación, para la **ECC**. Estas gráficas indican la interacción entre los factores analizados y la influencia de ellos en la producción de la cumarina seleccionada.

La variable 1 se presenta en la figura 3.14 e indica la producción alcanzada por efecto de la radiación de microondas y en la figura 3.16, la variable 2 representa la conversión producida por el catalizador y la irradiación. La Conversión Total se genera por el efecto de la irradiación y de la cantidad de piperidina, cuyo valor máximo fue de 89,6 % para la síntesis de la **ECC** a 1,0 min de irradiación y 2,0 % mol de catalizador.

En las figuras 3.18 y 3.19 se observó el “efecto microondas” en la cinética de la reacción que se traduce en el descenso de la conversión una vez superado el 1 min de irradiación, efecto que se detalló en el acápite 1.3.4.

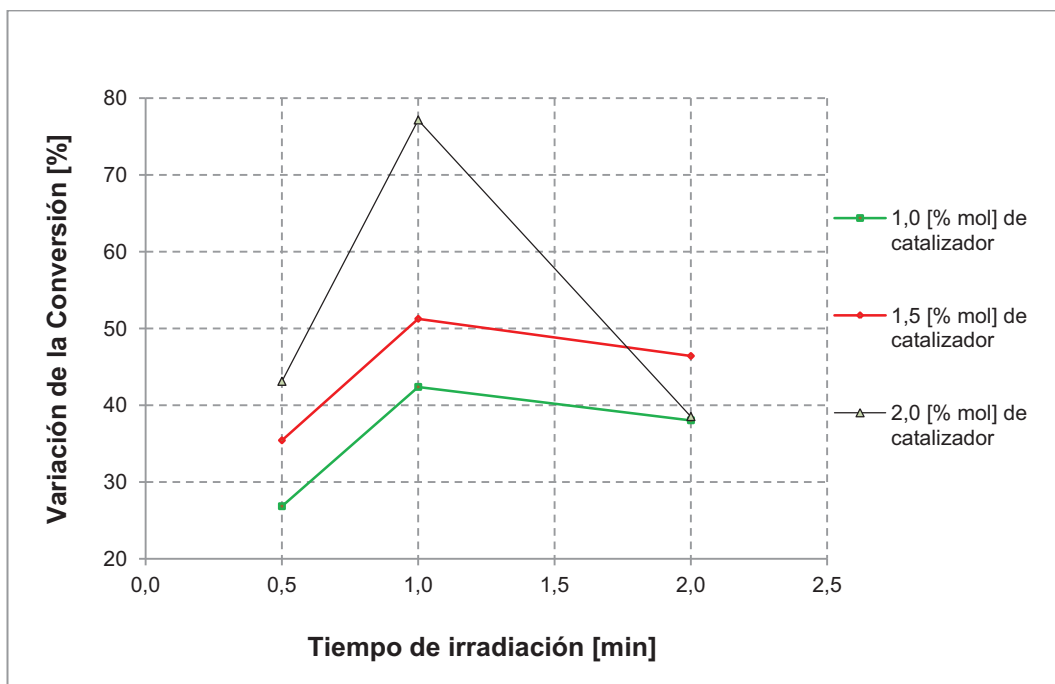


Figura 3.18. Variación de la conversión de la ECC en función del tiempo de irradiación para diferentes concentraciones de catalizador para la síntesis por radiación de MO

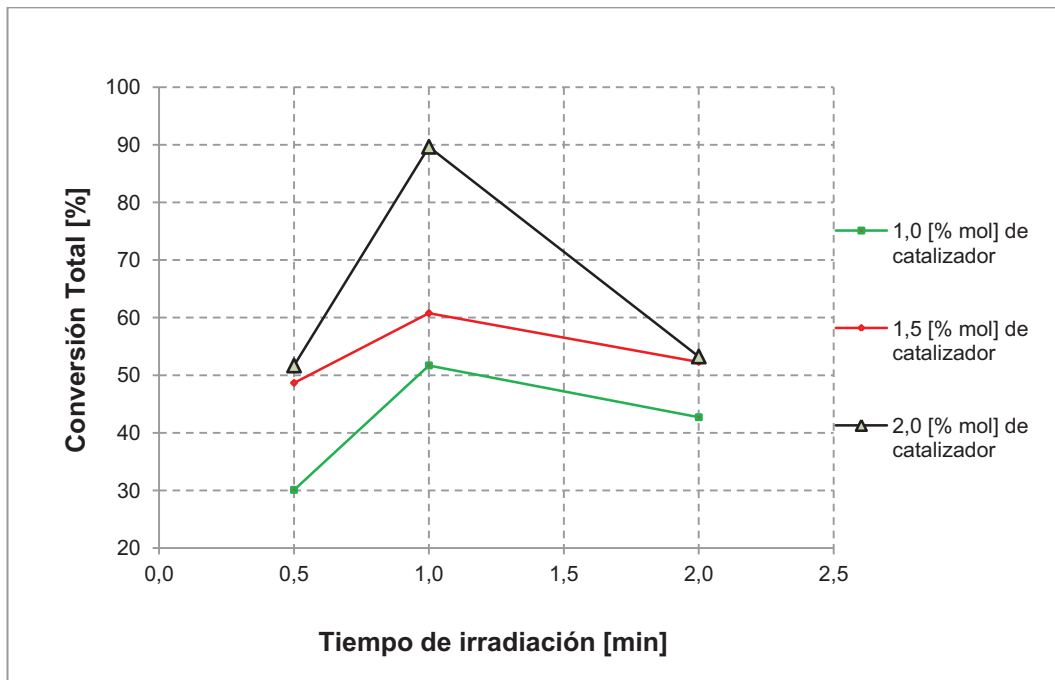


Figura 3.19. Conversión total de ECC en función del tiempo de irradiación para cada cantidad de catalizador por síntesis en MO

Las figuras 3.18 y 3.19 permitieron confirmar que la mejor combinación de los factores analizados fue de 1,0 min de irradiación y 2,0 % mol de catalizador para la síntesis de **ECC** mediante Condensación de Knoevenagel, con calentamiento por radiación de microondas.

La cantidad de catalizador que permitió alcanzar la mayor conversión, con el método de radiación de microondas (2,0 % mol), es superior a la correspondiente con el método de calentamiento por reflujo (1,0 % mol), como se observa en las figuras 3.15 y 3.16 para la síntesis convencional, y en las figuras 3.18 y 3.19 para la no convencional.

En la tabla 3.27 se muestran los valores promedio del consumo del reactivo limitante para las 9 combinaciones generadas por los 3 niveles de los factores: tiempo de irradiación y la cantidad de piperidina. Estos resultados reportados permitieron graficar el consumo del salicilaldehído en función del tiempo de irradiación para la síntesis no convencional de la **ECC** y se presenta en la figura 3.20.

Tabla 3.27. Consumo del Salicilaldehído en la síntesis por MO para cada combinación del diseño experimental, con los valores de los parámetros estadísticos considerados

Tiempo de irradiación [min]	Cantidad de Piperidina [% mol]	Consumo Final [%]	Desviación estándar [%]	Coficiente de error [%]
0,5	1,0	88,90	3,735	4,20
0,5	1,5	79,04	2,709	3,43
0,5	2,0	81,16	2,698	3,32
1,0	1,0	87,66	6,252	7,13
1,0	1,5	65,56	5,877	8,96
1,0	2,0	71,07	10,116	14,23
2,0	1,0	80,52	5,743	7,13
2,0	1,5	74,29	9,786	13,17
2,0	2,0	88,12	6,027	6,84

Todos estos resultados del consumo del reactivo son mayores a los valores reportados de la producción de la **ECC** que se encuentran en la tabla 3.26. Esto indica la posible presencia de reacciones paralelas. En la figura 3.17, se observa que la tendencia de la variable analizada para el reactivo limitante, el salicilaldehído, en la producción de la **ECC**.

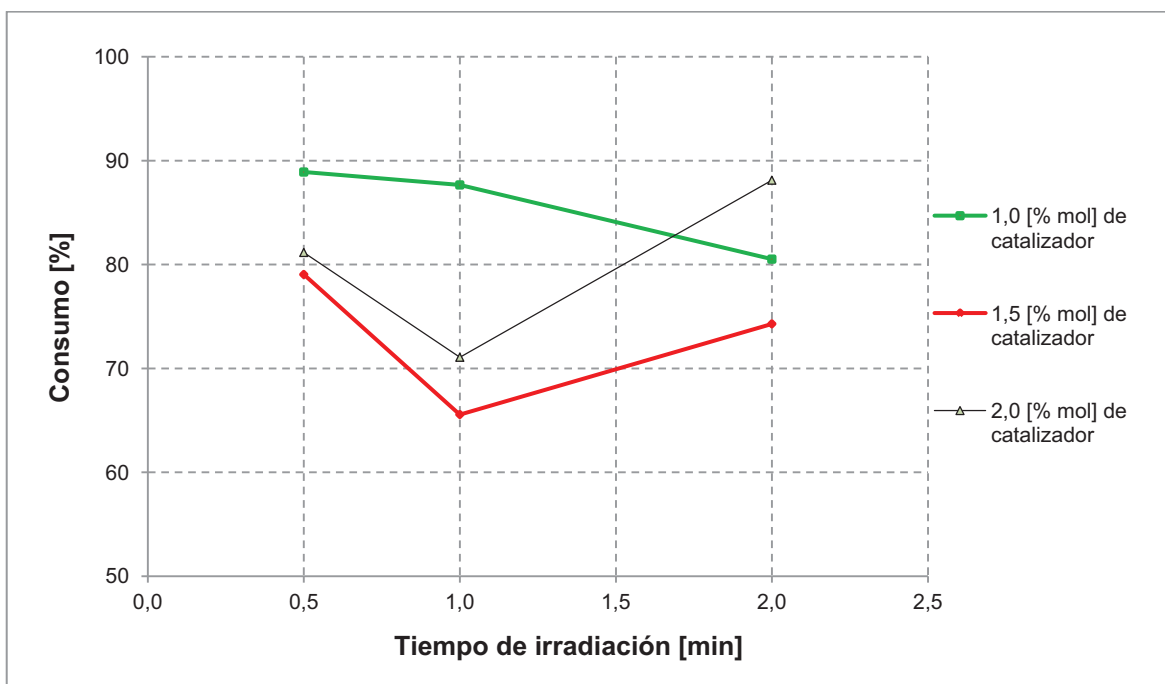


Figura 3.20. Consumo del Salicilaldehído para cada tiempo de irradiación para diferentes concentraciones de piperidina, por el método no convencional para la síntesis de la **ECC**

Los resultados de este estudio presentaron coeficientes de error menores al 25 % tanto para la conversión total como para la variación de la conversión y para el consumo del salicilaldehído. Estas conversiones se compararon con una investigación realizada por Westaway y Gedye en 1995 mediante el uso de un microondas con reflujo, que logró el 73 % de conversión en 8 min mediante la Condensación de Knoevenagel y con el uso de etanol como solvente (p. 220). Se observó que frente a las mejores condiciones de este trabajo (rendimiento del 89,6 % en 1 min), la conversión aumentó en un 22,8 % y que el tiempo disminuyó en un 87,5 % para la síntesis no convencional de la **ECC**.

Un estudio realizado por Westaway y Gedye para la síntesis de la **ECC** (1995) se comparó con la presente investigación (p. 219); pero el mayor reporte en

bibliografía se encuentra para aplicación de la radiación de microonda, en procesos de extracción de cumarinas a partir de ciertas plantas (Martino et al., 2006, p. 149; Tripti et al., 2009, p. 22). El mejoramiento de los procesos de extracción se da mediante el principio utilizado en la síntesis, la rapidez del calentamiento por el efecto térmico propio de la radiación de microondas.

3.5.3 SÍNTESIS NO CONVENCIONAL DE LA 4-HIDROXI CUMARINA

La reacción de la Condensación de Knoevenagel mediante la ciclación del ácido cumarínico correspondiente al isómero *cis* de la 4-Hidroxi Cumarina (Bogdal, 1998, 4to. párrafo).

Los resultados de la síntesis de la cumarina seleccionada podría indicar la presencia de reacciones de, por ejemplo, entre el ácido salicílico y la piperidina, porque los ácidos aromáticos pueden reaccionar con este tipo de bases orgánicas para producir una sal de estructura similar a una imina de coloración amarilla tenue, por efecto de la formación del carbanión (Kerrigan, 2001, 2do. párrafo; Organic Chemistry Portal, 2007, 9no. párrafo).

La piperidina es una base débil que resulta insuficiente para "orientar" el H- α no activo del carbono junto al grupo carbonilo, del acetato de etilo. En el caso del malonato de dietilo usado para la síntesis de la **ECC**, el H- α está activo porque los dos grupos carboxilos se retiran por la densidad electrónica y permite que este H sea más fácilmente separado.

Cuando no se tienen los dos grupos de activación que se necesitan, se puede usar una base más fuerte como el hidróxido de sodio. Sin embargo, no se logró la sintetizar la 1,2-Benzopirona, la 4-Hidroxi Cumarina y la 4-Metil Umbeliferona, ya que estos tres compuestos requieren del acetato de etilo como uno de los reactivos de la Condensación de Knoevenagel.

3.5.4 SÍNTESIS NO CONVENCIONAL DE LA 4-METIL UMBELIFERONA

La Condensación de Knoevenagel para la síntesis de la 4-Metil Umbeliferona se presenta en mediante el ácido cumarínico correspondiente al isómero *cis*, compuesto intermedio para la formación de la cumarina mediante su ciclación (Bogdal, 1998, 4to. párrafo).

La β -Metil Umbeliferona se puede obtener por la reacción de sustitución aromática electrofílica con un catalizador ácido (UNAM, 2011, 3er. párrafo), condensación de Pechmann–Duisberg a partir del resorcinol, compuesto fenólico, y del acetoacetato de etilo en presencia de ácido sulfúrico (Ballini et al., 2009, pp. 158-160).

La umbeliferona seleccionada no se sintetizó por el mecanismo desarrollado, por ello se buscaron alternativas en bibliografía. El mejor reporte fue la reacción entre la resorcina y el acetoacetato de metilo en presencia de ácido sulfúrico, el cual es un ejemplo muy característico de la reacción de Pechmann – Duisberg (UNAM, 2011, 2do. párrafo). No obstante, se puede usar otro ácido como catalizador para la síntesis por la MO (Ballini et al., 2009, p. 160).

Las pruebas detalladas en la tabla 2.18 para la síntesis de la 4-Metil Umbeliferona mediante Condensación de Knoevenagel, presentaron cambios de color probablemente asociados a la formación de una imina por la activación de la 2,4-Dihidroxi Acetofenona en presencia de una amina secundaria cíclica (El Khatib et al., 2006, p. 5; Organic Chemistry Portal, 2007, 7mo. párrafo).

3.6 EVALUACIÓN DE COSTOS

3.6.1 ANÁLISIS PRELIMINAR DE COSTOS E INVERSIÓN

Se compararon los resultados obtenidos mediante la técnica convencional y la técnica no convencional y se definieron los beneficios económicos y tecnológicos del método de radiación de microondas, para lo cual se calcularon: la conversión

total alcanzada, la variación de la conversión, la razón de disminución de los tiempos de calentamiento y los costos de cada técnica para la síntesis de cada cumarina seleccionada (Bogdal, 1998, 9no. párrafo).

Las tecnologías aplicadas a la síntesis orgánica presentan un gran auge a nivel mundial, por razones asociadas a los mercados y la aplicación de técnicas ambientalmente amigables con el medio (Loupy, 2003, p. 1).

En la tabla 3.28 se indica la cantidad real calculada con el valor de pureza reportado en la tabla 2.1 de cada reactivo usado para la síntesis de la **ECC**. Además, se presenta el consumo del salicilaldehído a partir de la cantidad inicial 0,042 mol, el consumo del malonato de dietilo con un exceso del 33,3 %, y el consumo del 2,0 % de catalizador que presentó la mayor conversión para la síntesis de la **ECC**.

Tabla 3.28. Densidad de los reactivos y cantidades utilizadas para la mejor conversión en la síntesis convencional y no convencional de la **ECC**

Compuesto	Volumen [mL]	Densidad [g/mL]	Masa [g]	Cantidad teórica [mol]	Cantidad real [mol]	Proporción [%]
Malonato de Dietilo	9,650	1,055	10,181	0,064	0,063	60,0 (2/3 molar)
Etanol Absoluto	132,210	0,792	104,710	2,273	2,227	90,0 (en volumen)
Piperidina	0,210	0,862	0,181	0,002	0,002	2,0 (molar total)
Salicilaldehído	4,830	1,146	5,535	0,044	0,042	40,0 (2/3 molar)
TOTAL	146,900	-----	120,607	2,383	2,334	-----

(American Chemical Society, 2010)

En la tabla 3.29 se indican los periodos necesarios para el desarrollo de la producción de la **ECC**, tanto por el método de reflujo como por radiación de microondas. Los intervalos de tiempos permiten determinar el número total de reacciones que se pueden llevar a cabo en un día de operación.

Tabla 3.29. Tiempos para cada subproceso experimental de la síntesis de la **ECC**, mediante Condensación de Knoevenagel

Técnica	Operación diaria [min]	Tiempo de calentamiento [min]	Tiempo de enfriamiento [min]	Tiempo de preparación * [min]	Tiempo de reposición ** [min]
Convencional	480	100	15	15	10
No convencional	480	1,0	15	10	15

* Tiempo necesario para medir la cantidad de cada reactivo y realizar las 3 agitaciones

** Reposición del agua para el vaso colocado en el centro del microondas y el cambio de reactor

La tabla 3.30 presenta la cantidad usada de cada reactivo para cada reacción de síntesis y los costos de ellos, en función del número de operaciones diarias para cada técnica, que se especifican en la tabla 3.19, y se derivaron de los precios indicados en la tabla 2.12 y de los datos detallados en la tabla 2.13.

Tabla 3.30. Costos del consumo diario de los reactivos para la síntesis de la **ECC**, mediante Condensación de Knoevenagel

Compuesto	Cantidad	Costo diario del método convencional * [USD]	Costo diario del método no convencional ** [USD]
Malonato de Dietilo	10,181 g	4,37	14,55
Etanol Absoluto	132,210 mL	9,01	-----
Piperidina	0,210 mL	0,19	0,64
Salicilaldehído	5,535 g	4,75	15,83
TOTAL		18,32	31,02

* Para 3 procesos diarios

** Para 10 procesos diarios

En la tabla 3.31 se presenta la cantidad total producida de la **ECC** por el número de reacciones diarias posibles de desarrollar para las dos técnicas de calentamiento ensayadas. Para esta evaluación se consideró el rendimiento por el proceso de recristalización porque cada método de síntesis se diferencia debido a la cantidad de solvente que provocará o no la dilución del producto obtenido.

Tabla 3.31. Rendimientos evaluados con la consideración de la recristalización del producto sintetizado, la **ECC**, mediante Condensación de Knoevenagel

Método	Conversión total [%]	Recuperación por cristalización *	Rendimiento real **	Cantidad de producto ***
			[%]	[g]
Radiación en MO	89,64	95,00	85,158	78,05
Reflujo	80,50	85,00	68,425	18,81

* En función de las pérdidas promedios del producto por dilución del mismo en el solvente usado

** Producto entre % de conversión y % de recuperación por cristalización

*** Para el total diario de 3 y 10 reacciones, respectivamente

3.6.2 COMPARACIÓN ECONÓMICA ENTRE EL MÉTODO CONVENCIONAL Y LA SÍNTESIS POR RADIACIÓN DE MICROONDAS

El beneficio económico de la aplicación de la técnica no convencional de la radiación de MO se fundamenta en la reducción del tiempo de calentamiento, alto valor agregado del producto sintetizado y el aumento de la conversión del mismo (Díaz et al., 1999, p. 27; Loupy, 2003, p.182). En la tabla 3.32, se presenta el tiempo total para cada síntesis de producción de la **ECC**, mediante la técnica convencional y no convencional. El periodo de operación respectivo corresponde a la sumatoria de los tiempos detallados de cada subproceso en la tabla 3.31, donde se muestra el número de síntesis posibles a realizarse por el método de reflujo y de radiación de MO.

Tabla 3.32. Periodos totales para la síntesis convencional y en MO de la **ECC**, mediante Condensación de Knoevenagel

Método	Tiempo total [min]	Periodo diferencial *	Cantidad de procesos **
		[min]	[#]
Reflujo	140	60	3 × 6
Radiación en MO	40	80	10

* Tiempo inicial y final para alistar el material y purificar el producto, producto de la diferencia entre el tiempo de operación diario y el tiempo total ocupado para todos los procesos del día

** Coeficiente entero entre los 480 min y el tiempo ocupado para cada síntesis de cada método

En el caso de la técnica convencional, por usarse un equipo con 6 dispositivos completos de extracción, el total diario considera que se obtienen simultáneamente 6 procesos totales.

Esta tabla sirvió de referencia para las 3.29 y 3.30. Para la producción mensual de la **ECC**, se consideró para la técnica convencional y no convencional un periodo de operación de 8 h al día y de 20 días al mes. Con estos datos y con el total de 3 y 10 reacciones diarias para cada método, se determinó la cantidad de producto esperado y los gastos totales de la síntesis al mes. Los valores resultantes se presentan en la tabla 3.33, para el análisis económico posterior.

Si se calcula un beneficio por la diferencia entre el valor monetario de la **ECC** sintetizada y los costos de dicha producción en función de los precios del mercado, se obtienen los valores reportados en el tabla 3.33.

Tabla 3.33. Evaluación del beneficio económico de la técnica no convencional frente a la convencional para la síntesis de la **ECC**, mediante Condensación de Knoevenagel

Método	Inversión por instrumental [USD]	Consumo de reactivos ^a [USD]	Costo por insumos ^b [USD]	Producción mensual ^{c*} [USD]	Beneficio ^{**} [USD]	Beneficio final [USD]
Reflujo	2 561,00	18,32	99,67	587,61	469,62	256,72 ^d
Radiación MO	327,70	31,02	0,33	2 437,68	2 406,33	2 078,63

* Recuperación del producto total de 85 % (técnica convencional) y de 95 % (técnica no convencional)

** Resultado: **c-a-b**; para la operación de 20 días al mes, 8 h/día y 10 síntesis en el horno MO o 3 en el equipo Soxhlet

^d Valor resultante de la diferencia: primer beneficio económico e inversión si se operan los 6 extractores

Los resultados de la tabla 3.33 indican una primera ventaja económica de la técnica no convencional frente a la convencional. Esta ventaja económica se confirma con la evaluación del beneficio final que resulta entre el beneficio económico y la inversión (gasto inicial) por equipos en cada método.

Bajo las condiciones desarrolladas del presente trabajo operando todo el día aún a escala de laboratorio, el método no convencional de radiación de MO presenta un beneficio monetario de casi 10 veces mayor que el obtenido con el método convencional de síntesis por reflujo.

Una mayor descripción de los cálculos realizados para la generación de las tablas expuesta en el presente acápite, se presenta en el anexo VI mediante un ejemplo de cálculo para cada ítem respectivamente.

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

1. La caracterización del horno microondas utilizado permitió establecer que la energía entregada es similar a partir de los niveles de potencias superiores a 6. Se identificó como la zona de mayor incidencia de la MO a la comprendida en el intervalo radial de 10 a 15 cm del plato que se mueve a una velocidad de rotación de 6 rpm.
2. La 1,2-Benzopirona, la 4-Hidroxi Cumarina y la 4-Metil Umbeliferona no pudieron ser sintetizadas mediante Condensación de Knoevenagel, ni por el método convencional, ni por el método de irradiación con la MO porque la formación de estas cumarinas no se desarrolla con el acetato de etilo, como reactivo con el grupo funcional éster, puesto que esta sustancia no posee el H- α lo suficientemente activo para generar el proceso ciclación.
3. La **ECC** sí fue sintetizada, mediante el mecanismo de la Condensación de Knoevenagel, tanto por el método convencional como por el método de irradiación con microondas porque la ciclación se logró con el uso de malonato de dietilo. Este éster posee el H- α lo suficientemente activo para generar el heteronúcleo propio de las cumarinas.
4. La mayor conversión de la **ECC** por el método convencional se alcanzó con 100 min de reflujo y 1 % molar de piperidina bajo las situaciones operativas de la presente investigación, que fueron el uso de un equipo Soxhlet y del etanol absoluto como solvente.
5. La mayor conversión de la **ECC** por el método no convencional se alcanzó con 1 min de irradiación con MO y 2 % molar de piperidina bajo las condiciones experimentales del presente trabajo, que fueron el uso de un

horno microondas doméstico, la irradiación de MO por periodos menores a 3 min y el uso de reactores de teflón sin válvulas de alivio de presión.

6. La conversión total máxima para la **ECC**, con 1 min de irradiación con MO, fue de 89,6 % que es mayor a la lograda con el método convencional, que alcanzó un valor de 80,5 % en 100 min de reflujo.

7. El análisis de costos bajo las condiciones operativas del presente trabajo permitió determinar que la suma económica requerida a escala de laboratorio para la técnica de irradiación de microondas respecto a la técnica de reflujo disminuye en un 73,4 %, puesto que se lograron disminuir los tiempos y aumentar los rendimientos para la síntesis de la **ECC** mediante el método no convencional por comparación con el método convencional.

4.2 RECOMENDACIONES

1. Complementar esta investigación con un estudio adicional en el que se varíe las cantidades de los reactivos y la relación entre ellos para determinar la influencia del factor másico en el rendimiento de la síntesis no convencional por radiación de microondas que podría darse como consecuencia del llamado “efecto microondas” y por las características propias del equipo usado.
2. Estudiar el efecto del catalizador en la producción de las cumarinas, mediante la variación de las cantidades del mismo o con el uso de otros catalizadores.
3. Si se utiliza un horno de MO doméstico se podría implementar en los reactores de teflón, un sistema de alivio de presión, para garantizar la seguridad de la operación al aumentar los tiempos de irradiación.
4. Usar un horno microondas mono modo para mejorar la homogeneidad del calentamiento de la mezcla reactiva y de esta manera poder aumentar la reproducibilidad en los resultados.
5. Probar otros mecanismos de reacción diferentes a la Condensación de Knoevenagel tales como: el reordenamiento de Claisen – Schmidt, la reacción de Pechmann – Duisberg y la reacción de Perkin, para sintetizar la 1,2-Benzopirona, la 4-Hidroxi Cumarina y la 4-Metil Umbeliferona por radiación de microondas que no fueron obtenidas en este trabajo.
6. Plantear futuras investigaciones con base en los avances que se presentan en este estudio, para generar una serie de métodos alternativos que permitan sintetizar metabolitos secundarios de interés en el laboratorio. Estas futuras investigaciones desarrollarán y fortalecerán las áreas de Química Orgánica y Química Fina de la institución y del país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agilent Technologies. (2010). *Consejos para el mantenimiento de su equipo de HPLC-Resolución de Problemas en HPLC: Troubleshooting-Técnicas, Consejos, y Trucos*. Recuperado de http://www.chem.agilent.com/Library/slidepresentation/Public/5_Trucos%20y%20consejos%20en%20la%20resoluci%C3%B3n%20de%20Problemas%20en%20HPLC.pdf (Agosto, 2010)
2. Aguilera, R. (2002). Control de la anti-coagulación oral en Asistencia Primaria. *Medicina General*, 47 (sumario), 700 – 710. Recuperado de http://www.medicinageneral.org/revista_47/pdf/700-710.pdf (Enero, 2010)
3. American Chemical Society (ACS). (2010). CAS Media Library. *Chemical Abstracts Service registry number (CAS RN)*, Recuperado de <http://www.videogateway.tv/cas/> (Mayo, 2010)
4. Angenault, J. (1998). *Diccionario enciclopédico de Química*. (2da. ed. en francés, 1ra. ed. en español). México D.F., México: Compañía Editorial Continental, S.A. de C.V. México.
5. Arango, G. (2010). *Introducción al metabolismo secundario – Compuestos derivados del ácido shikímico*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquía.
6. Austin, G. (1988). *Manual de Procesos Químicos en la Industria*, Tomo II. (5ta. ed. en inglés, 1ra. ed. en español). USA, México D.F., México: McGraw Hill.
7. Ballini, R., Clark, J. y Kraus, G. (2009). *Eco-Friendly Synthesis of Fine Chemicals*. (2da. ed.), Royal Society of Chemistry Publishing. Cambridge, UK: RSC Green Chemistry Book Series.

8. Bennardi, D., Romanelli, G., Jios, J., Autino, J., Baronetti, G. y Thomas H. (2007). Synthesis of substituted flavones and chromones using a Wells-Dawson heteropolyacid as catalyst. *ARKIVOC General Papers - ISSN 1551-7012 - ARKAT USA, Inc., 2008* (xi), 123 – 130. Recuperado de <http://www.arkat-usa.org/get-file/23087/> (Enero, 2010)
9. Bogdal, D. (1998). *Coumarins – Fast Synthesis by the Knoevenagel Condensation under Microwave Irradiation*. Recuperado de <http://www.ch.ic.ac.uk/ectoc/echet98/pub/087/> (Diciembre, 2009)
10. Bruice, P. (2008). *Química Orgánica* (5ta. ed.). Naucalpan de Juárez, México: Editorial Pearson Educación.
11. Carretero, M. (2000). Plantas Medicinales – Compuestos fenólicos: Sikimatos (II). *Panorama Actual del Medicamento*, 24 (233), 432 – 435, Recuperado de [http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/0/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/\\$File/233.pdf](http://www.portalfarma.com/pfarma/taxonomia/general/gp000011.nsf/0/4DE2A2030B26B6F0C1256A790048D68C/$File/233.pdf) (Octubre, 2011)
12. Celeghini, R., Vilegas, J. y Lanças, F. (2001). Extraction and Quantitative HPLC Analysis of Coumarin in Hydroalcoholic Extracts of *Mikania glomerata* Spreng. ("guaco") Leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12 (6). Recuperado de http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-50532001000600003&script=sci_arttext&tlng=en (Mayo, 2010)
13. Chicharro, M., Bautista, A., Benayas, A. y Ortiz, Y. (2010). *Cromatografía: Principios y Aplicaciones – Análisis Químico*. Atlantic Internacional University. Recuperado de <http://es.scribd.com/doc/19050563/Cromatografia-Principios-y-Aplicaciones> (Agosto, 2011)
14. Clark, J. (2003). Inorganic Chemistry – Cobalt. *ChemGuide: Helping you to understand Chemistry*. Recuperado de <http://www.chemguide.co.uk/inorganic/transition/cobalt.html> (Agosto, 2011)

15. COFILAB // CPQ // Ley 7020/65 - MCEI005. (2004). *Manual de Calidad: Evaluación estadística en Ensayos de Aptitud Interlaboratorios (EAI)*. Recuperado de <http://www.cofilab.com.ar/mcei005.pdf> (Marzo, 2011)
16. De la Cruz, P., Díez, E., Loupy, A., y Langa, F. (1996). Silica Gel Catalysed Knoevenagel Condensation in *Dry Media* under Microwave Irradiation. *Tetrahedron Letters*, 37 (7), 1 113 – 1 116.
17. Díaz, Á., de la Hoz, A., Langa, F. y Moreno, F. (1999). Técnicas no convencionales en química. *Investigación Química*, 95 (2), 23 – 27. (2da Época). Ciudad Real, España: Anales de la Real Sociedad Española de Química.
18. El Khatib, M., Porta, N. y Prieto, A. (2006). *Reacción de Knoevenagel: Obtención de Ácido Cinámico*. Recuperado de <http://muammar.me/files/Reacci%C3%B3n%20de%20Knoevenagel.pdf> (Diciembre, 2009)
19. Empresa Eléctrica Quito S.A. (2005). *Empresa Eléctrica Quito – Pliego Tarifario Vigente – Periodo de consumo: 1 al 31 de agosto de 2011*, pp. 1 – 2. Recuperado de <http://www.eeq.com.ec/upload/pliegos/20110726112143.pdf> (Septiembre, 2011)
20. Finar, I. (1980). *Química Orgánica, Estereoquímica y Química de los Productos Naturales*, Volumen II. (4ta. ed. original). Londres: LONGMAN GROUP Ltd. 1968 (2da. ed. en español). Madrid, España: Editorial Alhambra S.A.
21. Finar, I. (1975). *Química Orgánica, Principios Fundamentales*, Volumen I. (6ta. ed. Original). 1973, Londres: LONGMAN GROUP Ltd. (3ra. ed. en español). Madrid, España: Editorial Alhambra S.A.
22. García, A., González, L., Márquez, C. y Martínez, M. (2003). Cumarinas presentes en especies del género *Casimiroa*. *Journal of the Mexican*

Chemical Society, 47 (002), 151 – 154. Recuperado de <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/475/47547213.pdf> (Agosto, 2010)

23. Gilchrist, T. (1995). *Química Heterocíclica*. (2da. ed.) Delaware, USA: Addison – Wesley Iberoamericana.
24. Gómez, R., Ricón, U. y Serrano, A. (2009). *Cromatografía: Principios y Aplicaciones*. Recuperado de <http://es.scribd.com/doc/11642417/Cromatografia-Fundamentos-y-Aplicaciones> (Julio, 2010)
25. Hall, V., Rocha, M. y Rodríguez, E. (2002). *Plantas Medicinales*, (Volumen II): CIMED. Recuperado de <http://sibdi.ucr.ac.cr/CIMED/cimed27.pdf> (Julio, 2011)
26. Jurado, J. (2008). *Aplicación de Microsoft Excel a la Química Analítica: validación de métodos analíticos*. Recuperado de <http://personal.us.es/jmjurado/docs/AQAEXCEL.pdf> (Abril, 2011)
27. Kerrigan, I. (2001). *Knoevenagel Reaction*. Recuperado de http://www.chem.shef.ac.uk/level-3/project-2001/knoevenagel_reaction.html (Abril, 2011)
28. Kingston, H. y Jassie, L. (1988). *Introduction to Microwave Sample Preparation: Theory and Practice*, Capítulos 1 y 2. Washington D.C., USA: American Chemical Society.
29. Lock de Ugaz, O. (1994). *Investigación Fitoquímica – Métodos en el estudio de productos naturales*. Lima, Perú: Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú.
30. Lock de Ugaz, O. (2001). *Manual de Fitoterapia*, Capítulo IV – Análisis Fitoquímico y Metabolitos Secundarios. Fondo Editorial PUCP. Recuperado de <http://www.bvsde.paho.org/texcom/manualesMEC/fitoterapia/cap4.pdf> (Agosto, 2011)

31. Loupy, A. (2003). *Microwaves in Organic Synthesis*. (1ra. ed.) París, Francia: WILEY-VCH.
32. Martínez, F. (2002). Programa y resúmenes de trabajos libres (Parte B). *Journal of the Mexican Chemical Society*, 46 (número especial), 147. Recuperado de <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=47509318> (Diciembre, 2009)
33. Martino, E., Ramaiola, I., Urbano, M., Bracco, F. y Collina, S. (2006). Microwave assisted extraction of coumarin and related compounds from *Melilotus officinalis* (L.) Pallas as an alternative to Soxhlet and ultrasound assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 1 125 (2), 147 – 151. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16769080> (Septiembre, 2011)
34. McKillop, A. y Young, D. (1979). *Organic Synthesis Using Supported Reagents – Part I (Reviews)*. Norwich, England: Editorial Georg Thieme Publishers.
35. MIDUVI. (2009). *Informe final: Auditoría a INTERAGUA*. Recuperado de http://www.sindicatosporelagua.org/documentos/Ecuador/INFORME_FINAL_INTERAGUA_MIDUVI.pdf (Septiembre, 2011)
36. Morrison, R. y Boyd, R. (1990). *Química Orgánica*. (5ta. ed.). Wilmington – Delaware, USA.: Editorial Addison – Wesley Iberoamericana S.A.
37. Murray, R., Mendez, J. y Brown, S. (1982). *The Natural Coumarins*. Nueva York, USA: John Wiley & Sons Ltd.
38. Noller, C. (1968). *Química Orgánica*. (3ra. ed.). México D. F., México: Editorial Interamericana.

39. Organic Chemistry Portal – OCP. (2007). *Organic Reactions – Name Reactions: Knoevenagel Condensation – Doebner Modification*. Recuperado de <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/knoevenagel-condensation.shtm> (Marzo, 2010)
40. Pagnotta, M., Nolan, A. y Kim, L. (1992). A Simple Modification of a Domestic Microwave Oven for Improved Temperature Control. *Journal of Chemical Education*, 69 (7), 599 – 600.
41. Pérez, D. Dr. (2009). Fitoterapia. *Instituto Biológico de la salud – Manual Plantas*. Recuperado de <http://www.institutobiologico.com/downloads/Manual%20de%20Fitoterapia.pdf> (Agosto, 2011)
42. Potapov, V. y Tatarinchik, S. (1983). *Química Orgánica*. (2da. ed.). Moscú, Rusia (ex URSS): Editorial Mir. Moscú.
43. Rivera, C. y Rodríguez, M. (2010). *Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayos*. Recuperado de <http://www.cenam.mx/sm2010/info/pviernes/sm2010-vp03c.pdf> (Marzo, 2011)
44. Robert, M., Reyes, J. y Loyola, V. (1993). *Cultivo de tejidos en la agricultura – Capítulo 9: Biosíntesis y bioconversión de metabolitos secundarios por células cultivada in vitro*. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) y Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Roca W. y Mroginski, L.). Recuperado de http://webapp.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo9_parte1.pdf (Enero, 2010)
45. Rodríguez, J., López, O. y Gil, J. (2008). *Método para la cuantificación de cumarina en extracto seco a partir de extractos de Justicia pectoralis Jacq.* Recuperado de http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol13_3_08/pla04308.htm (Junio, 2010)

46. RSEQ. (1999). Técnica no convencionales en química: Microondas. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 95 (2), 17 – 28. Recuperado de <http://campus.usal.es/~Inorganica/zona-alumnos/erf-tecnespec/Microondas.pdf> (Marzo, 2010)
47. Schoenbach, V. (2004). *Análisis e interpretación de datos*. Recuperado de <http://www.epidemiolog.net/es/endesarrollo/AnalisisEinterpretacionDeDatos.pdf> (Septiembre, 2011)
48. Schoenbach, V., Schildkraut, J. y Rosamond, W. (2004). *Fuentes de error*. Recuperado de <http://www.epidemiolog.net/es/endesarrollo/FuentesDeError.pdf> (Septiembre, 2011)
49. Sigma – Aldrich Corporation. (2008). *Handbook of Fine Chemicals – Aldrich Advancing Science*. (Ed. 2007 – 2008). Missouri – St. Louis, USA: Sigma – Aldrich Chemical Company.
50. Skoog, D., Holler, F. y Crouch, S. (2008). *Principios de análisis instrumental*. (6ta. ed.). México D.F., México: Editorial CENGAGE Learning.
51. Tripti, J., Jain, V., Pandey, R., Vyas, A. y Shukla, S. (2009). Microwave assisted extraction for phytoconstituents – An overview. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 2 (1), 19 – 25. Recuperado de [http://www.ajronline.org/AJRC%20V0I2%20\(1\)%20PDF%20Final/4RA.pdf](http://www.ajronline.org/AJRC%20V0I2%20(1)%20PDF%20Final/4RA.pdf) (Septiembre, 2011)
52. UNAM. (2011). *Cumarinas*. Recuperado de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/examenpiridinaycumarina\(2013-1\)_21705.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/examenpiridinaycumarina(2013-1)_21705.pdf) (Septiembre, 2011)
53. Vollhardt, K. y Schore N. (2007). *Organic Chemistry- Structure and Function*. (1ra. ed.) New York, USA: W.H. Freeman and Company.

54. Westaway, K. y Gedye, R. (1995). The Question of Specific Activation of Organic Reactions by Microwaves. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*, 30 (4), 219 – 230.

ANEXOS

ANEXO I

Fotografías de la caracterización del horno microondas utilizado

En las figuras AI.1, AI.2 y AI.3, se observan las zonas de mayor incidencia de la radiación de microondas, las cuales tomaron una coloración azul. Estas zonas azules se presentaron de manera homogénea para las piezas presentadas en las figuras AI.1 y AI.3; no obstante, estas zonas fueron irregulares para la pieza de la figura AI.2.

Para la caracterización de la superficie total se realizaron pruebas con piezas del tamaño de la base del horno sin el plato giratorio como se indica en la figura AI.1 y del tamaño del plato giratorio del horno de MO doméstico utilizado como se muestra en la figura AI.2.

Para la caracterización radial usaron piezas del tamaño del diámetro del plato giratorio del horno de microondas doméstico utilizado. La forma de estas piezas se indica en la figura AI.3.



Figura AI.1. Fotografía de la caracterización de la superficie total del horno microondas sin el plato giratorio

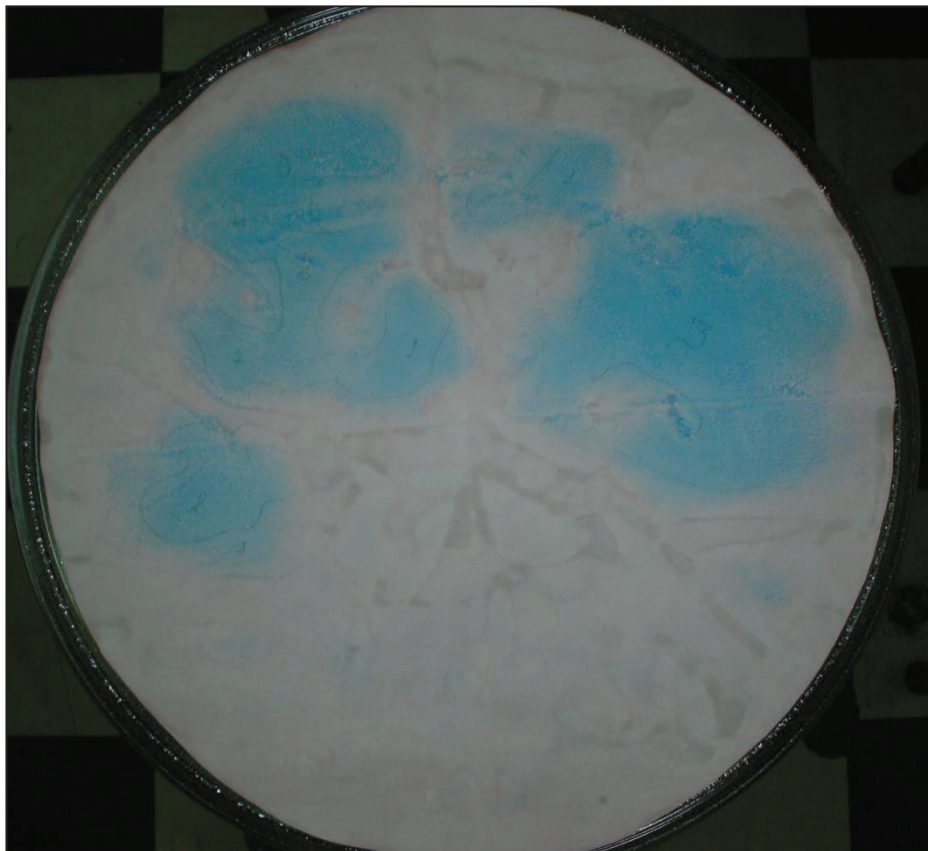


Figura AI.2. Fotografía de la caracterización de la superficie total del plato giratorio

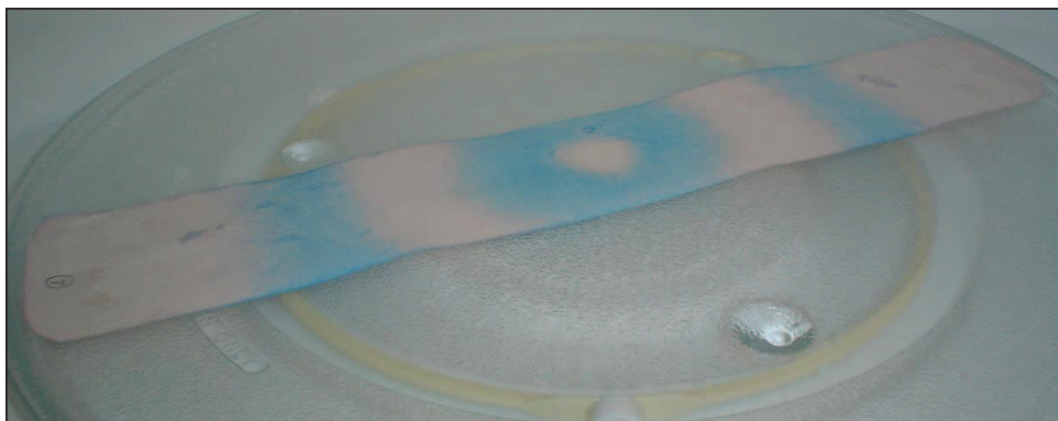


Figura AI.3. Fotografía de la caracterización radial del horno de MO

ANEXO II

Datos de las piezas de papel utilizadas para la caracterización radial del horno microondas

Como se indicó en el anexo I se realizaron pruebas con piezas de papel diametrales del plato giratorio de vidrio del horno caracterizado, el cual estuvo previsto de una rapidez radial de 6 rpm y la tendencia del tiempo de irradiación en función del nivel de potencia programado se presentó en la figura 3.2, a partir de los datos expuestos en la tabla 3.1, como resultado final de la presente caracterización analizada. Además, en la tabla 3.2 se indicó la distribución radial de las franjas mostradas en la figura A1.3.

Se prepararon 10 unidades de las piezas, cuyo peso promedio fue de $2,5417 \pm 0,0576$ g. Estos valores se presentan en la tabla AII.1, donde se puede observar la potencia teórica entregada por el horno de MO doméstico utilizado con el nivel de potencia correspondiente que se puede programar.

Tabla AII.1. Pesos de las piezas de papel usadas para cada nivel de potencia del horno convencional de microondas

Potencia teórica [W]	Nivel de Potencia [#]	Peso de la pieza [g]
120	1	2,5062
240	2	2,6207
360	3	2,5330
480	4	2,5127
600	5	2,4595
720	6	2,5250
840	7	2,6208
960	8	2,6157
1 080	9	2,4902
1 200	10	2,5335

ANEXO III

Cromatogramas HPLC-UV de los estándares de la 1,2-Benzopirona y su reactivo limitante, Salicilaldehído

El siguiente registro en el HPLC de una solución estándar de la 1,2-Benzopirona y del salicilaldehído bajo las condiciones indicadas en la tabla 3.8 permite observar la adecuada separación entre los picos de cada compuesto involucrado en la síntesis. La figura AIII.1 presenta una línea azul que corresponde a la señal del reactivo limitante (salicilaldehído, $t_R = 4,9$ min) y una línea verde del producto esperado (1,2-Benzopirona, $t_R = 1,5$ min).

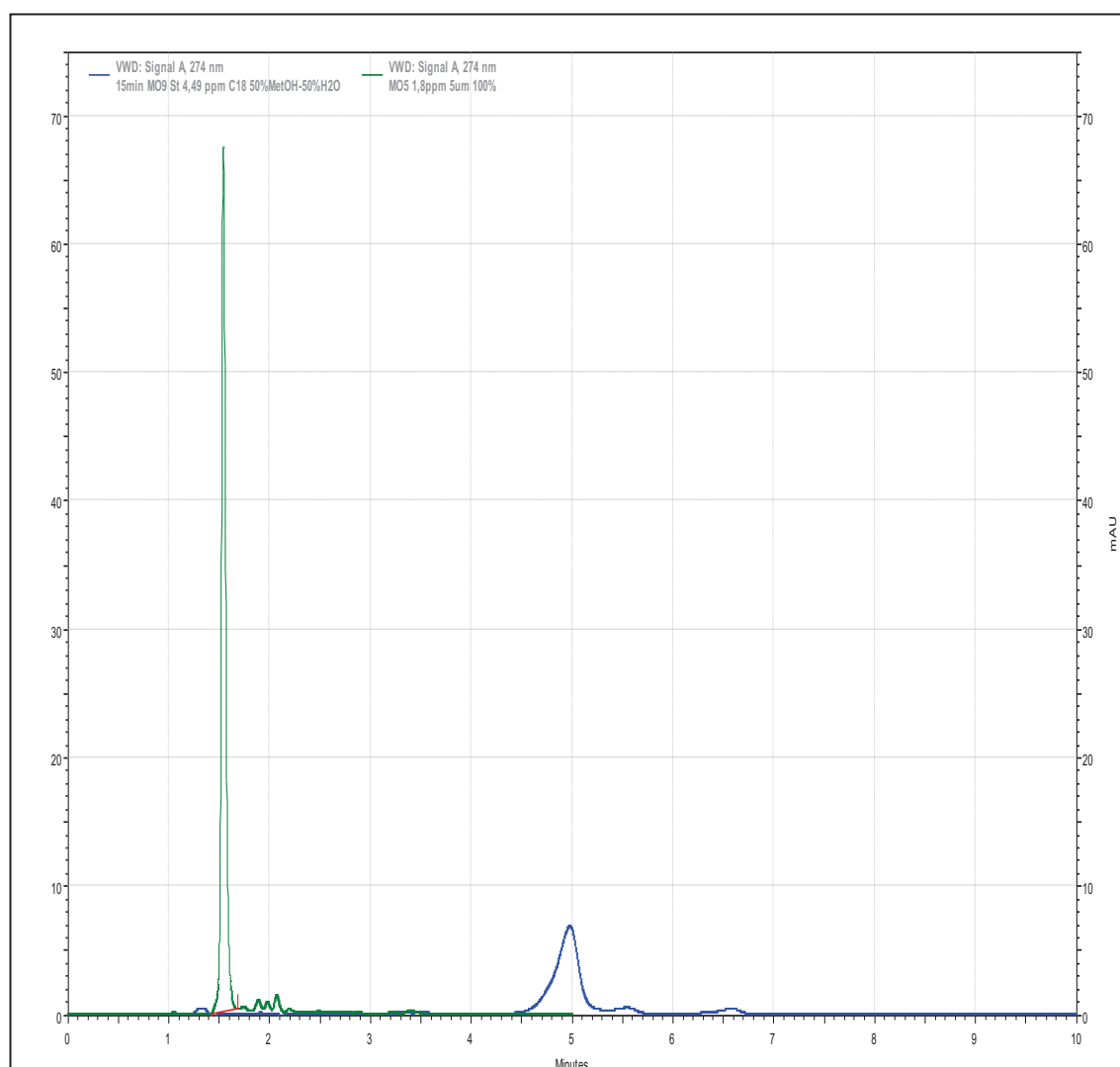


Figura AIII.1. Cromatogramas HPLC-UV de las soluciones estándares de la 1,2-Benzopirona y del Salicilaldehído a $\lambda = 274$ nm

ANEXO IV

Cromatogramas HPLC-UV de la mezcla reactiva resultante de la síntesis de la Etil 3-Carboxi Cumarina, mediante radiación de MO

La síntesis no convencional de la **ECC**, bajo las condiciones del diseño experimental desarrollado presentó 9 posibles combinaciones y se realizaron 3 réplicas de cada una. En las figuras, de la AIV.1 a la AIV.9, se indican los registros del HPLC con el detector UV de las 2 mezclas reactivas resultantes por cada reacción de la última réplica (tercera), la cual presentó los valores de conversión más cercanos a los promedios.

Estas mezclas reactivas finales de la síntesis por radiación de MO de la **ECC** fueron analizadas en el equipo de HPLC bajo las condiciones indicadas en la tabla 3.9 que permitieron obtener una adecuada separación entre los picos de cada compuesto involucrado: la ECC con un $t_R = 6,4$ min y el salicilaldehído con un $t_R = 4,9$ min.

En cada cromatograma se encuentra en línea azul la señal de la mezcla reactiva al calentamiento por radiación de MO y en línea verde la correspondiente a la mezcla reactiva final posterior a la irradiación, con el área de integración correspondiente a cada pico de los compuestos presentes en las dos mezclas reactivas.

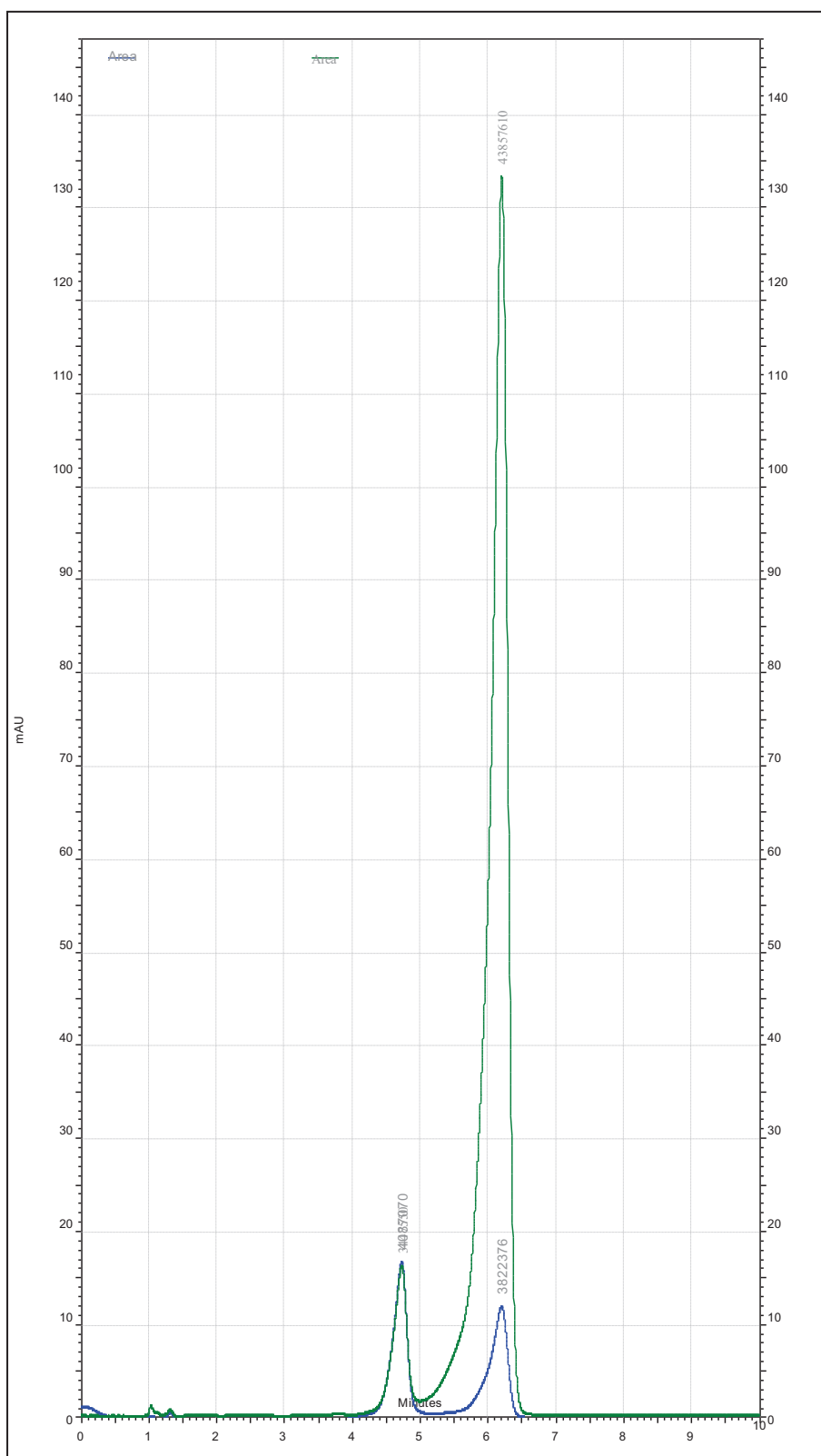


Figura AIV.1. Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 1,0 % mol de piperidina y sin/con 0,5 min de irradiación

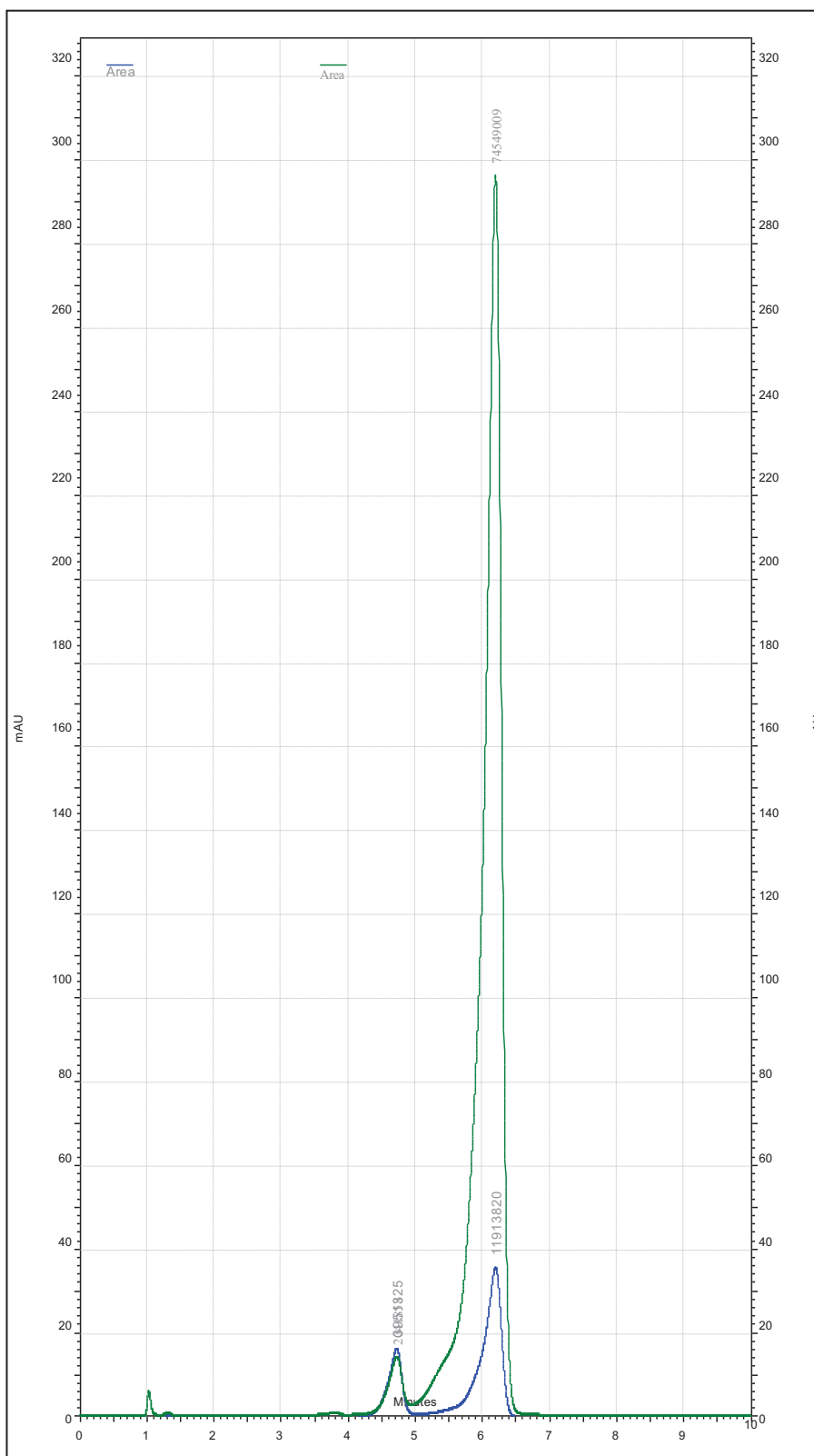


Figura AIV.2. Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 1,5 % mol de piperidina y sin/con 0,5 min de irradiación

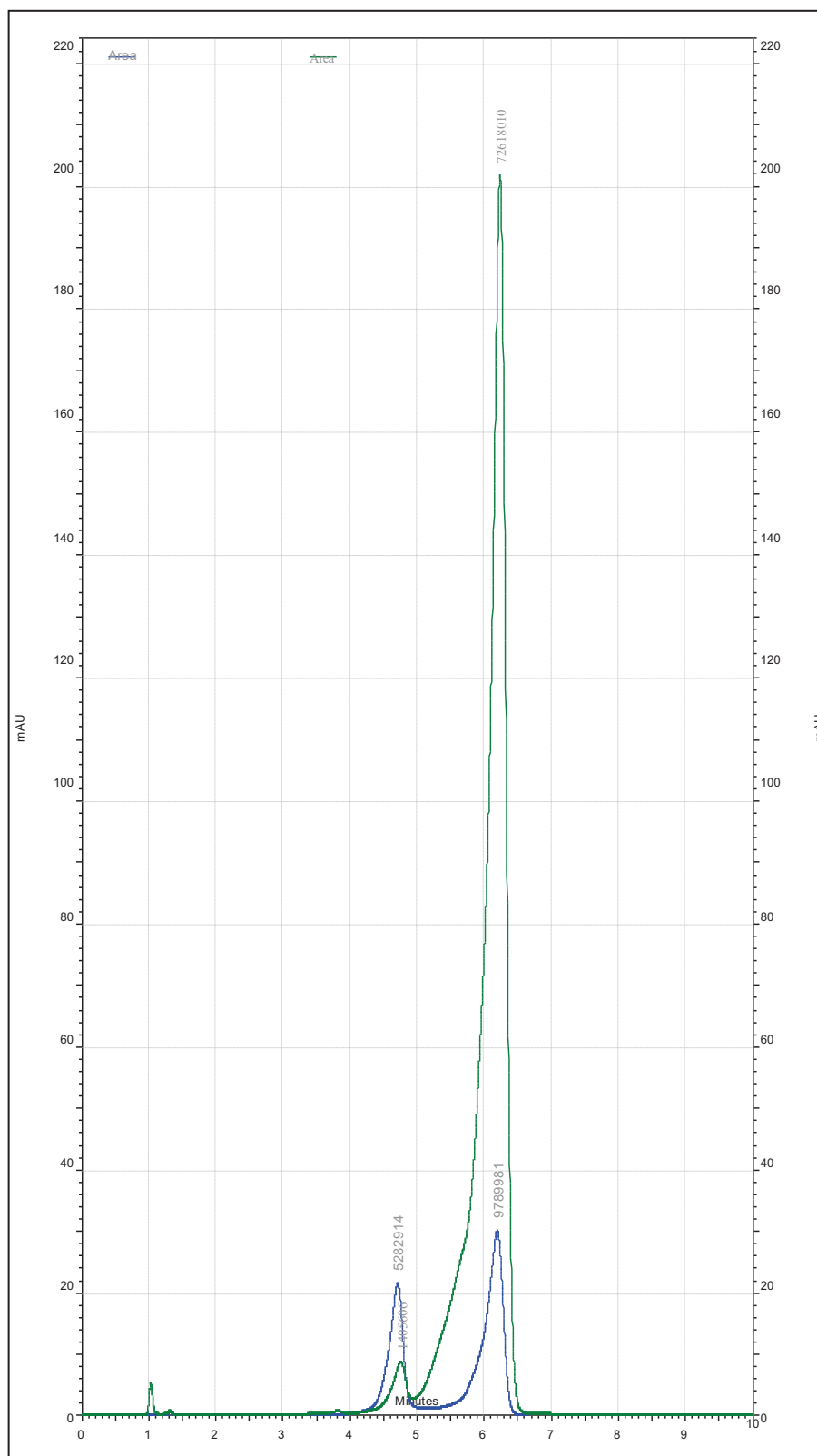


Figura AIV.3. Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 2,0 % mol de piperidina y sin/con 0,5 min de irradiación

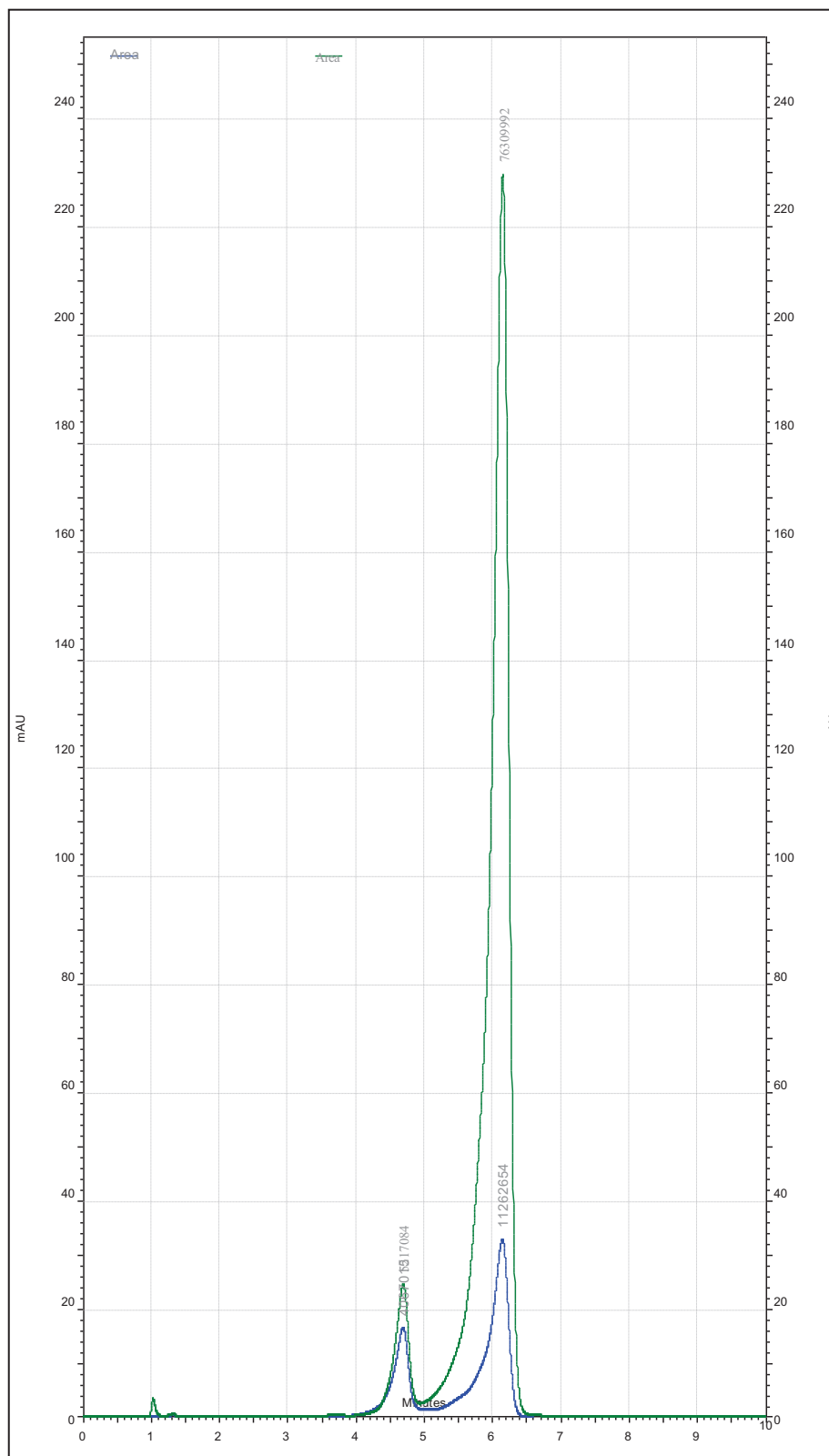


Figura AIV.4. Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 1,0 % mol de piperidina y sin/con 1,0 min de irradiación

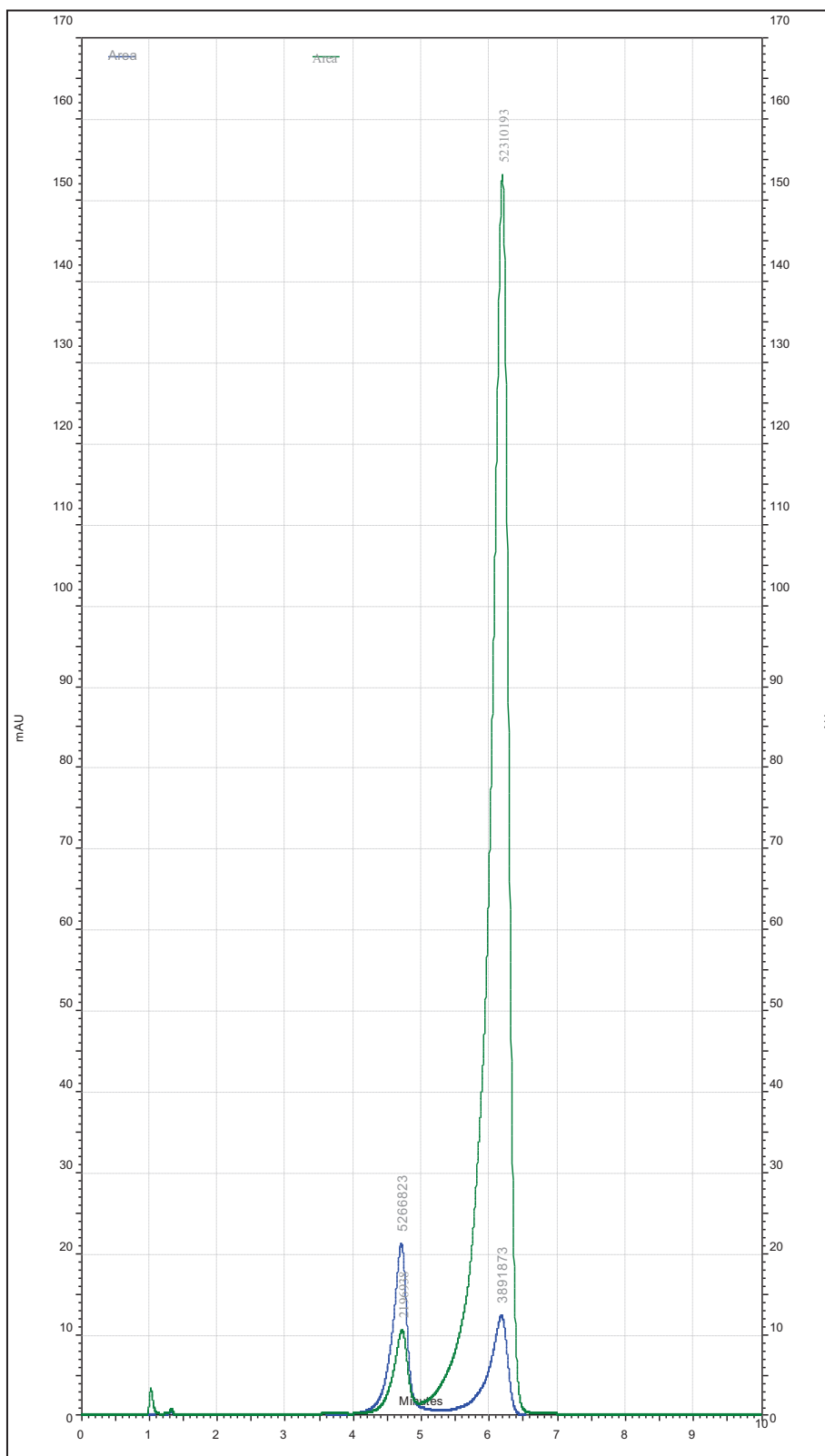


Figura AIV.5. Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 1,5 % mol de piperidina y sin/con 1,0 min de irradiación

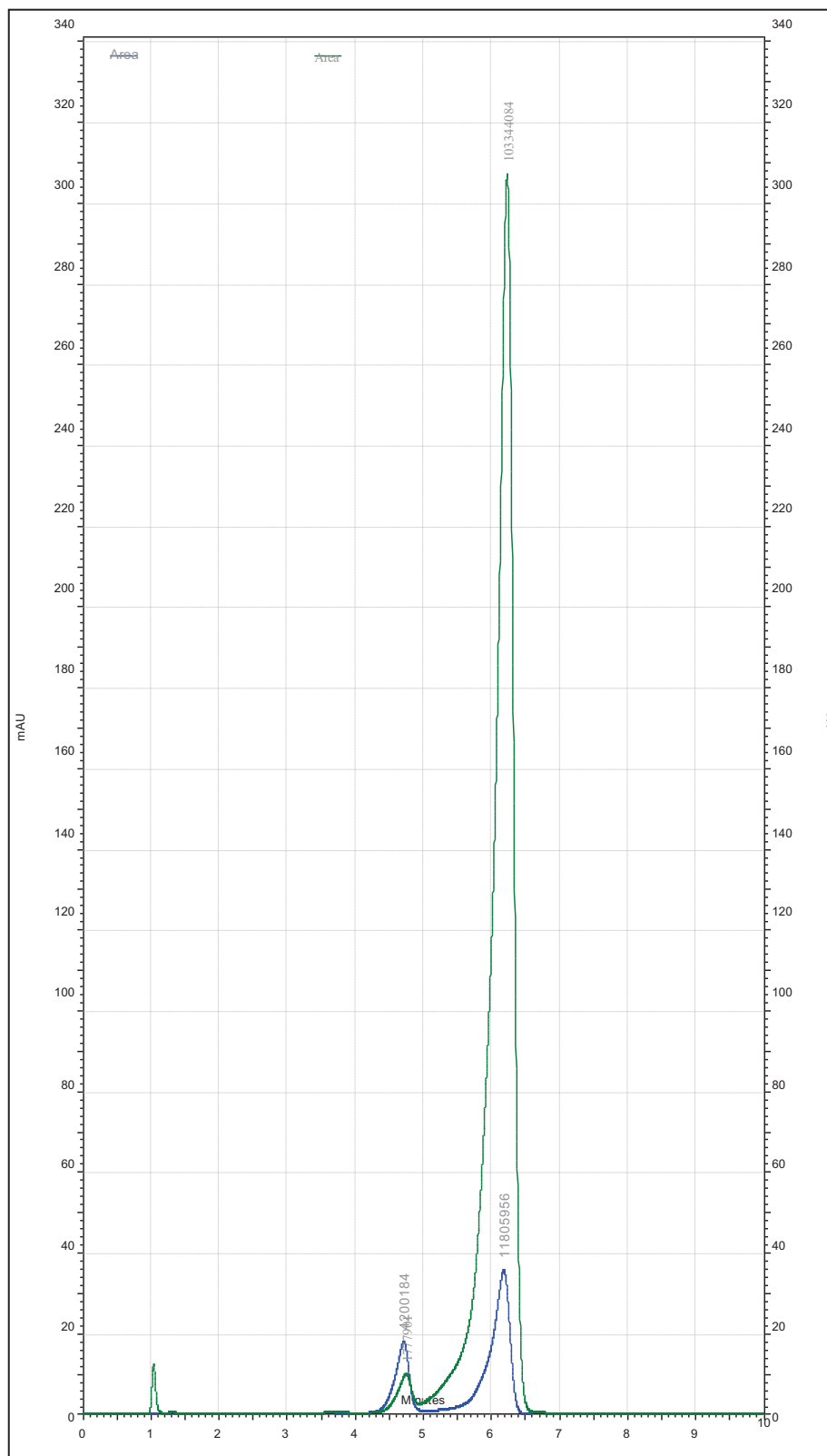


Figura AIV.6. Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 2,0 % mol de piperidina y sin/con 1,0 min de irradiación

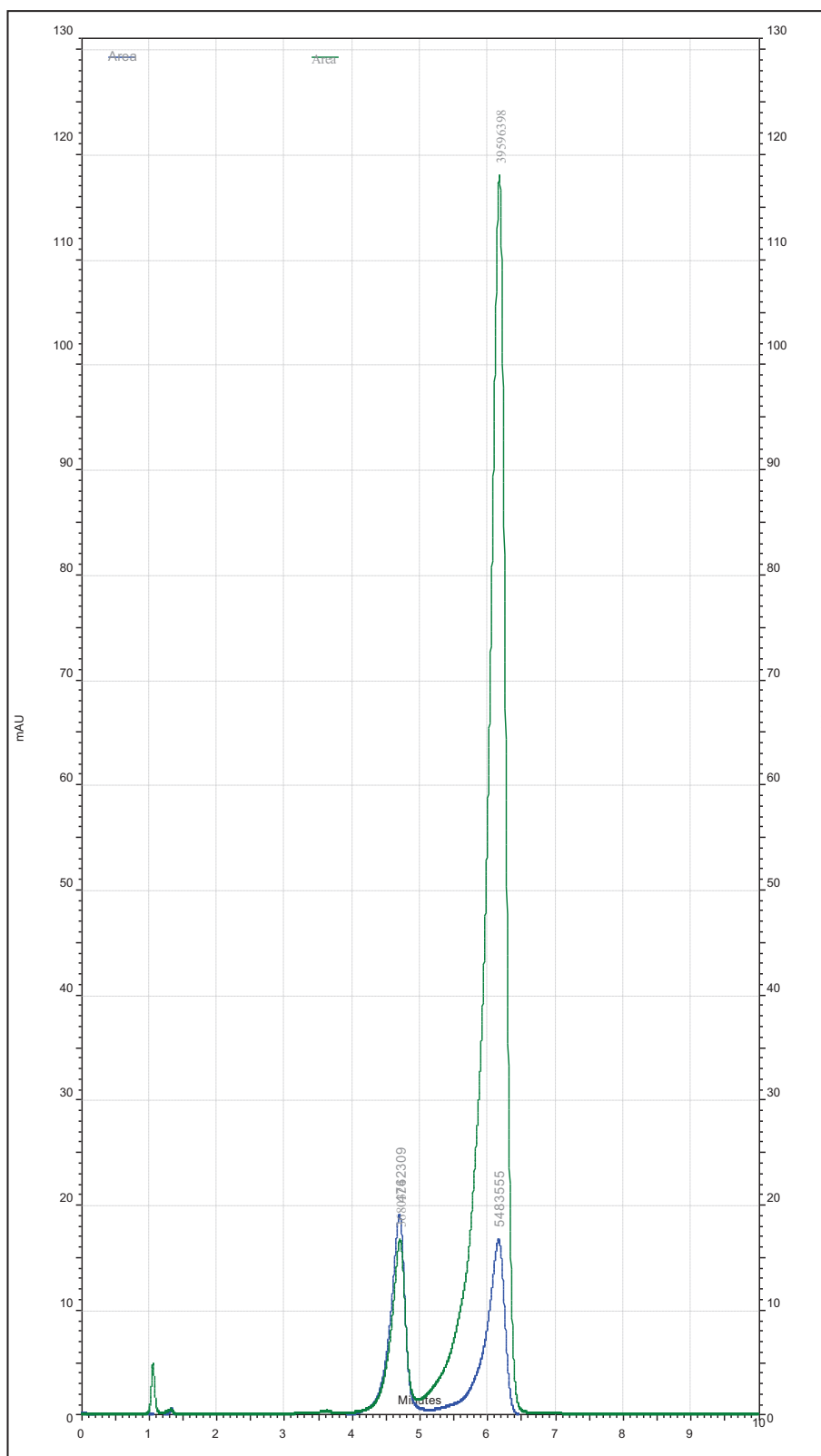


Figura AIV.7. Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 1,0 % mol de piperidina y sin/con 2,0 min de irradiación

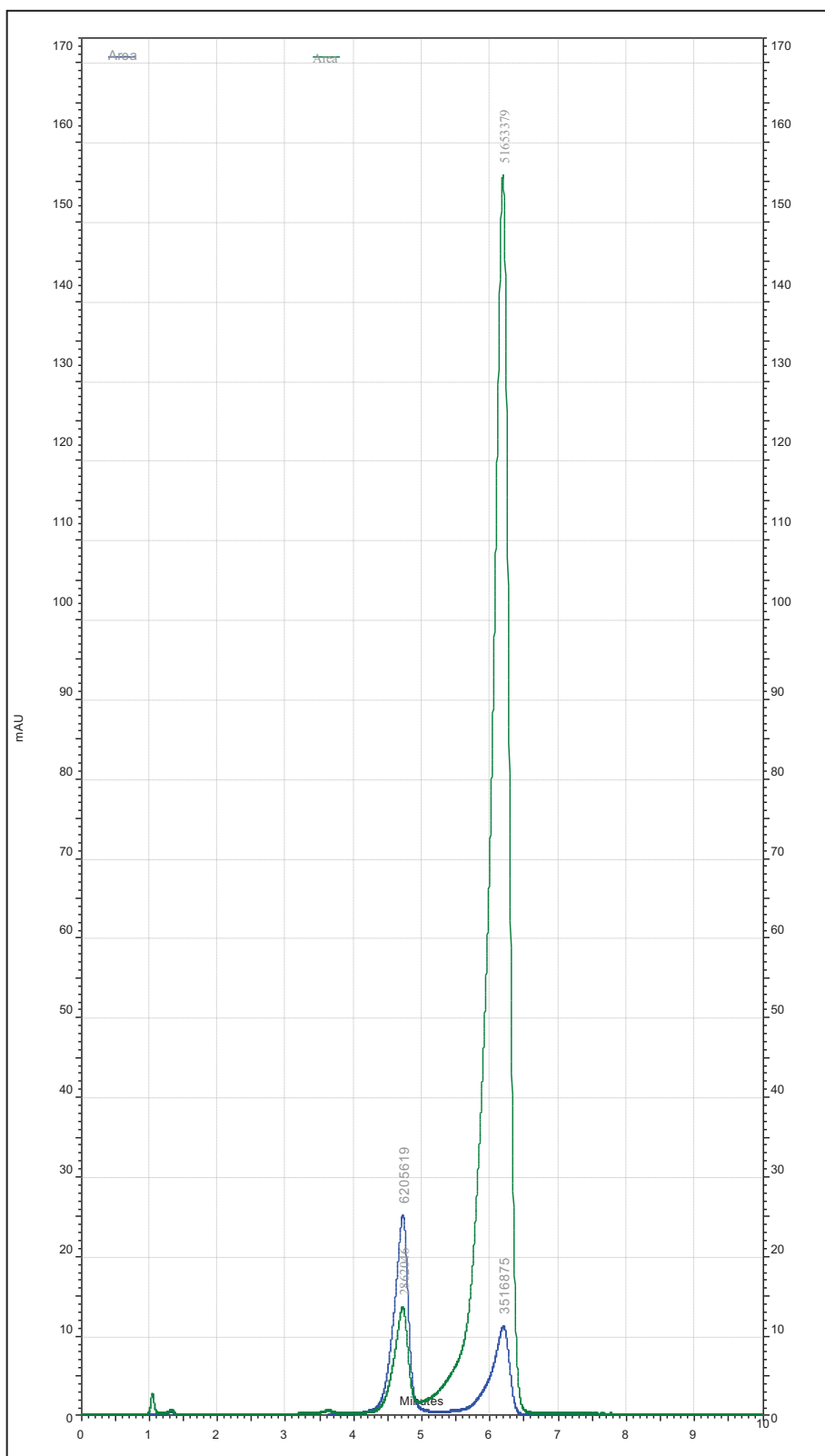


Figura AIV.8. Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 1,5 % mol de piperidina y sin/con 2,0 min de irradiación

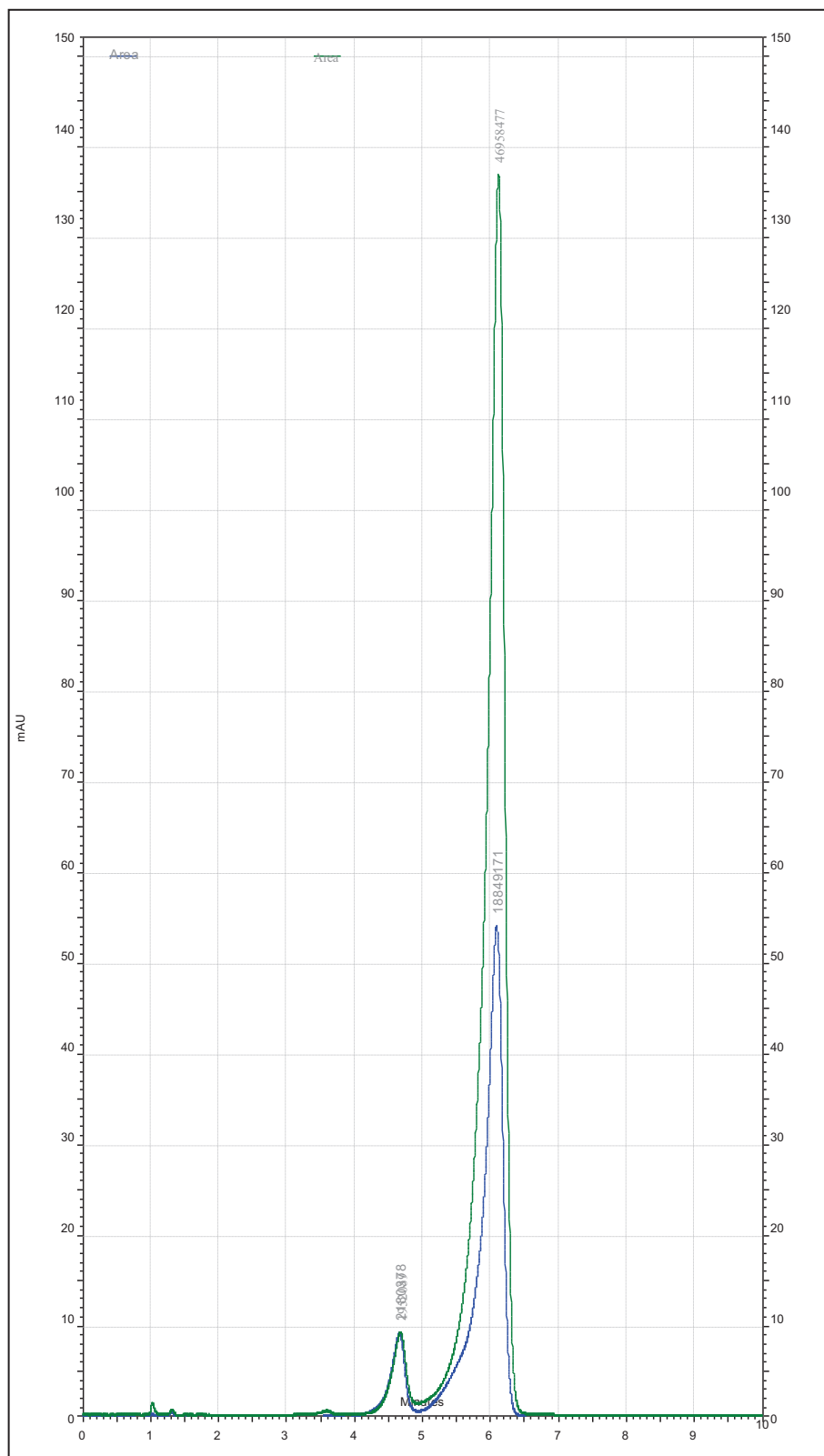


Figura AVI.9. Cromatogramas HPLC-UV de las mezclas reactivas de la síntesis no convencional de la ECC con 2,0 % mol de piperidina y sin/con 2,0 min de irradiación

ANEXO V

Cromatogramas HPLC-UV de los estándares de la 4-Hidroxi Cumarina y su reactivo limitante, Ácido Salicílico

El siguiente cromatograma HPLC-UV presenta las señales de las soluciones estándares de la 4-Hidroxi Cumarina ($t_R = 1,4$ min) y del ácido salicílico ($t_R = 0,85$ min). La figura AV.1 presenta en azul el registro del reactivo limitante (ácido salicílico) y en verde el registro del producto esperado (4-Hidroxi Cumarina) bajo las condiciones expuestas en la tabla 3.10.

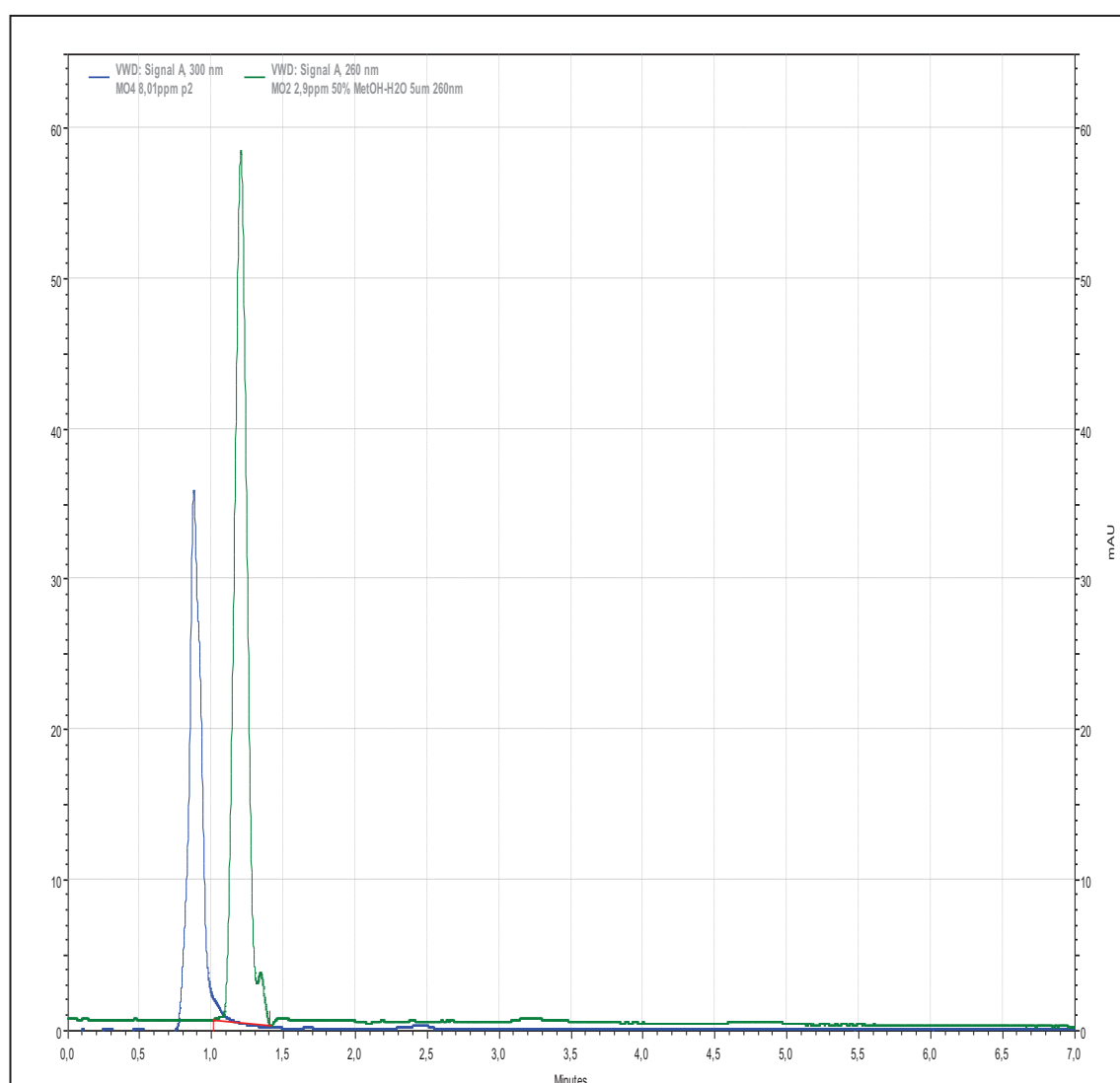


Figura AV.1. Cromatogramas HPLC-UV de las soluciones estándares de la 4-Hidroxi Cumarina y del Ácido Salicílico a $\lambda = 260$ nm

ANEXO VI

**Cromatogramas HPLC-UV de los estándares de la 4- Metil Umbeliferona
y su reactivo limitante, 2,4-Dihidroxi Acetofenona**

Los ensayos probados para el levantamiento de la técnica de análisis HPLC permitieron definir las mejores condiciones de análisis que se presentaron en la tabla 3.11. Con el uso de estos datos se obtuvieron los cromatogramas que se presentan en la figura AVI.1, este registro en el HPLC de una solución estándar de la 4-Metil Umbeliferona y de 2,4-dihidroxi acetofenona permite observar los picos de ubicados a $t_R = 5,7$ min para la cumarina seleccionada en línea azul y a $t_R = 1,5$ min para el reactivo aromático en línea verde.

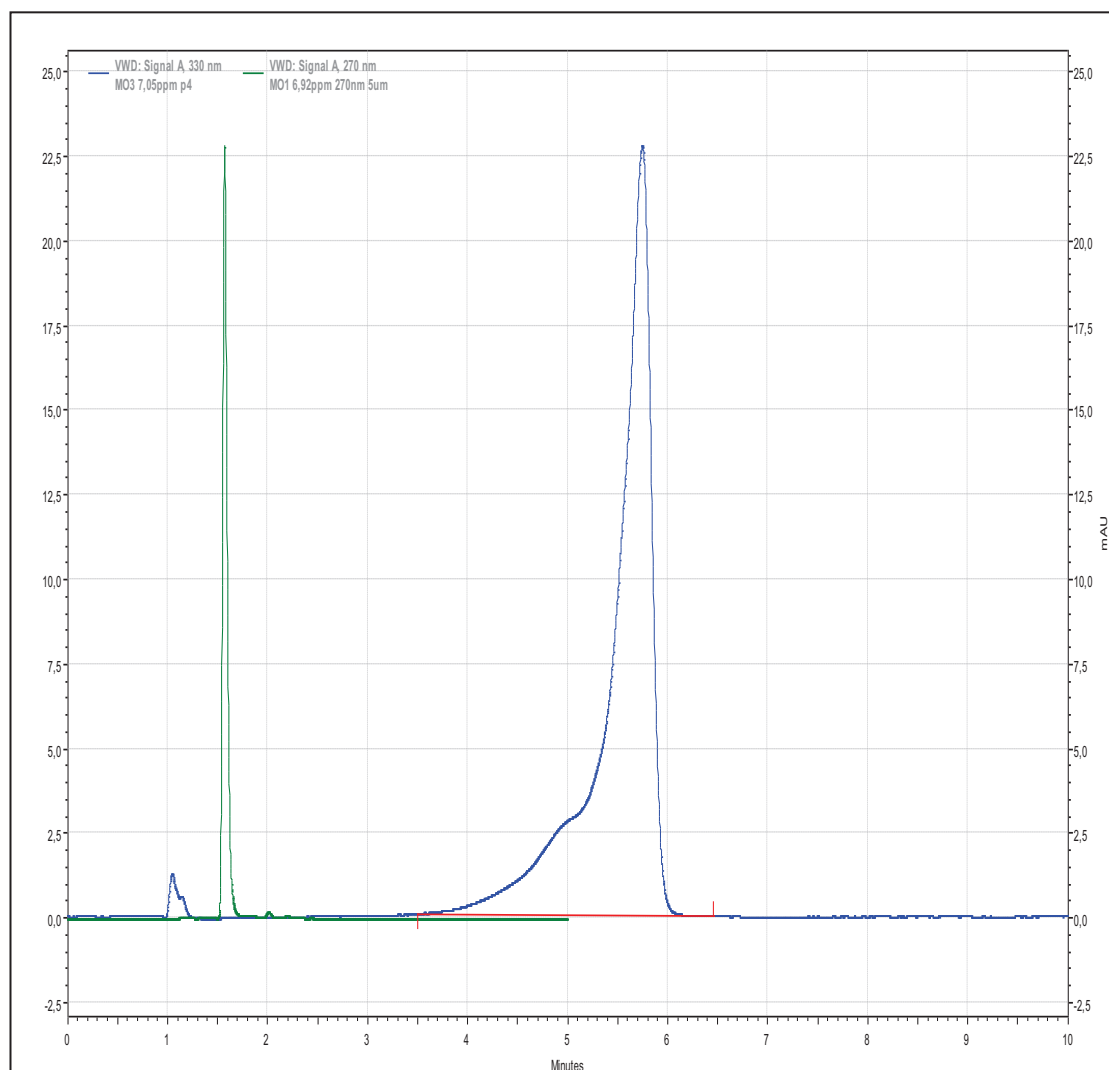


Figura AVI.1. Cromatogramas HPLC-UV de las soluciones estándares de la 4- Metil Umbeliferona y de la 2,4-Dihidroxi Acetofenona a $\lambda = 330$ nm

ANEXO VII

Fotografías de las pruebas preliminares realizadas para la síntesis de las cumarinas seleccionadas con el método convencional de reflujo

Ensayos para la obtención de la 1,2-Benzopirona

En las figuras AVII.1 y AVII.2, se presentan las mezclas reactivas finales obtenidas por la síntesis convencional de la 1,2-Benzopirona durante 100 min de reflujo; reacciones desarrolladas en simultáneo, donde se observaron cambios físicos de coloración. En la primera figura se muestra la mezcla reactiva resultante con el uso de piperidina, mediante Condensación de Knoevenagel, y en la segunda figura se presenta la mezcla reactiva con el uso de ácido clorhídrico, mediante la reacción de Pechmann.



Figura AVII.1 Fotografía de la síntesis de la 1,2-Benzopirona con el uso de un catalizador básico (la piperidina), mediante la Condensación de Knoevenagel



Figura AVII.2. Fotografía de la síntesis de la 1,2-Benzopirona con el uso de un catalizador ácido (ácido clorhídrico), mediante la reacción de Pechmann

Ensayos para la obtención de la Etil 3-Carboxi Cumarina

Para la síntesis de la **ECC** se probaron la reacción de Knoevenagel y de Pechmann, cuyas mezclas reactivas se presentan en las figuras AVII.3 y AVII.4, donde se observan los cambios físicos. Los ensayos se desarrollaron en 100 min de reflujo y el resultado del enfriamiento se presenta en la figura AVII.5, donde se muestra la cristalización del producto esperado.

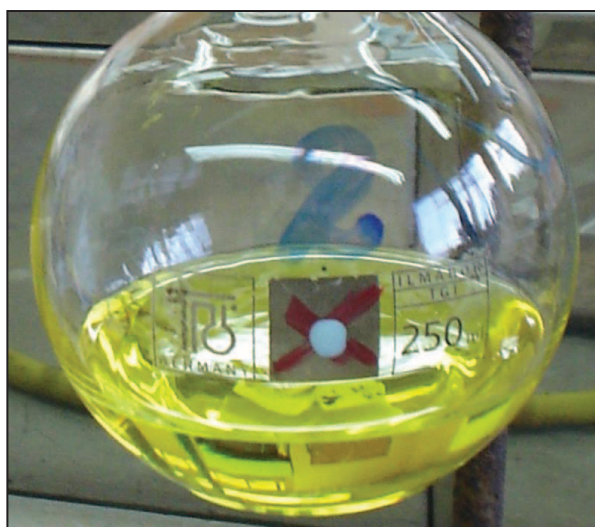


Figura AVII.3. Fotografía de la síntesis convencional de la **ECC** con el uso de la piperidina, mediante la Condensación de Knoevenagel



Figura AVII.4. Fotografía de la síntesis convencional de la **ECC** con el uso de ácido clorhídrico, mediante la reacción de Pechmann

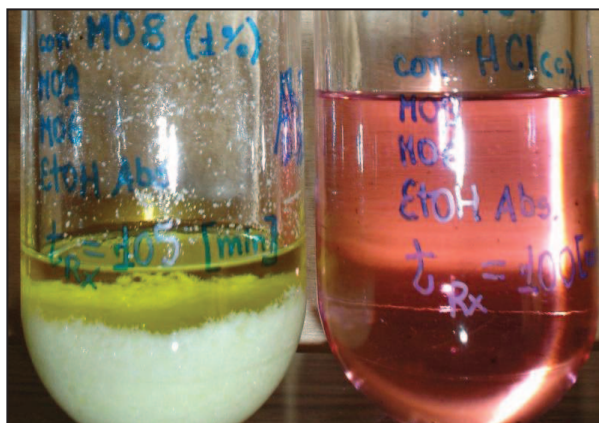


Figura AVII.5. Fotografía de las mezclas reactivas frías de la síntesis convencional de la ECC con el uso de piperidina y ácido clorhídrico como catalizadores

ANEXO VIII

Análisis y discusión del coeficiente de error del 25 % adoptado en la estadística

En la tabla 3.22 se indicaron los parámetros del diseño experimental desarrollado para la síntesis por radiación de microonda y los parámetros estadísticos considerados tanto el coeficiente de error como el número de réplicas. A estos parámetros se sumó al análisis estadístico realizado por medio del uso del programa Statgraphics, que trabaja por configuración general con el factor de significancia de 0,05 (Jurado, 2008, p. 3). Dicho valor se define y corresponde al nivel de confianza también utilizado por este software, el cual es del 95 % para el programa de la versión 2010 utilizado.

Para la síntesis por radiación de microondas se determinaron las posibles fuentes de error mediante las pruebas preliminares desarrolladas y con base en la revisión bibliográfica. Estas condiciones influyeron en tres fases de la investigación: la síntesis por radiación de microondas (Loupy, 2003, p. 127), la síntesis por reflujo y el análisis por HPLC. Los parámetros estadísticos considerados en el presente estudio responden a los siguientes criterios:

- a) La evaluación estadística de ensayos en laboratorio (Schoenbach, 2004, p. 451).
- b) El uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayos (Rivera y Rodríguez, 2010, p. 3).
- c) El trabajo experimental con base en manuales de calidad (COFILAB, 2004, p. 1).

El coeficiente de error utilizado se calculó por división de la desviación estándar para el valor promedio de los datos, cuyo valor límite se fijó en un 25 % para las tres réplicas realizadas; valor que se justifica y se relaciona con las posibles fuentes de error indicadas en el acápite 2.6.3.2 (Schoenbach et al., 2004, p. 289).

El modelo de precisión de Horwitz

Puntos fuera del área (definida por la distribución de los datos a partir del valor promedio y su distribución estadística) de confianza del 95 % indican errores grandes (Jurado, 2008, p. 4). En el presente estudio, todos los valores del coeficiente de error (desviación estándar \times 100 % / promedio) son menores al 25 % (desviación absoluta máxima del 12,5 % de conversión, $z \sim 1,25$) para un rango de resultados del 27 al 90 % de conversión, dan como resultado un valor de $z < 2$ ($z = \text{desvío absoluto} / \text{desviación estándar}$) que permiten concluir que los resultados son “Satisfactorios” frente al valor de **3** como el número de réplicas mínimas (COFILAB, 2004, pp. 7-8).

A partir de la desviación estándar se puede también calcular el coeficiente de variación o desviación estándar relativa, que se usa para comparar resultados medidos en distintas escalas. Horwitz dedujo una expresión para predecir el valor esperado para la desviación estándar relativa para la precisión intermedia a partir de la concentración de analito (Jurado, 2008, p. 6).

El coeficiente de variación de Horwitz es uno de los primeros parámetros empíricos, cuya utilidad como valor de referencia ha sido de utilidad para el control de calidad y la evaluación del desempeño (Rivera y Rodríguez, 2010, p. 1). Este coeficiente aumenta con menores concentraciones del analito en el ensayo, por ejemplo si se encuentra en partes por millón. En el caso de la cuantificación de la **ECC**, con un rango de concentración de 1,6 a 6,8 ppm, este parámetro puede superar el 20 % (Rivera y Rodríguez, 2010, pp. 1-3).

Tamaño muestral para estimación de intervalo

Puede usarse la amplitud tolerable para un intervalo de confianza como objetivo para estimar el tamaño muestral necesario para la población de estudio. Las muestras del presente estudio son 3, lo cual hace que el error a obtenerse sea superior al 10 %, pero por confiabilidad no mayor al 30 % (Schoenbach, 2004, p. 459).

Un intervalo de confianza de amplio rango de valores puede incluir el verdadero valor del parámetro estimado; cuanto más estrecho el intervalo de confianza, la estimación será más precisa (Schoenbach et al., 2004, p. 287).

Con un nivel de confianza del 95 %, el rango aceptable de la estimación puntual (x) en función del error absoluto es de 0,6 a 4,7 (COFILAB, 2004, pp. 8-9); dicha función se indica en la ecuación A.1 para un coeficiente de error relacionado con x . Si se usa el valor del 25 % como coeficiente de error aceptable y error absoluto dentro del rango para un valor de 6,31, que permitió calcular un valor de x de 3,97; estimación puntual dentro del rango aceptado ($< 4,7$ y $> 0,6$).

$$1,96 \left(\frac{1}{\sqrt{\left[\frac{(x)(x-1)}{3} \right]}} \right) = \text{error absoluto} = \frac{25\%}{x} = 6,31$$

[A.1]

ANEXO IX

Fotografías de las pruebas preliminares realizadas para la síntesis de la 1,2-Benzopirona por radiación de MO con hidróxido de sodio como catalizador

En las figura IX.1 y IX.2 se presentan las mezclas reactivas de la síntesis de la 1,2-Benzopirona mediante el reordenamiento de Claisen con el uso del hidróxido de sodio (NaOH) como catalizador a diferentes concentraciones y dosificaciones.

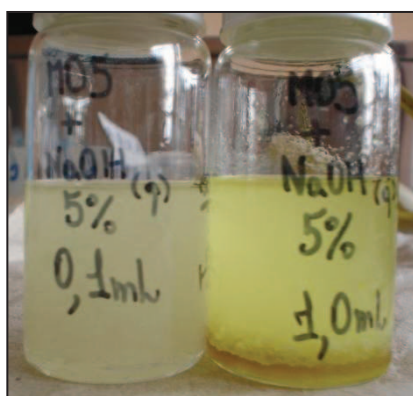


Figura AIX.1. Fotografía de las mezclas reactivas resultantes de la síntesis por MO de la 1,2-Benzopirona al nivel 10 de potencia y 1 min de irradiación, sin sílica gel, a 2/3 como relación molar entre reactivos y al 0,1 y 1,2 % mol del catalizador básico



Figura AIX.2. Fotografía de las mezclas reactivas resultantes de la síntesis por MO de la 1,2-Benzopirona al nivel 10 de potencia y 1 min de irradiación, sin sílica gel, a 2/3 como relación molar entre reactivos y al 5,9 y 11,8 % mol del catalizador básico

ANEXO X

Ejemplo de cálculo de la evaluación de costos para la síntesis de la ECC y respaldos de proformas y facturas de equipos y reactivos utilizados

Primero se calculó el costo diario por el consumo de los reactivos a partir de los datos de las cantidades de estos usados, el número de procesos por día y el precio de la presentación comercial de cada sustancia, como se indica en la ecuación A.2. Después, se realizó la sumatoria de cada rubro para cada método tanto el convencional como el no convencional.

$$\begin{aligned} \text{Costo diario} &= \text{Períodos} \times \text{Precio Comercial} / \text{Presentación} \times \text{Consumo} && \text{[A.2]} \\ 3 \times \$ 71,46 / 500 \text{ g} \times 10,181 \text{ g} &= \$ 4,37 \text{ [USD]} \end{aligned}$$

Después se determinó, como se describe en la ecuación A.3, la cantidad final del producto a obtenerse por la presencia de una mayor o menor pérdida por cristalización o purificación del producto sintetizado.

$$\begin{aligned} \text{Rendimiento} &= \text{Conversión total} \times \text{Recuperación} && \text{[A.3]} \\ 89,64 \% \times 0,95 &= 85,158 \% \\ 80,50 \% \times 0,85 &= 68,425 \% \end{aligned}$$

Posteriormente, se realizaron las sumatorias correspondientes para obtener el tiempo total de operación al día, como se indicó en la tabla 3.33, para determinar el número total de síntesis diarios. Además, se totalizaron los costos para la inversión de equipo para cada técnica como se mostró en la tabla 3.34.

Para determinar cuan mayor es la inversión inicial por instrumental de la técnica por reflujo frente a la radiación de microondas, se calculó el monto inicial de equipos para el método convencional (2 561,00 USD) valor 8 veces mayor al método no convencional (327,70 USD). Este cociente se calculó como se indica en la ecuación A.4.

$$\frac{\text{Inversión mayor (técnica convencional)}}{\text{Inversión menor (técnica no convencional)}} = \text{Relación de Inversiones} \quad [\text{A.4}]$$

$$\frac{2\,561,00 \text{ USD}}{327,70 \text{ USD}} = 7,82$$

Además, se calculó el costo total de producción (insumos más reactivos) para la síntesis convencional y no convencional, como se indica en la ecuación A.5. Con ello, se determinó que el monto económico requerido para la técnica de microondas respecto a la convencional disminuye en un 73,4 %. Este porcentaje se calculó como se presenta en la ecuación A.6.

$$\text{Costo total} = \text{Costos Insumos} + \text{Costos Reactivos} \quad [\text{A.5}]$$

$$\text{Costos del método convencional} = 18,32 + 99,67 = 117,99 \text{ USD}$$

$$\text{Costos del método con MO} = 31,02 + 0,33 = 31,35 \text{ USD}$$

$$\frac{\text{Costo método convencional} - \text{Costo método no convencional}}{\text{Costo método convencional}} = \text{Relación de disminución} \quad [\text{A.6}]$$

$$\frac{117,99 - 31,35 \text{ USD}}{117,99 \text{ USD}} = 0,7343$$

El beneficio económico final por la producción de la **ECC** mediante la técnica de reflujos y por radiación de microondas, se calculó con los gastos de producción y la inversión inicial al beneficio mensual; es decir, el monto total de equipos, reactivos e insumos fueron restados a los ingresos por la **ECC** vendida en el mercado durante el primer mes de producción. De esta evaluación de costos e beneficios, se comprobó que la rentabilidad del proceso aumentó en un 709,7 % para la producción de la **ECC** como se expone en la ecuación A.7.

$$\frac{\text{Beneficio técnica con MO} - \text{Beneficio técnica convencional}}{\text{Beneficio técnica convencional}} = \text{Aumento del Beneficio} \quad [\text{A.7}]$$

$$\frac{2\,078,63 - 256,72 \text{ USD}}{256,72 \text{ USD}} = \frac{1\,821,91 \text{ USD}}{256,72 \text{ USD}} = 7,097 \times 100\% = 709,7\%$$

A continuación, en las figuras AX.1, AX.2, AX.3, AX.4 y AX.5, se presentan los respaldos de las proformas y facturas de los equipos y reactivos utilizados en el desarrollo de la síntesis por el método convencional y no convencional.

ACTA DE ENTREGA- RECEPCIÓN DEFINITIVA INGRESO DE ACTIVOS FIJOS						
FECHA IMPRESIÓN		15/06/2011				
TIPO		TIPO: Compra local		NRO. 5167		
FECHA		15/06/2011				
UNIDAD		Departamento de Ciencias Nucleares				
DEPENDENCIA		Laboratorio de Investigaciones Aplicadas				
PROVEEDOR		CESAR VASCONEZ, CTRUC: 1701400598001				
Item	código	Concepto	ordinal	descripción	cantidad	valorUnitario
1	1.4.1.01.04	ROTAVAPOR	12	METÁLICO (BEIGE)(111005573) HEIDOLPH (Hei-VAP-EL)	1	4.326,00
otras CON: BAÑO MARIA HEIDOLPH MOD. Hei-VAP SERIE 111001584						
2	1.4.1.01.04	PLANCHA DE CALENTZ	36	METÁLICO (AMARILLO)(17691004717889) THERMO SCIENTIFIC (SP1316350)	1	600,60
otras Y AGITACION						
3	1.4.1.01.04	EQUIPO	177	METÁLICO (TOMATE)(6045) MRC (KI/6)	1	2.561,00
otras DE EXTRACCION SOXHLET						
4	1.4.1.01.04	BOMBA DE VACIO	52	METÁLICO (PLOMO)(0710610635) GAST (DOA-P704-AA)	1	429,00
otras PORTATIL						
5	1.4.1.01.04	BAÑO MARIA	47	METÁLICO (PLATEADO)(SELECTA (PRECISION) 6001195)	1	938,63
otras BAÑO MARIA						

Figura AX.2. Escuela Politécnica Nacional. (2011). *Acta de Entrega-Recepción No. 5167* – Ingreso de Activos Fijos. Proveedor: César Vásconez, Fecha de emisión: 2011 – 06 – 15: DCN – LIA

COTIZACION No: 77148433-758		RUC : 1790001024001		MERCK			
Señor (es): ESCUELA POLITECNICA NACIONAL		REPRESENTANTE QUE ELABORA LA COTIZACION IVET OJEDA		CODIGO REPRESENTANTE 77148433			
LADRON DE GUEVARA E11-253 QUITO / PICHINCHA 2507129		RUC DEL CLIENTE 1760005620001	CODIGO CLIENTE 40019636	ORDEN DE COMPRA N. 758			
		FECHA DE EMISION 25/09/2009	HORA EMISION 10:27:23	VALIDEZ DE LA OFERTA 10/10/2009			
		CONDICION DE VENTA 30 Dias	DIVISION Química	MONEDA US			
Pagina No 1							
ITEM	ARTICULO	DESCRIPCION	OBSERVACIONES	ENTREGA	IVA CANTIDAD	PRECIO UNITARIO	VALOR NETO
1	1000632500	ACIDO ACETICO GLAC.100% PA.2,5	2,5 L	Inmediata	NO 4	28,00	112,00
2	1003172500	ACIDO CLORHIDRICO F.37% PA.2,5	2,5 L	Inmediata	NO 2	22,30	44,60
3	1096232500	ETILO ACETATO P.A. 2,5 LT		Inmediata	NO 2	60,00	120,00
4	1012611000	ANILINA P.A.		90 Dias	NO 1	87,00	87,00
5	8017561000	BENZALDEHIDO PARA SINTESIS	1 L	Inmediata	NO 1	23,80	23,80
6	1066190050	ACIDO PIRUVICO SAL SODICA	50 G	60 Dias	NO 1	190,00	190,00
7					NO 1	0,00	0,00
MERCK C.A. ES * CONTRIBUYENTE ESPECIAL * NO RETENCION IVA							
SUBTOTAL US						577,40	
IVA 12,00 %						0,00	
TOTAL COTIZADO US						577,40	
NOTA : PEDIDO MINIMO POR FACTURA 100 USD ENTREGA INMEDIATA SALVO VENTA PREVIA							

Figura AX.3. Labomersa S.A., Distribuidor autorizado MERCK C.A. (2010). *Cotización No. 77148433 – 758.* Fecha de emisión: 2009 – 09 – 25, Fecha de validez: 2009 – 10 – 10: Representante con el código 77148433

Espectrocrom

Los Nopales N63-140 y Helechos Télf.: 02 346 3266 – 02 346 3275 – Fax: 02 346 4003 e-mail: espectrocrom@ecnet.ec

QUITO - ECUADOR

COTIZACIÓN

Fecha: 25 de marzo del 2010 Cotización #: 464A LN 10
 Cotización: Srta. Mercedes Cueva Validez: 30 días
 Empresa: EPN
 Dirección: Quito FAX

Reactivos							
Item	Código	Descripción	Present.	Entrega	Qty	Unit. US\$	Total US\$
001	S356	Salicylaldehyde reagent grade, 98%	500 gr	45 a 60 días	1	127,68	127,68
002	104094	Piperidine ReagentPlus®, 99%	500 ml	45 a 60 días	1	135,26	135,26
003	D97754	Diethyl malonate 99%	500 gr	45 a 60 días	1	63,80	63,80
004	C4261	Coumarin ≥99% (HPLC)	100 gr	45 a 60 días	1	91,74	91,74
005	M1381	4-Methylumbelliferone	100 gr	45 a 60 días	1	102,74	102,74
006	390801	Ethyl 3-coumarincarboxylate 99%	5 gr	45 a 60 días	1	139,44	139,44
007	H23805	4-Hydroxycoumarin 98%	100 gr	45 a 60 días	1	97,90	97,90
008	105910	Salicylic acid ReagentPlus®, ≥99%	500 gr	45 a 60 días	1	62,05	62,05
009	D107409	2',4'-Dihydroxyacetophenone 99%	100 gr	45 a 60 días	1	144,00	144,00
SUB-TOTAL US\$							964,62
IVA 12%							115,75
TOTAL US\$							1080,37

Figura AX.4. ESPECTROCROM, Distribuidor autorizado Sigma – Aldrich (2010). Cotización No. 464A LN 10. Fecha de emisión: 2010 – 03 – 25, Fecha de validez: 2010 – 04 – 25: Ing. Leonardo Nolivos

COMPROBANTE DE PAGO							
Ejercicio:	2011	Entidad:	177-9999-0000	ESCUELA POLITECNICA NACIONAL - PLANTA CENTRAL			
No. CUR:	698	Tipo Registro:	DEV				
Monto:	201.07						
IVA:	24.13						
Sub Total:	225.20						
Retenciones IVA:	7.24						
Deducción Presupuestaria:	2.01						
Total Líquido Pagar:	215.95						
Estado:	APROBADO	Descripción:	FEBRERO/2011 B410122 CIFUENTES CAMPOS MARGOTH ELIZABETH FACT 1005 ADQUISICION DE INSUMOS PARA PROYECTO SEMILLA UTILIZACION DE RADIACION PIS-022-2009/2010-025 DE 12-11-10 10223 NB				
Cuenta Monetaria No.:	3333110000						
Solicitud de Pago		Aprobado por Tesorería		Entregado al BCE			
SI		SI		SI			
Cta. Pagadora	Fuente	Descripción de la Fuente	F. Confirmado	Monto Confirmado	Monto Rechazado		
01110204	1	RECURSOS FISCALES	24/02/2011	16.89	0.00		
01110204	2	RECURSOS FISCALES GENERADOS POR LAS INSTITUCIONES	24/02/2011	199.06	0.00		
Sub - Total				215.95	0.00		
Fecha Comprobant	RUC Beneficiario	Nombre Beneficiario	No. Serie Comp. de Venta	No. Serie Comp. de Venta del Est.	No. Comprobant	No. Autorización	Monto Comprobant
12/11/2010	1713740106001	CIFUENTES CAMPOS MARGOTH ELIZABETH	001	001	1005	1108611085	201.07
Retenciones							
		RETENCION 1% IR BIENES					2.01
		Retencion 30% - Sociedades					7.24
Total Deducciones:							2.01
Monto IVA:							24.13
Total Retenciones IVA:							7.24
Total Líquido Comprobante:							215.95
Deducciones Sin Factura							
Código	Nombre						Monto
Monto Líquido:							215.95

Figura AX.5. Savillex Corporation. (2009). COMPROBANTE DE PAGO de la *Factura No. 1005*. Orden # W001650 y Orden # W001547. Fecha de emisión: 2010 – 05 – 27; Ing. Margoth Cifuentes

ANEXO XI

**Propuesta de una práctica para el Laboratorio de Química Orgánica II
de la síntesis no convencional de la ECC**

PRÁCTICA N^o _____

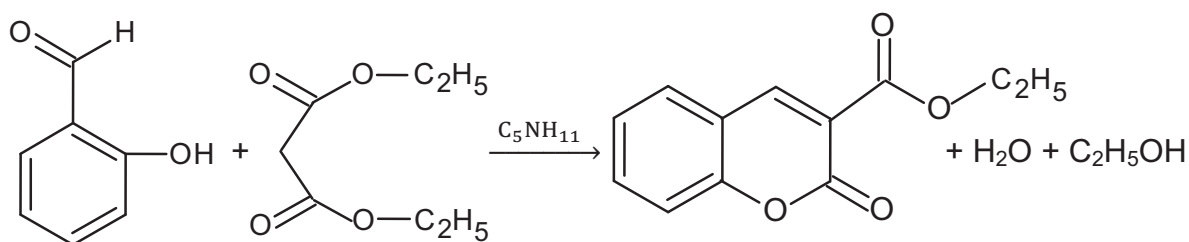
PROCESO: Reacción de ciclación heteronuclear

REACCIÓN MODELO: Condensación de Knoevenagel

TÉCNICA: Radiación de microondas (MO)

PRODUCTO: Etil 3-Carboxi Cumarina

ESQUEMA DE LA REACCIÓN



Salicilaldehído Malonato de Dietilo Piperidina Etil 3-Carboxi Cumarina Agua Etanol

1. En un reactor de teflón de 60 mL con fondo plano, colocar 5 mL de salicilaldehído. Luego, añadir 10 mL de malonato de dietilo y finalmente colocar 220 μ L de piperidina, el catalizador (ver nota a).
2. Cerrar herméticamente el reactor con las llaves (seguir las instrucciones de la persona técnico-responsable de la práctica) y agitar en sentido horizontal durante 5 s por triplicado.
3. Colocar un vaso de precipitación con 500 mL de agua a temperatura ambiente en el centro del plato giratorio del horno microondas convencional. También, poner el reactor en la superficie radial comprendida entre los 10 a 15 cm desde el centro.

4. Programar una potencia de funcionamiento del horno, la cual debe ser mayor al nivel 5 (cada grupo debe seleccionar una diferente). Irradiar con la MO a la mezcla reactiva durante 3 tiempos diferentes para cada nivel de potencia como se indican en la figura AXI.1.
5. Al término del tiempo de calentamiento, enfriar a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, colocar el reactor en un baño de agua a temperatura ambiente por 20 min para enfriar aún más la mezcla reactiva.
6. Abrir el reactor y para finalizar con el enfriamiento, se debe observar que la mezcla reactiva presente cristales formados por el producto esperado como se muestra en la siguiente figura:

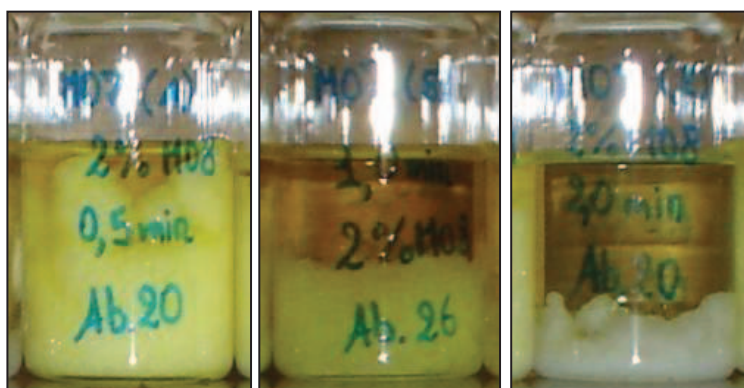


Figura AXI.1. Fotografías de 3 mezclas reactivas frías de la síntesis de la ECC con 2,0 % mol de piperidina y 0,5; 1,0 o 2,0 min de irradiación MO

7. Transferir el contenido del reactor a un embudo Büchner y filtrar por succión con la ayuda de una trompa de vacío y un kitasato.
8. Lavar el sólido con 50 mL de agua destilada (ver nota b) y luego con 10 mL de metanol (ver nota c).
9. Dejar en la estufa a 40 °C durante 30 min para que se evaporen las últimas trazas de solvente y de reactivo en exceso.

10. Pesar el producto obtenido a temperatura ambiente y calcular el rendimiento del proceso desarrollado.

Notas:

- a) La piperidina es una sustancia controlada por el CONSEP y su manipulación debe realizarse estrictamente en la sorbona con mascarilla y guantes de nitrilo y el volumen requerido debe ser tomado con una única pipeta.
- b) El volumen recomendado de agua a ocuparse, primero debe retirar el producto remanente en el reactor y luego debe transferirse al embudo.
- c) El metanol debe colocarse rápidamente sobre toda la superficie del producto para minimizar las pérdidas por dilución del producto.